

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

Danielle da Silva Almeida

**ESTABELECIMENTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA A
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA VACINA SARAMPO, CAXUMBA E
RUBÉOLA (ATENUADA) PELO FABRICANTE NACIONAL (BIO-MANGUINHOS)**

Rio de Janeiro

2014

Danielle da Silva Almeida

**ESTABELECIMENTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA A
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA VACINA SARAMPO, CAXUMBA E
RUBÉOLA (ATENUADA) PELO FABRICANTE NACIONAL (BIO-MANGUINHOS)**

Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional
de Controle de Qualidade em Saúde da
Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre

Orientadoras: Karen Friedrich

Katherine Antunes de Mattos

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Almeida, Danielle da Silva

Estabelecimento de material de referência para a determinação da potência da vacina sarampo, caxumba e rubéola (atenuada) pelo fabricante nacional (Bio-Manguinhos)/ Danielle da Silva Almeida. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

121 f.: il.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

Orientadoras: Karen Friedrich e Katherine Antunes de Mattos

1. Vacinas Combinadas. 2. Material de Referência. 3. Controle de Qualidade. I
Titulo

Establishment of reference material for the determination of the potency of the mumps, measles and rubella (attenuated) vaccine by national manufacturer (Bio- Manguinhos).

Danielle da Silva Almeida

**ESTABELECIMENTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA A
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA VACINA SARAMPO, CAXUMBA E
RUBÉOLA (ATENUADA) PELO FABRICANTE NACIONAL (BIO-MANGUINHOS)**

Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional
de Controle de Qualidade em Saúde da
Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre

Aprovado em 15/04/2014

BANCA EXAMINADORA

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Daniel da Silva Guedes Jr. (Doutor)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Janaína Marques Rodrigues (Doutor)
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

Aos meus pais João (*in memoriam*) e Eliane,
pelo ensinamento de vida e respeito ao próximo.

Ao meu marido Mário e aos Meus filhos Marcella e Arthur, razões da
minha existência.

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de Mestrado é uma experiência enriquecedora e de plena superação. Nos modificamos a cada tentativa de buscar respostas às nossas aflições de ‘pesquisador’. Para aqueles que compartilham conosco desse momento, parece uma tarefa interminável e enigmática que só se torna realizável graças a muitas pessoas que participam, direta ou indiretamente, mesmo sem saber realmente o que e para que nos envolvemos em pesquisa. E é a essas pessoas que gostaria de agradecer.

Preliminarmente, quero agradecer a Deus que sempre esteve ao meu lado, pelo dom da vida, por ter me concedido saúde e inteligência para a realização de mais um sonho, por ter colocado em meu caminho pessoas que me ajudaram na realização desse trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) pelo apoio institucional para a realização desta pós-graduação.

À Darcy Akemi Hokama pela confiança e incentivo.

Em Especial à minha ex-chefe Lilia Ribeiro Seródio que me ajudou na elaboração desse trabalho.

À coordenação e à secretaria do Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), pela oportunidade de aprendizado e capacitação profissional.

À Dr^a. Karen Friedrich pela orientação e incentivo.

À Dr^a. Katherine Antunes de Mattos, por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Mesmo chegando sem me conhecer direito, você abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor em tudo que faço e irei fazer daqui para frente. Tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada.

À minha chefe Carina Cantelli pela confiança e incentivo.

Ao meu ex-chefe e colaborador Fernando César Ferreira por ter ajudado desde o início desse projeto.

Ao Doutor, revisor e amigo Daniel da Silva Guedes, por toda dedicação e ajuda.

Ao Paulo Cesar Dick pelo interesse, dedicação e auxílio nas análises estatísticas desse estudo.

Ao Carlos Alberto Corrêa Antunes pela ajuda, interesse no estudo de estabilidade.

Ao Meu pai João Badaue de Almeida que infelizmente não está mais entre nós. Devo a ele tudo que conquistei e sei que onde estiver está muito orgulhoso por eu ter realizado mais um sonho.

À minha família: marido Mário Marim Gonçalves e aos meus filhos Macella Almeida de Souza, Arthur Almeida Gonçalves, minha mãe Eliane Almeida, meu irmão Leandro Almeida e aos demais familiares pela paciência e compreensão do meu mau humor constante e a tolerância zero.

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos amigos do mestrado que tornaram mais leves o cumprimento dos intermináveis créditos. Em especial a Anna Christina Rosa Guimarães por mais dois anos de amizade e companheirismo.

Às minhas amigas Alessandra Santos Almeida, Isabel Maria Alexandre Freire e Cibele Baptista pelo apoio, carinho e paciência nessa minha jornada.

À Seção de Potência (SEPOT), em especial a Ingrid Pinheiro de Medeiros e Carlos José da Silva pela enorme contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da Seção de controle de Banco de células (SBCEL), por me incentivarem e pela compreensão da minha ausência durante o decorrer do curso. Especialmente aos amigos Carlos José da Silva e Gabriel Assad Baduy pelos inúmeros momentos de descontração e conselhos, pelo carinho e amizade que quero cultivar para sempre.

Ao DEQUA por todas as pessoas maravilhosas que estão sempre me dando apoio com palavras de carinho, com um abraço e até mesmo um sorriso.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,

Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem

Foram conquistadas do que parecia impossível

Charles Chaplin

RESUMO

Vacinas são os únicos meios para interromper a cadeia de transmissão de doenças imunopreveníveis. A vacina tríplice viral (contra sarampo, caxumba e rubéola), fornecida por Bio-Manguinhos, é constituída da mistura dos vírus vivos atenuados do sarampo, caxumba e rubéola. É de grande importância o efetivo controle da qualidade deste produto antes do seu ingresso no mercado, sendo necessária a realização do ensaio de potência biológica com a utilização de uma vacina de referência. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar um lote vacinal como material de referência de trabalho (MRT) candidato ($cMRT_{Bio}$) para ser utilizado na rotina da determinação de potência da vacina tríplice viral em substituição a vacina disponibilizada pela GlaxoSmithKline (GSK) empregada anteriormente. Este estudo foi baseado nas normativas de compêndios que preconizam os estudos de caracterização do lote candidato quanto à homogeneidade e estabilidade, utilizando-se ferramentas estatísticas adequadas, visando à atribuição do seu valor, atendendo aos propósitos desejados e agregando maior confiabilidade aos ensaios de potência realizados pelo laboratório. O lote designado de 131VVA002Z utilizado como $cMRT_{Bio}$ apresentou características como integridade, composição e potência em conformidade com as especificações exigidas. No estudo de homogeneidade, os resultados obtidos foram considerados homogêneos intra-frascos e inter-frascos, já que todos os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 10%, estando dentro do limite de aceitação. A potência estimada de cada componente viral do $cMRT_{Bio}$ foi de: 3,73 $\log_{10} CCID_{50}/DH$ para o vírus do sarampo, 4,75 $\log_{10} CCID_{50}/DH$ para o vírus da caxumba e 3,67 ($\log_{10} CCID_{50}/DH$) para o vírus rubéola, estando dentro das especificações previstas. No estudo de estabilidade verificamos um pequeno decaimento de potência, sendo estes valores considerados irrelevantes, uma vez que a potência encontrada ainda se encontrava dentro dos valores determinados para a especificação da vacina. De acordo com os resultados obtidos, verificamos que o $cMRT_{Bio}$ apresentou todas as características exigidas para ser utilizado como MRT, sendo este material protocolado na Instituição como MRT(B)TVV001/13.

Palavras-chave: Vacinas Combinadas. Material de Referência. Potência

ABSTRACT

Vaccines are the only means to interrupt the transmission chain of transmission of immune predictable diseases. The MMR vaccine (measles, mumps and rubella), supplied by Bio-Manguinhos, is composed of a mixture of live attenuated viruses of measles, mumps and rubella. It is of great importance to the effective control of the quality of this product before its market entrance because it is necessary to perform the test of biological power with the use of a reference vaccine. The main objective of this study was to evaluate a batch vaccine as work reference material (MRT) candidate (cMRTBio) to be used in the routine determination of power of the MMR vaccine in replacing the vaccine made by GlaxoSmithKline (GSK), which was previously employed. This study was based on normative compendia that advocate the studies of characterization of candidate batch homogeneity and stability, using appropriate statistical tools, aiming the allocation of its value, taking into account the purposes intended and aggregating greater reliability to tests of power performed by the laboratory. The batch designated as 131AWV002Z used as cMRTBio presented characteristics such as integrity, composition and power in accordance with the required specifications. In the homogeneity study, the results obtained were considered homogeneous intra-bottles and inter-bottles, considering that all coefficients of variation obtained were lower than 10 %, while within the limit of acceptance. The estimated power of each viral component of cMRTBio was: 3.73 log₁₀ CCID₅₀ / DH for the measles virus, 4.75 log₁₀ CCID₅₀ / DH for the mumps virus and 3.67 (log₁₀ CCID₅₀ / DH) for the rubella virus, being within the specifications provided. In the study of stability we noticed a small decay of power, being these values considered irrelevant, since the power found was still within the values determined for the specification of the vaccine. According to the results obtained, we can notice that the cMRTBio presented all the required characteristics to be used as MRT, being this material filed in the Institution as MRT(B)TVV001/13.

Keywords: Combined Vaccines. Reference Material. Power

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de frascos da vacina cMRT _{BIO} utilizadas neste estudo.....	59
Tabela 2. Meios de cultura utilizados para diluição das vacinas.....	62
Tabela 3. Esquema de diluições para determinação da concentração viral da caxumba.....	63
Tabela 4. Esquema de diluições para determinação da concentração viral do sarampo e rubéola.....	63
Tabela 5. Especificação para aprovação do ensaio de potência da vacina tríplice viral.....	66
Tabela 6. Limites de aceitação do ensaio de termoestabilidade.....	68
Tabela 7. Matriz do estudo de estabilidade.....	69
Tabela 8. Dados obtidos no ensaio de calibração do MRT _{GSK} frente ao MRI _{NIBISC}	71
Tabela 9. Resultados estatísticos do estudo de homogeneidade.....	72
Tabela 10. Dados obtidos nos testes de potência.....	74
Tabela 11. Componentes da variância para sarampo.....	77
Tabela 12. Componentes da variância para caxumba.....	79
Tabela 13. Componentes da variância para rubéola.....	81
Tabela 14. Sumário das especificações e valores obtidos de potência do cMRT _{Bio}	82
Tabela 15. Resultado do ensaio de termoestabilidade.....	83
Tabela 16. Resultado do ensaio de estabilidade a 2-8 °C.....	84
Tabela 17. Resultado do ensaio de estabilidade a -20 °C.....	85
Tabela 18. Resultado do ensaio de estabilidade a -25 °C.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Calendário de vacinação do MS.....	23
Figura 2. Estrutura esquemática do vírus do sarampo.....	24
Figura 3. Incidência mundial do sarampo em 2011.....	26
Figura 4. Incidência de sarampo e cobertura vacinal em menores de 1 ano (até 2001) e de 1 ano (a partir de 2002), com a vacina tríplice viral. Brasil, 1980-2003.....	27
Figura 5. Coeficiente de mortalidade e letalidade por sarampo. Brasil, 1977-2000.....	28
Figura 6. Estrutura esquemática do vírus da caxumba.....	31
Figura 7. Estrutura esquemática do vírus da rubéola.....	35
Figura 8. Fluxograma de produção e controles microbiológicos e biológicos da vacina tríplice viral.....	42
Figura 9. Esquema experimental do preparo do material de referência.....	51
Figura 10. Árvore genealógica do lote 131VVA002Z originário do MRT _{Bio}	59
Figura 11. Desenho esquemático do protocolo de diluições das suspensões virais.....	65
Figura 12. Influência do dia nas médias dos Resultados de Potência do cMRT _{Bio} e do padrão MRT _{GSK}	75
Figura 13. Influência do dia e dos frascos nos resultados de potência do cMRT _{Bio}	76
Figura 14. Carta controle da potência biológica do componente viral sarampo do cMRT _{Bio}	78
Figura 15. Carta controle da potência biológica do componente viral caxumba do cMRT _{Bio}	80
Figura 16. Carta controle da potência biológica do componente viral rubéola do cMRT _{Bio}	82
Figura 17. Resultado dos ensaios de estabilidade na temperatura de 2-8°C e -20°C no período de 3 meses.....	86
Figura 18. Resultado dos ensaios de estabilidade na temperatura de 25°C no período de 3 meses.....	88
Figura 19. Modelo proposto para a rotulagem do MRT biológico de Bio-Manguinhos (MRT (B) TVV001/13).....	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Especificação da vacina tríplice viral.....	58
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CCID ₅₀	Dose 50% infectante em cultura de células
CCID ₅₀ /DH	Dose 50% infectante em cultura de célula por dose humana
CE	Comunidade Europeia
CEF	Célula de fibroblastos de embrião de galinha
CMED	Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos
CEME	Central de Medicamento
CEV	Campanha de Erradicação da Varíola
CV	Coefficiente de variação
CTV	Complexo Tecnológico de Vacinas
CQ	Controle de Qualidade
CQI	Controle de Qualidade Interno
DEQUA	Departamento de Controle de Qualidade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTP	Difteria, Coqueluche e Tétano
ECP	Efeito Citopático
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FSESP	Fundação de Serviços de Saúde Pública
GSK	GlaxoSmithKline
GQ	Garantia de Qualidade Externa
HN	Hemaglutinina-neuraminidase
IC	Intervalo de confiança
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IT	Instrução de Trabalho
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por litro

mL	Mililitro
µL	Microlitro
MEM	Meio Eagle Earle
MR	Material de Referência
MRs	Materiais de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
MRCs	Materiais de referência certificados
MRI	Material de Referência Internacional
MRT	Material de Referência de Trabalho
MRT _{Bio}	Material de Referência de Trabalho de Bio-Manguinhos
cMRT	Candidato a Material de Referência de Trabalho
cMRT _{Bio}	Candidato a Material de Referência de Trabalho de Bio-Manguinhos
MRC ₅	Células diplóides humanas
MS	Ministério da Saúde
NF	Formulário Nacional
<i>NIBISC</i>	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAI	Programa Ampliado de Imunização
PNI	Programa Nacional de Imunizações
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RK-13	Célula de rim de coelho
SEMES	Setor de meios de cultura
SRC	Síndrome da Rubéola Congênita
UI	Unidades Internacionais
VERO	Células de rim de macaco verde Africano
WI-38	Célula diploide de pulmão de feto humano
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 HISTÓRIA DA VACINA.....	19
1.2 PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES.....	20
1.3 SARAMPO.....	24
1.3.1 Doença e agente etiológico.....	24
1.3.2 Aspectos epidemiológicos do sarampo.....	25
1.3.3 Desenvolvimento da vacina contra sarampo.....	29
1.4 CAXUMBA.....	31
1.4.1 Doença e agente etiológico.....	31
1.4.2 Aspectos epidemiológicos da caxumba.....	32
1.4.3 Desenvolvimento da vacina contra caxumba.....	34
1.5 RUBEÓLA.....	35
1.5.1 Doença e agente etiológico.....	35
1.5.2 Aspectos epidemiológicos da rubéola.....	36
1.5.3 Desenvolvimento da vacina contra rubéola.....	38
1.6 VACINA TRÍPLICE VÍRAL.....	39
1.6.1 Produção e controle de qualidade da vacina sarampo, caxumba e rubéola no Brasil.....	39
1.6.2 Aspectos regulatórios.....	43
1.7 MATERIAIS DE REFERÊNCIA	45
1.7.1 Materiais de referência para produtos biológicos.....	46
1.7.1.1 <i>Material de referência internacional (MRI)</i>	47
1.7.1.2 <i>Material de referência secundário ou de trabalho (MRT)</i>	48
1.7.2 Planejamento de um lote candidato a material de referência de trabalho da vacina tríplice viral para o teste de potência.....	49
1.7.3 Caracterização de material de referência de trabalho.....	52
1.7.3.1 <i>Estudo de homogeneidade</i>	52

1.7.3.2 <i>Estudo de estabilidade</i>	53
1.7.3.2.1 <i>Estudo de estabilidade acelerado</i>	53
1.7.3.2.2 <i>Estudo de estabilidade de longa duração</i>	54
2 JUSTIFICATIVA	55
3 OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO GERAL.....	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
4 MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA DE TRABALHO DA VACINA TRÍPLICE VIRAL.....	57
4.2 MATERIAL DE REFERÊNCIA INTERNACIONAL.....	60
4.3 MATERIAL DE REFERÊNCIA DE TRABALHO GSK.....	60
4.4 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA OU CONCENTRAÇÃO VIRAL DAS VACINAS.....	60
4.4.1 Cultura de células suscetíveis ao ensaio de potência.....	60
4.4.1.1 Preparo da suspensão celular RK-13.....	61
4.4.1.2 Preparo da suspensão celular VERO.....	61
4.4.2 Preparo de antissoros e meios de diluição.....	61
4.4.3 Procedimentos para diluição e determinação da potência.....	62
4.4.3.1 Critérios de aceitação do ensino.....	66
4.5 ENSAIO DE CALIBRAÇÃO.....	66
4.6 HOMOGENIDADE DO LOTE CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA DE TRABALHO PARA O TESTE DE POTÊNCIA.....	67
4.7 ENSAIO DE TERMOESTABILIDADE DO LOTE CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA DE TRABALHO PARA O TESTE DE POTÊNCIA.....	67
4.8 CRITÉRIOS PARA REPROVAÇÃO DOS TESTES DE POTÊNCIA E TERMOESTABILIDADE.....	68
4.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	68
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
5 RESULTADOS	71

5.1 CALIBRAÇÃO DO MRT _{GSK} FRENTE MRI _{NIBSC}	71
5.2 HOMOGENEIDADE.....	71
5.3 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA BIOLÓGICA.....	73
5.3.1 Avaliação da influência de diferentes parâmetros na potência biológica.....	73
5.3.2 Potência estimada do vírus do sarampo.....	77
5.3.3 Potência estimada do vírus da caxumba.....	79
5.3.4 Potência estimada do vírus da rubéola.....	80
5.4 ENSAIO DE TERMOESTABILIDADE.....	83
5.5 ESTABILIDADE	83
5.5.1 longa duração.....	83
5.5.2 acelerado.....	87
5.6 DOCUMENTAÇÃO REFERENCIAL A ANÁLISE DA VACINA CANDIDATO A MRT.....	89
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO 1 - Especificação da Vacina tríplice viral candidata a MRT_{Bio}.....	108
ANEXO 2 - Especificação do Material de Referência Internacional (Caxumba)....	109
ANEXO 3 - Especificação do Material de Referência Internacional (Rubéola)....	111
ANEXO 4 - Especificação do Material de Referência Internacional (Sarampo).....	113
ANEXO 5 - Especificação do Material de Referência de Trabalho GSK.....	115
Anexo 6 - Informe do Material de Referência de Trabalho Biológico para Vacina sarampo, caxumba e rubéola.....	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DAS VACINAS

A história da vacinação é um dos mais bem sucedidos capítulos da evolução da medicina. Vários fatores impulsionaram a descoberta e aperfeiçoamento das vacinas. Entre os principais, o terror das epidemias e os prejuízos na agricultura e veterinária (MARTINS et al., 2008).

Por volta do ano 1000, a medicina tradicional chinesa já utilizava um método que constava em triturar a casca da ferida produzida pela varíola - onde o vírus estava presente, porém morto - e soprar o pó produzido pela trituração através de um cano de bambu nas narinas do doente. Assim o sistema imune era estimulado a reagir contra a doença. Este processo foi denominado “variolização” (FEIJÓ & SÁFADI, 2006). A doença era comum entre diversos povos da África e da Ásia como Egípcios, persas, indianos, circassianos, georgianos e árabes. Um dos relatos mais interessantes sobre a doença vêm do Egito, onde foram comprovadas as marcas da enfermidade na face da múmia do faraó Ramsés II.

Em 1796, Edward Jenner, médico no interior da Inglaterra, foi responsável por um dos maiores avanços da medicina. Naquela época, a varíola era uma doença responsável por epidemias que dizimavam populações inteiras e cujas lesões, quando localizadas na face, desfiguravam as pessoas. Observando trabalhadores da ordenha das vacas, Jenner percebeu que eles não pegavam varíola; uma vez que já tivessem contraído a varíola bovina. Desta observação surgiu a ideia de retirar secreções de uma pústula da ordenhadora Sarah Nemes que sofria de varíola bovina (cow-pox) e inserir nos braços de James Phillips, um menino de 8 anos de idade. A vacinação foi eficaz, já que o menino não adquiriu a doença quando foi infectado com o vírus da varíola, seis semanas após a vacinação.

Jenner publicou seus estudos em 1798 e abriu caminho para a descoberta das vacinas - palavra originária do termo em latim *vaccinus*, de *vacca* (vaca) - o que muito tem contribuído para diminuir doenças e mortes causadas por agentes infecciosos (TEIXEIRA & ALMEIDA, 2003; MARTINS et AL., 2008). Em pouco tempo o desenvolvimento da vacina conquistou a Inglaterra. Já em 1799, era criado o primeiro instituto vacínico em Londres. Logo depois, em 1802, sob os auspícios da família real, fundava-se a Sociedade Real Jenneriana para a Extinção da Varíola (FERNANDES, 1999).

Além do britânico, outro nome de destaque na história da imunoprofilaxia é o de Louis Pasteur. Suas pesquisas no campo da microbiologia chegaram ao auge com a descoberta, em 1885, da vacina contra a raiva. Ao lado de Ferdinand Cohn e Robert Koch, o francês é tido como um dos principais fundadores da microbiologia (FERNANDES, 1999).

No início do século XX foram desenvolvidas vacinas contra doenças infecciosas como tuberculose, difteria, tétano e febre amarela. Após a 2ª Guerra Mundial, vieram as vacinas contra poliomielite, sarampo, papeira e rubéola (HISTORIA DAS VACINAS, 2012).

A partir de 1948, a saúde pública mundial passou a ter apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS), criada com a função institucional de conceder aos cidadãos o mais alto nível de saúde e coordenar a luta internacional de combate às doenças suscetíveis de disseminação (TEMPORÃO, 2003). A Organização Sanitária Pan-americana de saúde, em 1949, passou a ser considerada o escritório regional da OMS e em 1958, recebeu a denominação de Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (TEMPORÃO; NASCIMENTO; MAIA, 2005).

Em 1959, a OMS decidiu empreender campanha de erradicação global da varíola. Em 1967 constatou-se a eliminação da doença nas Américas, com exceção do Brasil. Em território brasileiro a luta contra a doença continuou até 1972 – ano em que registrou-se o último caso da doença no país - através de um convênio com a OPAS e a criação da Campanha de Erradicação da Varíola (CEV) doença no país (LEVI & KALLÁS, 2002; AZEVEDO, 2007). Mesmo assim, os resultados em escala mundial eram ainda insatisfatórios.

1.2 PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES

O sucesso da CEV fortaleceu, dentro do Ministério da Saúde (MS), uma corrente que defendia maiores investimentos no controle de doenças infecciosas preveníveis por imunização. Algumas iniciativas importantes ocorridas no período, que se estende de 1973 a 1980, permitem perceber a construção de uma base técnica, política e institucional que apenas nas décadas seguintes iria consolidar-se como importante ferramenta do Estado no controle efetivo de algumas doenças no país (TEMPORÃO, 2003).

Em 1973, por determinação do MS, foi criado o Programa Nacional de Imunizações (PNI). O programa tinha como objetivo coordenar as ações de imunizações que até então se caracterizavam pela descontinuidade, caráter episódico e 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 (MS) e da Central de Medicamentos (CEME) - foi aprovada em reunião realizada em Brasília, em 18 de setembro de 1973. Presidida pelo então Ministro Mário Machado Lemos, o encontro contou ainda com participação de renomados sanitaristas e infectologistas, além de representantes de diversas instituições de saúde (TEMPORÃO; NASCIMENTO; MAIA, 2005).

O PNI foi institucionalizado em 1975. O programa refletia o resultado da soma 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. Deste modo, o PNI passou a coordenar as atividades de imunizações desenvolvidas rotineiramente na rede de serviços traçando 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. Ao lado disso, a legislação específica sobre imunizações e vigilância epidemiológica enfatizou a relevância de atividades permanentes de vacinação e contribuiu para fortalecer institucionalmente o Programa (BRASIL, 1976).

O crescimento das campanhas de vacinações levou o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), criado em 1981, a analisar, a partir de 1983, amostras dos imunobiológicos adquiridos pelo PNI antes da sua distribuição. Desta maneira era garantida a qualidade e segurança destes imunobiológicos para consumo (TEMPORÃO; NASCIMENTO; MAIA, 2005).

O PNI desenvolveu ações planejadas e sistematizadas com atuações em estratégias diversas. A erradicação da febre amarela urbana em 1942, da varíola em 1973 e da poliomielite em 1989, além do controle do sarampo, do tétano neonatal, e das formas graves de tuberculose, difteria, tétano acidental e coqueluche foram algumas delas. Já em 2000, iniciou-se a implementação de medidas para controle das infecções pelo *Haemophilus influenzae* tipo b, rubéola e síndrome da rubéola congênita, hepatite B, influenza e suas complicações nos idosos, além de outras que visavam combater infecções pneumocócicas (BRASIL, 2003a).

Analisando o desenvolvimento e resultados obtidos ao longo dos séculos, evidencia-se que a vacina é uma das principais estratégias para interromper a cadeia de transmissão de doenças imunopreveníveis. Entretanto, o cumprimento do calendário de vacinação (Figura 1) e dos critérios de qualidade descritos nas normas oficiais, são imprescindíveis para o sucesso da vacinação e controle das doenças infecto-contagiosas (BRASIL, 2003a). Com o aumento do quadro vacinal, a combinação de vacinas para diferentes doenças tornou-se uma estratégia importante para diminuir custos e alcançar níveis desejados de cobertura. Neste cenário, Bio-Manguinhos tem papel protagonista. Em especial na produção de vacinas que atendam o calendário de vacinação do MS, como o fornecimento de cinco vacinas virais atenuadas: vacina febre amarela, vacina poliomielite tipos 1, 2 e 3, vacina sarampo, caxumba, rubéola (tríplice viral), vacina varicela, sarampo, caxumba, rubéola e vacina rotavírus (BRASIL, 2003a).

Figura 1. Calendário de vacinação do MS

IDADE	VACINAS	DOSES	DOENÇAS EVITADAS
Ao nascer	BCG - ID	dose única	Formas graves de tuberculose
	Vacina contra hepatite B (1)	1ª dose	Hepatite B
1 mês	Vacina contra hepatite B	2ª dose	Hepatite B
2 meses	Vacina tetravalente * (DTP + Hib) (2)	1ª dose	Difteria, tétano, coqueluche, meningite e outras infecções causadas pelo Haemophilus influenzae tipo b
	VOP * (vacina oral contra pólio)	1ª dose	Poliomielite (paralisia infantil)
	VORH * (Vacina Rotavírus Humano) (3)	1ª dose	Diarréia por Rotavírus
4 meses	Vacina tetravalente (DTP + Hib)	2ª dose	Difteria, tétano, coqueluche, meningite e outras infecções causadas pelo Haemophilus influenzae tipo b
	VOP (vacina oral contra pólio)	2ª dose	Poliomielite (paralisia infantil)
	VORH (Vacina Oral de Rotavírus Humano) (4)	2ª dose	Diarréia por Rotavírus
6 meses	Vacina tetravalente (DTP + Hib)	3ª dose	Difteria, tétano, coqueluche, meningite e outras infecções causadas pelo Haemophilus influenzae tipo b
	VOP (vacina oral contra pólio)	3ª dose	Poliomielite (paralisia infantil)
	Vacina contra hepatite B	3ª dose	Hepatite B
9 meses	Vacina contra * febre amarela (5)	dose inicial	Febre amarela
12 meses	SRC (tríplice viral) *	dose única	Sarampo, rubéola e caxumba
15 meses	VOP (vacina oral contra pólio)	reforço	Poliomielite (paralisia infantil)
	DTP (tríplice bacteriana)	1º reforço	Difteria, tétano e coqueluche
4 - 6 anos	DTP (tríplice bacteriana)	2º reforço	Difteria, tétano e coqueluche
	SRC (tríplice viral)	reforço	Sarampo, rubéola e caxumba
10 anos	Vacina contra febre amarela	reforço	Febre amarela

(1) A primeira dose da vacina contra a hepatite B deve ser administrada na maternidade, nas primeiras 12 horas de vida do recém-nascido. O esquema básico se constitui de 03 (três) doses, com intervalos de 30 dias da primeira para a segunda dose e 180 dias da primeira para a terceira dose.

(2) O esquema de vacinação atual é feito aos 2, 4 e 6 meses de idade com a vacina Tetravalente e dois reforços com a Tríplice Bacteriana (DTP). O primeiro reforço aos 15 meses e o segundo entre 4 e 6 anos.

(3) É possível administrar a primeira dose da Vacina Oral de Rotavírus Humano a partir de 1 mês e 15 dias a 3 meses e 7 dias de idade (6 a 14 semanas de vida).

(4) É possível administrar a segunda dose da Vacina Oral de Rotavírus Humano a partir de 3 meses e 7 dias a 5 meses e 15 dias de idade (14 a 24 semanas de vida). O intervalo mínimo preconizado entre a primeira e a segunda dose é de 4 semanas.

(5) A vacina contra febre amarela está indicada para crianças a partir dos 09 meses de idade, que residam ou que irão viajar para área endêmica (estados: AP, TO, MA, MT, MS, RO, AC, RR, AM, PA, GO e DF), área de transição (alguns municípios dos estados: PI, BA, MG, SP, PR, SC e RS) e área de risco potencial (alguns municípios dos estados BA, ES e MG). Se viajar para áreas de risco, vacinar contra Febre Amarela 10 (dez) dias antes da viagem.

Fonte: Ministério da Saúde

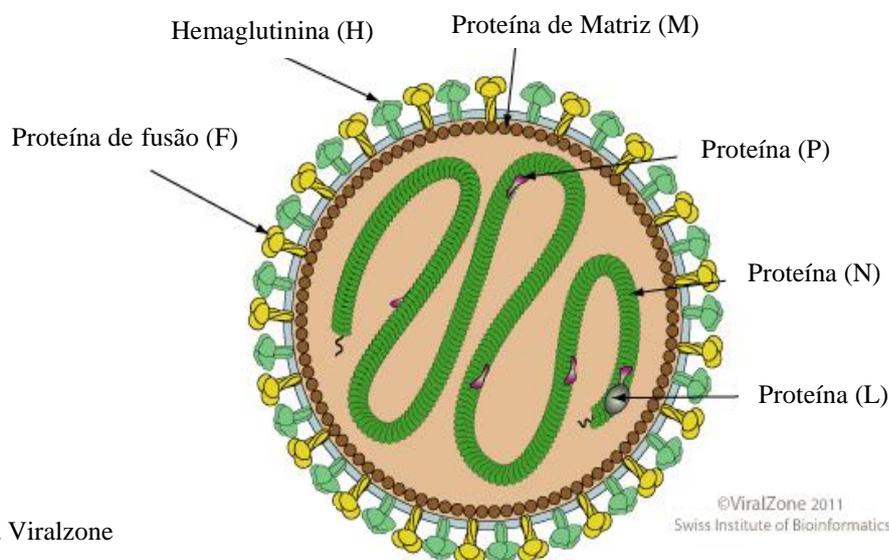
*Vacinas produzidas por Bio-Manguinhos

1.3 SARAMPO

1.3.1 Doença e agente etiológico

O agente etiológico do sarampo é um vírus RNA de fita simples, esférico, envelopado, não segmentado e de polaridade negativa, pertencente à família dos *Paramyxoviridae* do gênero *Morbillivirus*. O genoma consiste de, aproximadamente, 16 000 nucleotídeos e codifica oito proteínas, sendo seis proteínas estruturais das quais três estão associadas ao envelope: hemaglutinina (proteína H), proteína F (Fusão) e proteína Matriz (M) e três associadas ao nucleocapsídeo: nucleoproteína (N), fosfoproteína P (proteína P) e proteína L (STREBEL, PAPANIA, HALSEY, 2004). Assim, conforme o desenho esquemático apresentado na Figura 2 é possível visualizar que o envelope composto pela proteína de matriz (M) carrega projeções em sua superfície que variam de 9 a 15 nm de comprimento, compostas pelas glicoproteínas hemaglutinina (H) e a de fusão (F). O nucleocapsídeo, composto pela proteína N, a mais abundante das proteínas virais, e pela proteína P, está empacotado dentro do envelope na forma de uma espiral simétrica de comprimento total de 1,2 μm . A proteína L presente em pequena quantidade na célula infectada, interage com a proteína P, sendo parte do nucleocapsídeo viral na célula e no virion (GRIFFIN, 2001).

Figura 2. Estrutura esquemática do vírus do sarampo



Fonte: Site da Viralzone

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/

O sarampo é uma doença infecciosa aguda, de natureza viral, e altamente contagiosa. O vírus do sarampo é um patógeno exclusivamente humano. Sua transmissão se dá de forma direta - de pessoa a pessoa - através das secreções nasofaríngeas expelidas ao tossir, espirrar, falar ou respirar. Essa forma de transmissão é responsável pela elevada capacidade de contágio da doença (GRIFFIN, 2001).

A enfermidade aparece normalmente entre 10 e 12 dias após a exposição ao vírus e dura cerca de sete dias. Os sintomas iniciais incluem febre alta, tosse, coriza, conjuntivite, fotofobia e manchas de Koplik (pequenos pontos brancos que aparecem na mucosa bucal). Do 2º ao 4º dia, quando se acentuam os sintomas iniciais, aparecem as lesões características do sarampo, como exantema cutâneo máculo-papular de coloração vermelha, que se desenvolve a partir da região retroauricular se espalhando gradualmente pelo corpo (WHO, 2010).

A maioria dos óbitos por sarampo está associada às complicações inerentes à doença. Crianças com menos de cinco anos e adultos com mais de 20 anos são as vítimas mais comuns. As ocorrências mais graves incluem cegueira, encefalite, diarreia grave e desidratação, otites e infecções respiratórias graves, como pneumonia (WHO, 2010). É potencialmente mais perigoso entre crianças mal nutridas e pessoas com sistemas imunológicos debilitados pela Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS) e outras doenças. Mulheres infectadas durante a gravidez estão sujeitas a complicações graves, que podem resultar em aborto ou parto prematuro. Entre populações desnutridas ou com sistema de saúde precário e/ou inadequados, o sarampo pode matar cerca de 10% dos doentes. Pessoas que contraíram o sarampo e se livraram dele adquirem imunidade permanente (WHO, 2010).

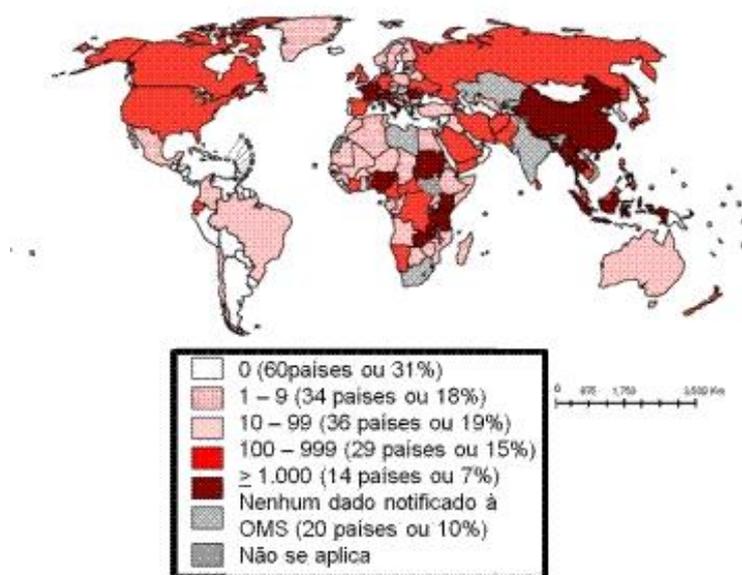
1.3.2 Aspectos Epidemiológicos do sarampo

Se ainda hoje o sarampo consiste em preocupação para formuladores de políticas de saúde pública, antes da vacina a letalidade da doença era devastadora. No século XVI dois eventos mostraram a força da doença em populações até então não expostas ao vírus: o primeiro em Cuba – 1529 – quando o sarampo matou 2/3 da população; o segundo, dois anos depois, quando levou a óbito metade da população de Honduras. A destruição se alastrou ao longo do tempo e estima-se que no decorrer de 150 anos 200 milhões de pessoas foram vítimas do sarampo (HERSCH et al., 2000; ACHARYA et al., 2002).

Mesmo hoje, com a disponibilidade de vacinas efetivas e seguras, a doença ainda é sério problema de saúde pública e uma das principais causas de morte na infância, principalmente nos países em desenvolvimento (OSTER et al., 2004; QUADROS et al., 2004). Anualmente, mais de 20 milhões de pessoas contraem a enfermidade. Do total de óbitos, mais de 95% ocorrem em países com baixa renda per capita e sistema de saúde precário (WHO, 2011a).

Entre 2001 e 2011, com a intensificação das campanhas de vacinação em todo o mundo, mais de um bilhão de crianças entre 9 meses e 14 anos, e que vivem em países de alto risco, foram vacinadas contra sarampo. Dados da OMS apontam que aproximadamente 85% das crianças receberam uma dose de vacina antes do primeiro aniversário, através de serviços de saúde de rotina. Este número supera os 72% registrados em 2000. Em consequência, em 2011, foi observada redução de 71% nos casos fatais de sarampo – de 548.000 para 158.000 óbitos – principalmente em crianças abaixo de cinco anos (WHO, 2011a). Em janeiro de 2012, a OMS atualizou a situação epidemiológica do sarampo em 2011 (Figura 3), quando intensa circulação do vírus ocorreu na Europa e África (WHO, 2011b).

Figura 3. Incidência mundial do sarampo em 2011



Fonte: Site da WHO

http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/big_measlesreportedcases6months_PDF.pdf

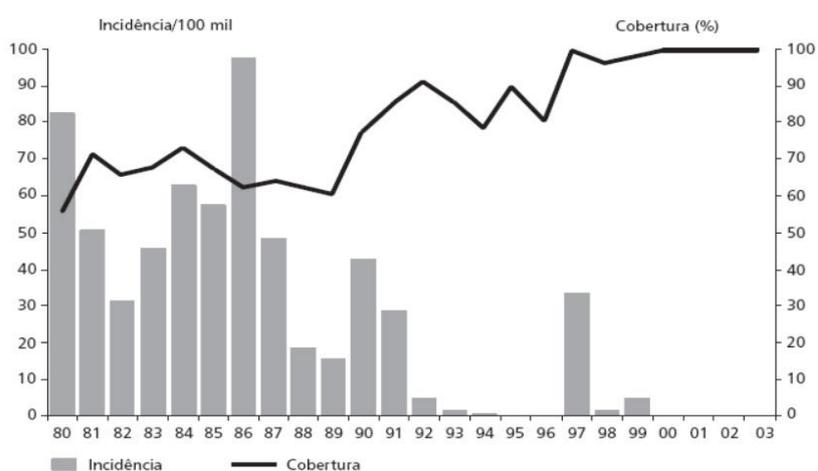
Diferentes regiões do mundo estão definindo metas para a eliminação do sarampo e da rubéola até o ano de 2015. Mesmo assim, surtos recentes de sarampo em países como o Reino Unido, Alemanha, Itália e Holanda indicam que a meta da erradicação completa ainda está

ameaçada. Dados colhidos entre maio de 2012 e abril de 2013, dão conta de que a região europeia registrou mais de 8.000 casos de sarampo, com cinco casos de encefalite e um óbito. Ainda na Europa, no mesmo período, diagnosticou-se mais de 10.000 casos de rubéola, a maioria na Polônia e Romênia (ECDC, 2013).

Em 2013, a circulação dos vírus da rubéola e do sarampo também foi observada na Ásia e África. Na Nigéria, 4.000 casos de sarampo resultaram em 36 óbitos. No início de junho, a OMS emitiu comunicado expressando preocupação com o crescente número de doenças transmissíveis, incluindo casos de sarampo na Síria, onde cerca de 7.000 casos conhecidos foram relatados até agora (WHO, 2013a). Segundo a OPAS, no mesmo período, foram notificados 129 casos de sarampo e sete casos de rubéola nos EUA, assim como 28 casos de sarampo e dois casos de rubéola no Canadá.

No Brasil, o sarampo é uma doença de notificação compulsória desde 1968 e, até 1991, o país enfrentou nove epidemias. O maior número de casos notificados deu-se em 1986 (129.942), representando um coeficiente de incidência de 97,7 por 100 mil habitantes (Figura 4). Até o início da década de 90, a faixa etária mais atingida foi a dos menores de 15 anos (BRASIL, 2005a).

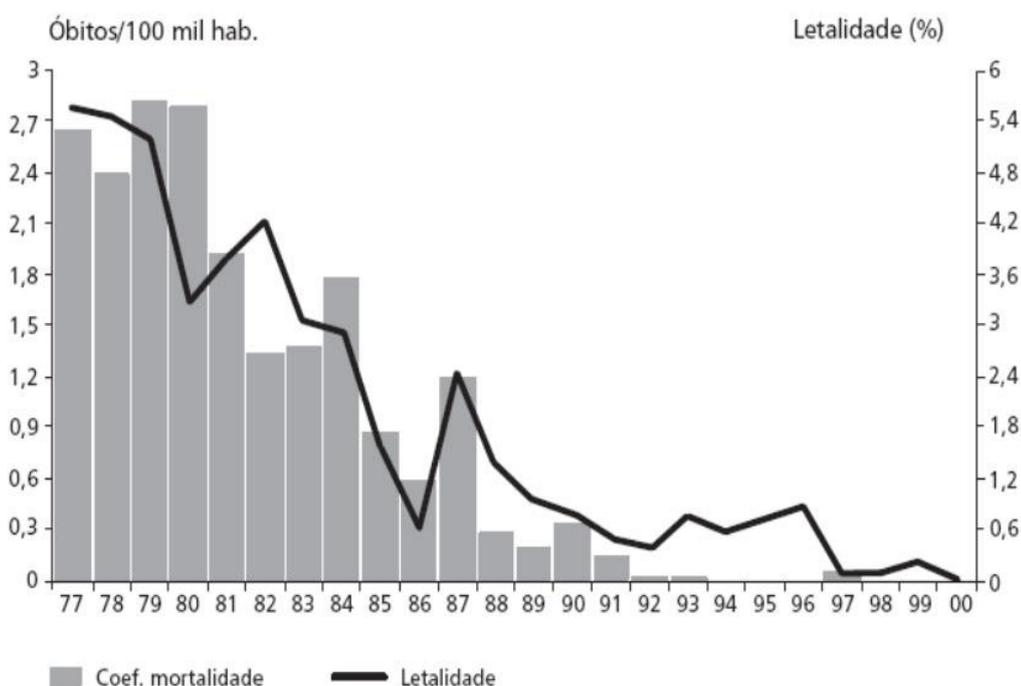
Figura 4. Incidência de sarampo e cobertura vacinal em menores de 1 ano (até 2001) e de 1 ano (a partir de 2002), com a vacina tríplice viral. Brasil, 1980-2003



Fonte: Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/.../Guia_Vig_Epid_novo2.pdf?

Até o fim dos anos 70 esta virose estabeleceu-se como uma das principais causas de óbito entre doenças infectocontagiosas, sobretudo em menores de cinco anos, em decorrência de complicações, especialmente a pneumonia. Já na década de 80, ocorre declínio gradativo do número de mortes. Tal redução foi atribuída ao aumento da cobertura vacinal e melhoria da assistência médica às crianças com complicações pós-sarampo. Na década de 90, a mortalidade de pacientes com sarampo acentuou seu declínio, com 822 óbitos registrados contra os mais de 16 mil da década anterior; uma redução de cerca de 95% (Figura 5) (BRASIL, 2005a).

Figura 5. Coeficiente de mortalidade e letalidade por sarampo. Brasil, 1977-2000



Fonte: Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde
[http:// portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/.../Guia_Vig_Epid_novo2.pdf?](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/.../Guia_Vig_Epid_novo2.pdf?)

Em 1997, após período de 4 anos com a doença sob controle, o país experimentou o ressurgimento do sarampo. O surto, iniciado na cidade de São Paulo, espalhou-se para outros estados. Com a adoção do Plano de Ação Suplementar de Emergência contra o Sarampo, em 1999, foi criado um grupo tarefa para atuar junto à vigilância epidemiológica de cada estado. A idéia era implementar ações de vigilância e controle da doença, viabilizando assim o

alcance da meta de erradicação de sua transmissão autóctone. No entanto, em fevereiro de 2000, ainda foram notificados 15 casos de sarampo no país.

Desde 2001 os casos registrados de sarampo se referem apenas à importação do vírus ao país e entre 2001 e 2003 foram verificados que as quatro notificações da doença eram de pacientes provenientes do Japão e Europa (BRASIL, 2005a). Após este período foram identificados outros 3 surtos da doença no território nacional. Em 2011 foram confirmados 42 casos. Já em 2013 o número de casos quadruplicou: 182 Os casos notificados no primeiro semestre de 2013 foram distribuídos nos estados de São Paulo (05), Minas Gerais (02), Santa Catarina (01), Pernambuco (62) e Paraíba (02) (DATASUS, 2014). Todos os casos de sarampo confirmados no Estado de São Paulo apresentaram histórico de viagem recente ao exterior (Estados Unidos e Itália), e houve transmissão intrafamiliar em duas oportunidades. Em janeiro 2014, o MS já havia confirmado 10 casos e 70 pessoas estavam em observação (DATASUS, 2014).

Para que a população brasileira continue efetivamente livre do sarampo, é imprescindível a manutenção de coberturas vacinais adequadas para impedir a formação de um estoque de suscetíveis. Isto significa a obtenção de níveis de cobertura de 95% em todos os municípios do país, atentando-se para que esta homogeneidade também seja alcançada em nível intermunicipal (BRASIL, 2005a).

A OMS através do Programa Ampliado de Imunização (PAI) recomenda como principal estratégia de combate e controle do sarampo a vacinação em massa para todas as crianças e adultos suscetíveis. Duas doses de vacina contra o sarampo, isoladamente, do sarampo-rubéola (dupla viral) ou a combinação sarampo-caxumba-rubéola (tríplice viral), deve ser o padrão para todos os programas nacionais de imunização (BRASIL, 2005b).

Mesmo com vacinas de baixo custo disponíveis, os níveis de cobertura vacinal adequados à interrupção da circulação da doença em países em desenvolvimento ainda não foram atingidos. Mais de 95% das mortes por sarampo ocorrem em países de baixa renda com infraestrutura de saúde deficiente. Apesar disso, atividades de imunização acelerada tiveram grande impacto na redução das mortes por sarampo (WHO, 2011a).

1.3.3 Desenvolvimento da vacina contra sarampo

A cepa Edmonston, isolada por Enders e Peebles, foi adaptada em cultivo celular e atenuada por passagens sucessivas, originando várias cepas menos virulentas (Figura 6A).

Após uma série bem sucedida de cultivos do vírus do sarampo em células de rim humano, as subculturas das partículas virais foram inoculadas em macacos suscetíveis ao sarampo (macacos *cynomolgus*), os quais desenvolveram febre, erupção cutânea, viremia e anticorpos contra o vírus (Peebles et al., 1957). Após uma passagem adicional, o vírus foi cultivado em células amnióticas humanas e, em seguida, inoculado em ovos de galinha (Milovanovic et al., 1957). Posteriormente, o vírus foi passado em fibroblastos de embrião de galinha. Quando as partículas virais foram inoculadas em macacos suscetíveis, não foram detectados sintomas da doença, mas a fixação de complemento e anticorpos neutralizantes (Katz et al., 1958; Enders et al., 1960).

Com base nesses resultados, uma cepa vacinal foi licenciada em 1963 e amplamente usada até 1975, apesar da reatogenicidade apresentada em crianças imunizadas (GRIFFIN, 2001; KATZ, 2009).

Uma vacina derivada da cepa Edmonston e inativada por formalina, produzida pelo Laboratório Lilly, foi licenciada em 1963 nos Estados Unidos e quatro anos depois em algumas cidades do Canadá. No entanto, seu uso foi descontinuado em virtude da imunidade de curta duração.

Várias cepas vacinais de vírus vivo e atenuado bem conhecidas, originárias do isolado de Edmonston, são utilizadas e licenciadas para vacinação, tais como a vacina Moraten ou AIK- C, Schwarz F88, CAM -70 e TD97 (MORGAN & RAPP, 1977; BANKAMP, 2011). Porém, existem vacinas derivadas de cepas distintas da Edmonston como a Leningrad-16, Shanghai 191, a TD 97 e a CAM 70 (STREBEL et al., 2004).

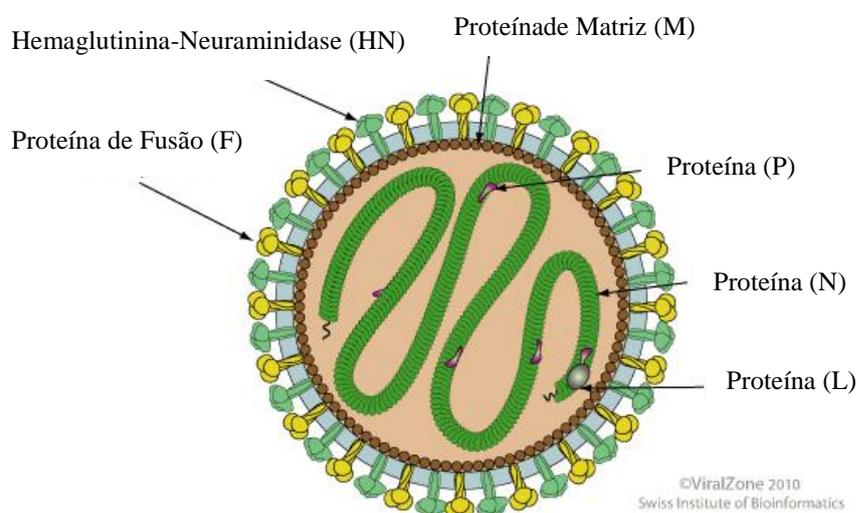
1.4 CAXUMBA

1.4.1 Doença e agente etiológico

O agente etiológico da caxumba pertence à ordem dos *Mononegavirales* e o sarampo pertence à família *Paramyxoviridae* e subfamília *Paramyxovirinae*. É um vírus envelopado, RNA de fita simples, não segmentado e de polaridade negativa. Do gênero *Rubulavirus*, os vírus da caxumba (Figura 6) são pleomórficos – de 100 a 600 nm – e levemente esféricos, com uma membrana externa contendo projeções formadas por glicoproteínas virais que se elevam de 12 a 15 nm da superfície do virion. Esse envelope recobre uma estrutura interna helicoidal, o nucleocapsídeo, que apresenta um tubo oco de aproximadamente 1 µm de comprimento, 17 nm de diâmetro e um núcleo central de 5 nm (CARBONE & WOLINSKY, 2001).

O vírus é composto por sete principais proteínas estruturais: as glicoproteínas, hemaglutinina-neuraminidase (HN); proteína de fusão F, responsáveis pela adsorção viral e fusão com a membrana da célula hospedeira e as proteínas localizadas dentro do virion: a proteína NP do nucleocapsídeo, a fosfoproteína P, a proteína L, a proteína M membrana-associada e a proteína SH de função desconhecida (PLOTKIN, 2004).

Figura 6. Estrutura esquemática do vírus da caxumba



Fonte: Site da Viralzone

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/556.html

O homem é o único hospedeiro natural do vírus da caxumba. O vírus se propaga através do contato direto ou por gotículas de aerossóis no trato respiratório superior, o que requer um contato mais próximo para transmissão do que para os vírus de sarampo e varicela (CDC,2001).

A entrada e a replicação inicial ocorrem na nasofaringe e nos nódulos linfáticos regionais. O tempo de incubação é de 16 a 18 dias, podendo se prolongar até 30 dias. Após 12 a 25 dias, ocorre a viremia, em que o vírus se espalha em múltiplos tecidos, incluindo meninges, glândulas salivares, pâncreas, testículos e ovários. Tipicamente, a doença se inicia com sintomas inespecíficos como mialgia, cefaleia, mal estar geral e febrícula, os quais em poucos dias são seguidos por um aumento uni ou bilateral característico das glândulas parótidas. Dentro de 1 a 3 dias, as glândulas salivares submandibulares e sublinguais são afetadas em aproximadamente 10% dos casos. Após cerca de uma semana, a febre e o aumento glandular desaparecem e, a não ser que ocorram complicações, a doença se resolve completamente. Em aproximadamente 30% dos casos não há sintomatologia ou ocorrem apenas sinais inespecíficos, não existindo terapia específica. O período infeccioso ocorre em sete dias antes de atingir a parotidite e até nove dias após o início do crescimento das parótidas (CDC, 2001).

1.4.2 Aspectos epidemiológicos da caxumba

Atualmente a caxumba é uma doença geograficamente irrestrita, exceto entre povoados remotos ou pequenas ilhas isoladas. Em populações urbanas e na ausência de imunização, a caxumba ocorre endemicamente, com um pico de incidência nos meses de inverno e primavera (MODLIN et al., 1975). A doença é endêmica durante todo o ano em lugares de clima quente. Já em climas temperados, o pico de incidência ocorre no final do inverno. O aumento de casos coincide com o aumento do contato entre suscetíveis, atribuído à entrada de crianças nas escolas (MEYER, 1962; LONDON & YORKE, 1973).

Na maior parte do mundo a incidência da caxumba dá-se na faixa de 100 a 1.000 casos por 100.000 indivíduos, com pico epidêmico a cada 2 a 5 anos. A maior incidência é encontrada em crianças entre 5 e 9 anos, sendo que a infecção natural pelo vírus confere proteção prolongada. Crianças com idade pré-escolar são importante fonte para a introdução do vírus em famílias com recém- nascidos (COONEY, 1975). Dados sobre a incidência da caxumba são imprecisos, pelo fato de aproximadamente 30% das infecções pelo vírus da

caxumba ser subclínicas (LEVITT et al., 1970). Além disso, devido à natureza geralmente branda da doença, somente um em cada quatro casos é direcionado para avaliação médica. Desses, apenas 14% são reportados às agências de saúde pública (WOLINSKY, 1996). Relatos de aparente reinfecção em indivíduos podem refletir reação cruzada entre os anticorpos da caxumba e aqueles de outras paramixoviroses (COONEY, 1975).

Nos Estados Unidos foi observada, antes da utilização da vacina, alta incidência dos casos notificados: em 1966, 625 casos de encefalite (0,5% dos casos), com 10 óbitos (1,6% dos casos); em 1968, 185.691 casos da doença e, em 1996, apenas 751 casos. Os números de 1996 correspondem a uma incidência de 0,7/100.000 habitantes (CDC, 2000). Entre 1976 e 1988, a tríplice viral foi introduzida na maioria dos países desenvolvidos, observando-se acentuada redução do número de casos (GALASKA, 1999).

No Brasil, estado de São Paulo, a vacina tríplice viral entrou no calendário vacinal em 1992, tendo como alvo crianças de 15 meses de idade, que seriam imunizadas juntamente com o primeiro reforço da vacina contra a difteria, coqueluche e tétano (DTP) e a Sabin (BRASIL,2005b). Porém, não há dados suficientes em relação à incidência da caxumba no Brasil, para se realizar para análise epidemiológica. Isso se deve a não obrigatoriedade de notificar casos de caxumba.

Em 2002, a vacina contra caxumba foi incluída no calendário de imunização de 121 países / territórios. Em países onde a vacinação foi introduzida e a alta cobertura mantida, a incidência da doença declinou rapidamente e a circulação do vírus foi interrompida. Já naqueles onde a vacinação não foi introduzida, a incidência continua alta, o que afeta principalmente crianças entre 5 e 9 anos (FOLB, 2004).

Nos países que atingiram alto índice de imunização vacinal, a vigilância deve ser usada para identificar populações de alto risco, prever e prevenir possíveis surtos. Países que têm como objetivo interromper completamente a transmissão da caxumba requerem vigilância intensiva, a fim de detectar, investigar e confirmar cada caso suspeito entre a população (PLOTKIN, 2004).

1.4.3 Desenvolvimento da vacina contra caxumba

A propagação do vírus em ovos embrionados por Habel (1945) e Enders (1946) e, posteriormente, em cultura de tecidos, possibilitou o primeiro teste em humanos de uma vacina inativada (HABEL, 1951).

Há mais de trinta anos, são utilizadas vacinas contra a caxumba produzidas com cepas de vírus vivo e atenuado. A maior parte das vacinas usadas mundialmente é proveniente das cepas Jeryl Lynn, RIT 4385 (derivada da cepa Jeryl-Lynn), Leningrad-3, L-Zagreb (derivada da cepa Leningrad-3) e Urabe. Vacinas de vírus vivo atenuado, mas fabricadas em escala limitada, incluem as cepas Hoshino, Torii e NKM-46 (WHO, 2009).

No início da década de 90, a vacina Urabe foi retirada de muitos mercados devido ao alto índice de eventos adversos relacionados ao sistema nervoso central, como meningites. O sistema nervoso central é local comum para a disseminação do vírus da caxumba. No Japão, entre 630.157 indivíduos que receberam a vacina Urabe Am9, pelo menos 311 casos de doenças do sistema nervoso central foram notificados. Destes, 96 foram confirmados por isolamento de vírus vacinal do fluido cérebro espinhal (CARBONE & WOLINSKY, 2001).

O lote semente original da cepa RIT 4385 é um isolado puro da cepa Jeryl Lynn 1 (cepa JL-1), uma das duas cepas da Jeryl Lynn, que teve origem na vacina Mumps Vax[®] da Merck. A cepa anterior da caxumba, usada na vacina tríplice viral da GlaxoSmithKline (GSK), Pluserix[®], era a cepa Jeryl Lynn. A cepa RIT 4385 está em processo de transferência para Bio-Manguinhos pela GSK (GSK, 2003).

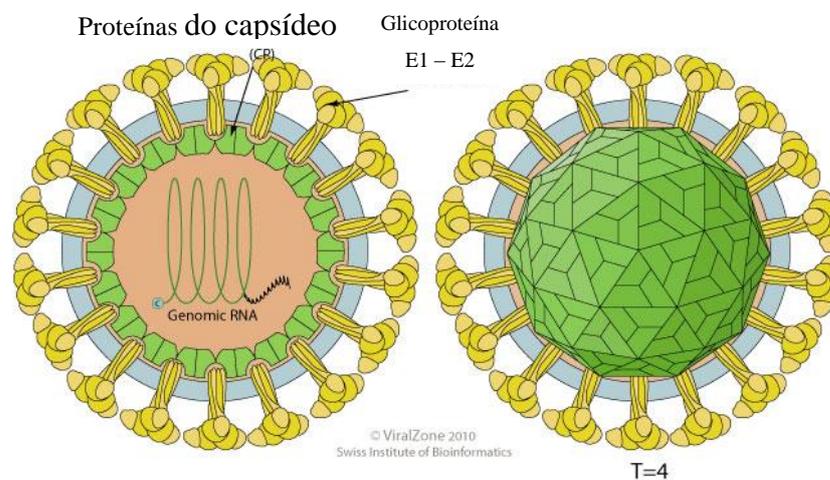
Em dezembro de 2004, de um total de 192 países-membros da OMS, 109 incluíram a vacina contra caxumba em seus calendários nacionais de imunização. Em 105 países, incluindo o Brasil, é utilizada a vacina tríplice viral (WHO, 2009).

1.5 RUBEÓLA

1.5.1 Doença e agente etiológico

O agente etiológico da rubéola pertence à família *Togaviridae* do gênero *Rubivirus*. Esse vírus apresenta um RNA genômico de fita simples e de polaridade positiva, com diâmetro entre 60 e 70 nm. O RNA está circundado por um nucleocapsídeo de simetria cúbica, composto de múltiplas cópias da proteína C vírus-específica. Exceto pelo envelope complexo de camada dupla e lipídica, derivada da célula hospedeira, o vírus da rubéola é composto por três proteínas, onde duas são implantadas no envelope sob forma de projeções (glicoproteínas E1 e E2) e a proteína C que compõe o capsídeo (Figura 7) (PURGACHEV et al.,1997; PLOTKIN & REEF, 2004; BANATVALA & BROWN, 2004).

Figura 7. Estrutura esquemática do vírus da rubéola



Fonte: Site da Viralzone

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/626.html

A rubéola é uma doença infecto-contagiosa muito comum no período da infância, mas que também pode ocorrer em adultos não vacinados ou que não tiveram a doença quando crianças. Normalmente, as infecções por estes vírus produzem imunidade permanente. A transmissão ocorre de pessoa a pessoa por via respiratória. O indivíduo doente, ao respirar, lança no ambiente o vírus existente nas secreções nasais e garganta.

O sintoma inicial da rubéola ocorre entre 16 e 20 dias após exposição ao vírus e geralmente consiste no aparecimento de erupções máculo-papulares, primeiramente na face e alastrando-se para o restante do corpo (LEE & BOWDEN, 2000). Manifestações clínicas em crianças são leves ou ausentes, mas podem ser mais severas em adultos, que desenvolvem febres e mal-estar associados com a viremia e linfadenopatia antes do desenvolvimento das erupções cutâneas. Outros sintomas, como dor de garganta, cefaleia, tosse e conjuntivite também podem ocorrer (BEST, 2007).

A doença tem um período de incubação de aproximadamente 14 dias, podendo variar de 12 a 21 dias. A viremia ocorre durante cerca de 7 dias antes do aparecimento da erupção cutânea, que desaparece quando a resposta imune humoral começa a se desenvolver. As complicações mais comuns são dores nas articulações, que acometem até 70% das mulheres adultas infectadas, mas são pouco frequentes em crianças pré-puberdade e pessoas do sexo masculino (BEST, 2007).

A rubéola em mulheres grávidas é uma doença grave, podendo promover aborto espontâneo e anomalias congênitas. Existe mais de 80% de risco de ocorrência de defeitos congênitos quando a infecção viral é adquirida nas primeiras 12 semanas de gravidez (1º trimestre) (BEST, 2007). Os efeitos da infecção por rubéola na gravidez são imprevisíveis, podendo variar de um nascimento normal, aborto espontâneo, morte logo após o nascimento ou até ao nascimento com anomalias simples ou combinadas, como danos ao sistema nervoso central, levando ao retardo do crescimento físico e mental; microcefalia, encefalite; hepatomegalia; malformações cardíacas; pneumonia; defeitos oculares e auditivos (WEBSTER, 1998; MILLER, 2002; STRATEN & TYRING, 2002). Entre os danos mais comuns da Síndrome da Rubéola Congênita (SRC) podemos citar a deficiência auditiva, defeitos oculares (catarata, glaucoma congênito ou retinopatia pigmentar) e malformações cardíacas (BEST, 2007).

1.5.2 Aspectos epidemiológicos da rubéola

Uma pandemia da rubéola teve início na Europa entre 1962 e 1963 e nos Estados Unidos entre 1964 e 1965. Entre os norte-americanos ocorreram cerca de 12,5 milhões de casos com 11.000 óbitos fetais; cerca de 20.000 recém-nascidos nasceram com mal-formações compatíveis com a SRC; 11.000 com surdez; 3.500 com cegueira; 1.800 com retardo mental e 2.100 vieram a falecer no período neonatal. Estima-se que o custo desta epidemia foi de

aproximadamente dois bilhões de dólares, o que a torna uma das maiores epidemias da doença já registrada. (HINMAN et al., 2003).

Como consequência dessa epidemia, em 1966, a rubéola e a SRC tornaram-se doenças de notificação compulsória nos Estados Unidos. Deste modo conseguiu-se estabelecer o registro de casos e o monitoramento dinâmico da rubéola e SRC em razão das estratégias adotadas. Tais registros apontam o ano de 1969 como o de maior número de casos: 57.686 (CDC, 2000).

A incidência da rubéola até o ano de 1968 era de 24,4 casos/100.000 habitantes, sendo crianças de 5 a 9 anos as mais atingidas, com 101,3 casos/100.000 habitantes (PREBLUD et al., 1980). Entre 1969 e 1988, houve redução de 99% na incidência da rubéola. Este grande decréscimo foi resultado direto das estratégias adotadas para controle da rubéola que foi acompanhada pela redução na incidência da SRC, uma vez que durante a epidemia de 1964, tal incidência era de 16 casos/100.000 nascidos vivos, caindo para 2,7 casos/100.000 nascidos vivos, em 1969 (LINDEGREN et al., 1991; PREBLUD et al., 1980).

Nos anos de 1980 e início de 1990, as estratégias de vacinação contra a rubéola nas Américas evoluíram rapidamente (HINMAN, 2007). A liderança foi tomada pelos países de língua inglesa do Caribe, que incluíram a vacina contra rubéola em seus esforços para eliminar o sarampo. A estratégia do Caribe foi eficaz e incluía dois componentes principais: (a) a vacinação em massa em ambos os sexos, com idade de até 40 anos, com a vacina dupla viral ou tríplice viral, para fornecer proteção e diminuição do risco de mulheres grávidas se infectarem com o vírus da rubéola; (b) a introdução da vacina contra rubéola no calendário regular de imunização das crianças e jovens (HINMAN, 2003).

No Brasil, como estratégia de controle, as campanhas de vacinação para implantação nacional da vacina tríplice viral ocorreram de forma gradativa em unidades federadas isoladas. O primeiro a promover a vacinação foi o estado de São Paulo, em 1992. Logo depois veio o Distrito Federal e, nos anos seguintes, os demais estados. O processo foi completado apenas em 2000. Inicialmente as campanhas de vacinação foram destinadas às crianças de 1 a 11 anos de idade, realizadas de modo gradativo e posteriormente às mulheres em idade fértil (BRASIL, 2003a).

Desde 1997, as recomendações da OPAS têm priorizado o fortalecimento das ações de prevenção e controle da rubéola e SRC. A maioria dos países das Américas incorporou a vacina tríplice viral nos programas de imunização a partir dos 12 meses de idade, estratégia

recomendada para a população de 1 a 4 anos (CASTILLO-SOLÓRZANO et al., 2003; QUADROS, 2008).

Assim, como o controle da ocorrência da SRC é um dos objetivos do PNI, a vigilância da rubéola foi integrada com o sarampo em 1996 decaindo a morbidade desde o início da vacinação da faixa etária de 1 a 11 anos. Em 2000, as ações se voltaram também para a SRC, especialmente com a implantação - em 2001 e 2002 - da campanha de vacinação contra a rubéola para mulheres em idade fértil. Aproximadamente 29 milhões de mulheres foram imunizadas, visando o controle imediato da ocorrência da SRC (BRASIL, 2003a).

A vacina tríplice viral é a única forma de prevenir a ocorrência destas doenças na população, pois o risco permanente de indivíduos suscetíveis contraírem as doenças deve-se a permanências da circulação dos respectivos vírus em várias regiões do mundo, onde o controle destas doenças ainda não foi estabelecido.

1.5.3 Desenvolvimento da vacina contra rubéola

O perfil epidemiológico da doença desencadeou a necessidade do desenvolvimento de vacinas. Em 1962, o primeiro modelo de vacina contra a rubéola foi desenvolvido por Meyer, Parkman e Hobbins, a partir de vírus vivo proveniente da cepa HPV 77, a qual não apresentou reatogenicidade e foi eficaz na imunogenicidade. No entanto, ainda eram necessários outros testes a fim de comprovar sua eficácia (MEYER et al., 1969). Em 1966, ocorreu com êxito o desenvolvimento de uma cepa atenuada do vírus da rubéola para uso em vacina. Após o isolamento do vírus da rubéola em culturas de células, a atenuação foi obtida por uma série de passagens em diferentes linhagens celulares, resultando em várias cepas vacinais (KRUGMAN, 1967).

Entre 1965 e 1967, diversas cepas vacinais de vírus atenuado da rubéola foram desenvolvidas e alcançaram testes clínicos, como a CENDEHIL, além das cepas HPV 77/D12, HPV 77/D5, e algumas cepas japonesas, como a DCRB19, MATSUBA, MATSUURA, TAKAHASHI e TO-336. Em 1969 e 1970, a vacina contra rubéola passou a ser usada comercialmente na Europa e Estados Unidos, com grande impacto na epidemiologia da rubéola e da SRC (CHANTLER et al., 2001; PLOTKIN & REEF, 2004). Até 1979, a cepa HPV77/DE5 era predominantemente usada na América do Norte, quando acabou por ser substituída pela cepa vacinal RA27/3, que foi atenuada após passagens em células de rim de embrião humano, seguida por passagens em fibroblastos de células diplóides humanas WI-38

(CHANTLER et al., 2001). Em 2003, a GSK transferiu para Bio-Manguinhos a cepa Wistar RA27/3 (“rubella abortus, 27^a. Amostra, terceiro explante”), como ficou conhecida a cepa RA27/3, após trabalho desenvolvido por Plotkin, no Wistar Institute, Filadélfia (GSK, 2003). Nesse mesmo ano, a grande maioria dos países e territórios das Américas introduziu a vacina dupla viral ou a tríplice viral em seus programas nacionais de imunização infantil (QUADROS, 2008). O uso da vacina contra rubéola é recomendada pela OMS em todos os países com bom funcionamento dos programas de imunização infantil, onde a redução ou eliminação da SRC é considerada uma prioridade da saúde pública.

1.6 VACINA TRÍPLICE VIRAL

As vacinas combinadas constituem-se da mistura de dois ou mais antígenos diferentes. A formulação destes imunobiológicos pode conter micro-organismos atenuados, micro-organismos inativados, substâncias produzidas por eles e frações antigênicas. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

No caso da tríplice viral, a vacina é constituída da mistura dos vírus vivos atenuados do sarampo, caxumba e rubéola, apresentados sob a forma liofilizada. A vacina é amplamente utilizada para a imunização de crianças em certas regiões do mundo, devido às suas vantagens sobre as vacinas individuais. Na tentativa de aumentar a cobertura vacinal, as vacinas combinadas são de grande utilidade, uma vez que aumentam adesão, reduzem custos e produzem resposta imune eficaz de forma simultânea para as três doenças, o que facilita enormemente a implementação de estratégias vacinais (DECKER & EDWARDS, 1999).

1.6.1 Produção e controle de qualidade da vacina sarampo, caxumba e rubéola no Brasil

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos – fundado em maio de 1976, é a unidade técnica-científica da Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ responsável pela produção de vacinas, biofármacos e kits de diagnósticos. A vacina polissacarídica contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos A e C foi a primeira a ser produzida por Bio-Manguinhos. Toda a tecnologia de produção e controle de qualidade da vacina foi absorvida através do acordo assinado com o Instituto Mérieux da França. Mais tarde, em 1979, Bio-Manguinhos incorporou a produção das vacinas contra Febre Amarela, Cólera e Febre Tifóide, até então realizadas pelo Instituto Oswaldo Cruz – IOC (BIO-MANGUINHOS , 2003).

No Brasil, os fabricantes nacionais exercem papel relevante no processo produtivo das vacinas, uma vez que garantem o fornecimento a preços mais baixos dos imunobiológicos utilizados no PNI. Neste cenário, Bio-Manguinhos tornou-se o maior laboratório federal a fornecer vacinas. Muito deste fato deve-se a uma bem sucedida estratégia de transferência de tecnologia. Hoje Bio-Manguinhos responde por mais de 50% da produção nacional das doses de vacinas utilizadas pelo MS, conforme demonstrado na Figura 1. Esse tipo de parceria público-privada, principalmente no âmbito da cooperação tecnológica e de produção, tem sido fortalecida e incentivada pelo governo federal (BIO-MANGUINHOS, 2002).

Como exemplo da estratégia de parcerias é possível apontar a produção da vacina sarampo, iniciada em 1982 através de cooperação tecnológica com o Instituto Biken da Universidade de Osaka, no Japão (BENCHIMOL, 2001). Desta forma, pela primeira vez no Brasil, foi implantada uma complexa tecnologia de cultura de tecidos e liofilização em escala industrial, abrangendo todo o ciclo de produção de uma vacina viral de uso humano.

Desde outubro de 2003, Bio-Manguinhos está em processo de assimilação tecnológica para produção da vacina tríplice viral junto à empresa GSK. A transferência de tecnologia da vacina foi dividida em 4 fases. Na 1ª fase, o produto acabado foi enviado pela GSK para ser rotulado em Bio-Manguinhos (*naked vials*). Na 2ª, os concentrados virais designados de *Bulks* virais, de sarampo, caxumba e rubéola são fornecidas pela GSK para formulação, envase, liofilização, embalagem e rotulagem da vacina para a comercialização do produto por Bio-Manguinhos. Nessa fase, os lotes de consistência devem ser avaliados em testes clínicos para posterior registro. Após, ocorrerá a produção do vírus semente e do banco mestre de células para obtenção dos vírus semente de trabalho, e a produção dos lotes de viabilidade e consistência do produto, testes clínicos e registro do produto final junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (GLAXOSMITHKLINE, 2003; BIO-MANGUINHOS, 2003). Depois desta terceira fase será definida a completa nacionalização da produção da vacina por Bio-Manguinhos, atingindo-se assim a autossuficiência nacional nesse setor e concluindo-se o processo.

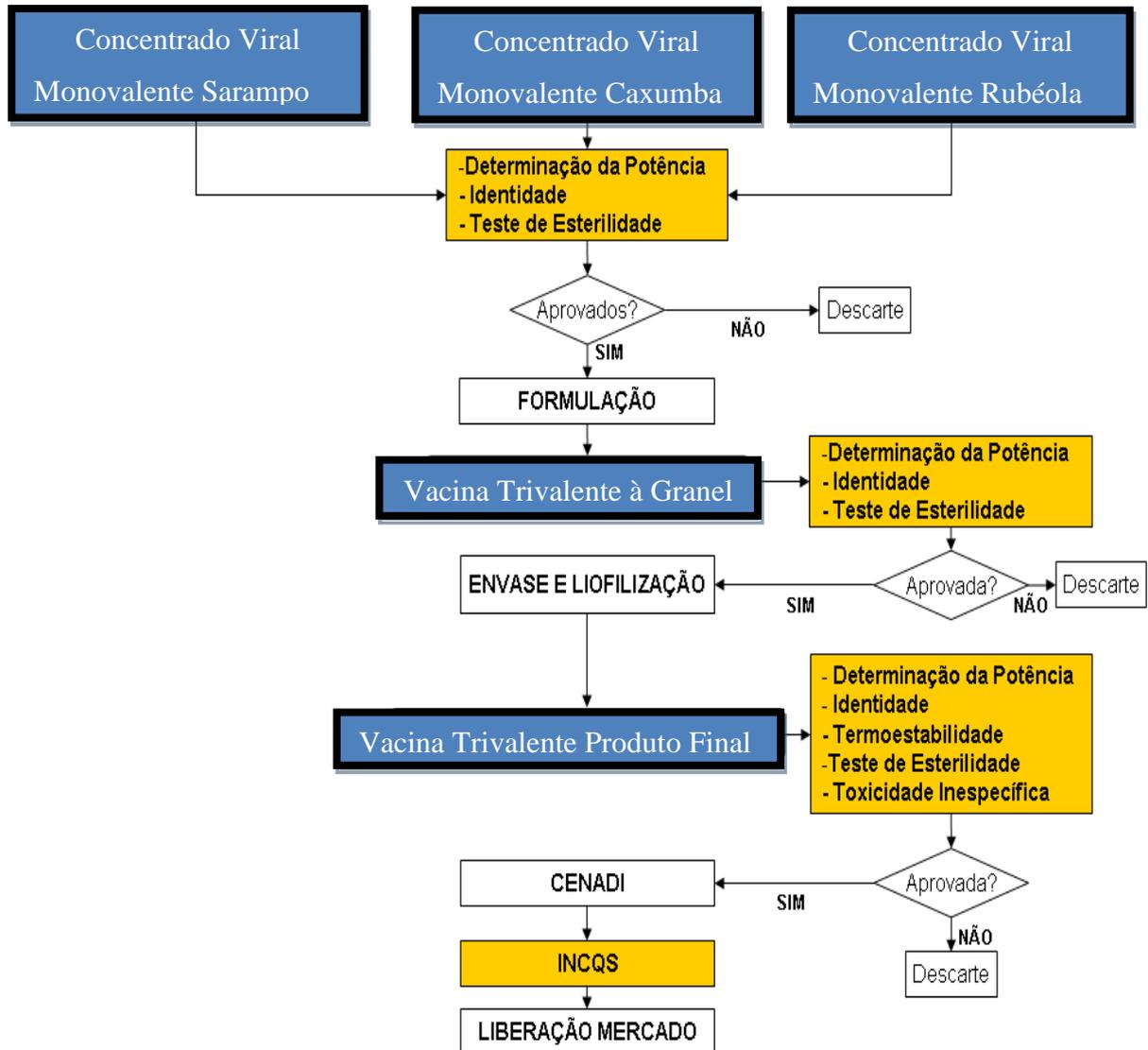
A vacina tríplice viral, fornecida por Bio-Manguinhos é uma preparação mista liofilizada, na apresentação em frascos de 10 doses. Cada dose de vacina (0,5 mL) contém como ingredientes ativos, no mínimo, 3,0 log₁₀ CCID₅₀ (dose 50% infectante em cultura de células) de vírus vivo atenuado do sarampo (cepa Schwartz), 3,7 log₁₀ CCID₅₀ de vírus vivo atenuado da caxumba (cepa RIT4385 - derivada da cepa Jeryl Lynn) e 3,0 log₁₀ CCID₅₀ de vírus vivo atenuado da rubéola (cepa Wistar RA27/3). Outros ingredientes estabilizadores,

tais como sulfato de neomicina, albumina humana, lactose, sorbitol, manitol e aminoácidos, são adicionados durante a formulação da vacina e têm a função de proteger o produto durante a liofilização e assegurar sua estabilidade. No momento da utilização, a vacina liofilizada deve ser reconstituída com água para injetáveis estéril, considerada como diluente, o qual é fornecido pelo fabricante.

A produção da vacina trivalente se inicia pela obtenção, separadamente, de cada concentrado viral. Os componentes de sarampo e caxumba são produzidos em culturas primárias de fibroblastos de embriões de galinha, enquanto que a suspensão de rubéola é obtida pela propagação do vírus em células diplóides MRC-5 (células não-transformadas de origem humana). Estas células são amplamente usadas como substrato para a preparação de vacinas pediátricas e são aceitas como a linhagem celular mais segura e de melhor caracterização para produção de vacinas.

A preparação do concentrado viral final da vacina trivalente consiste essencialmente da combinação dos três ingredientes ativos (concentrado viral monovalente de sarampo, caxumba e rubéola) e formulação com estabilizadores. A quantidade de cada concentrado viral usado é calculada para que o produto final após o envase obtenha os títulos necessários após liofilização. Durante todas as etapas de produção, há monitoramento do produto quanto à sua qualidade e dos controles químicos e biológicos requeridos pelas normas nacionais e ou internacionais vigentes. O Departamento de Qualidade (DEQUA) de Bio-Manguinhos realiza todos os ensaios preconizados para a liberação da vacina tríplice viral, nos quais se incluem: toxicidade inespecífica, esterilidade, potência, termoestabilidade, identidade, pH, umidade residual e aspecto (Figura 8).

Figura 8. Fluxograma de produção e controles microbiológicos e biológicos da vacina tríplice viral



De modo a atender às normas de fabricação e controle, é imprescindível a existência de um sistema de gestão da qualidade que possa, entre outros fatores, garantir a qualidade dos resultados dos métodos analíticos utilizados na rotina de controle de produtos intermediários e produtos finais. A confiabilidade dos resultados é determinada através de diversos meios, tais como: a validação de métodos, rastreabilidade através de padrões certificados, analistas qualificados e treinados e equipamentos calibrados.

No que diz respeito à imunogênica de vacinas, a determinação da concentração viral ou teste de potência, para vacinas de vírus vivo atenuado é considerado o aspecto mais crítico. No caso da vacina tríplice viral, a determinação da concentração viral ou potência é realizada

desde os produtos intermediários – concentrado viral monovalentes de sarampo, caxumba e rubéola – até o produto final. Além disso, em todas essas determinações, é mandatória a utilização de uma vacina de referência, conforme requerimento da OMS e da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 17/2010, para validar o ensaio. Atualmente, o LACOM utiliza uma vacina tríplice viral (unidose) disponibilizada pela GSK para avaliar os lotes envasados em Bio-Manguinhos.

1.6.2 Aspectos regulatórios

O sarampo, a caxumba e a rubéola são doenças transmitidas por vírus que, apesar de graves, são facilmente preveníveis através da imunização (WHO, 2012a). Para que o PNI alcance a meta de erradicar o sarampo, caxumba e rubéola é fundamental o uso de lotes de tríplice viral com qualidade garantida pelos produtores e controlada pelo INCQS. (BRASIL, 2003a).

A ANVISA é o órgão responsável pelo registro de medicamentos, pela autorização de funcionamento dos laboratórios farmacêuticos e demais empresas da cadeia farmacêutica, e pela regulação de ensaios clínicos e de preços, por meio da Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED). A responsabilidade pela inspeção de fabricantes e pelo controle de qualidade dos medicamentos é compartilhada com os estados e municípios, que realizam a vigilância pós-comercialização, ações de farmacovigilância e a regulação da promoção de medicamentos (TEMPORÃO; NASCIMENTO; MAIA, 2005).

Medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos estão sujeitos à Vigilância Sanitária, de acordo com a legislação sanitária vigente, instituída primeiramente no Brasil pela lei 6.360/76, alterada pelas leis 6.480/77; 9.787/99; MP 2.190-34/2001; 10.669/2003 e mais recentemente pela lei 10.742/2003 (BRASIL, 2003b).

Para que seja possível a comercialização de um medicamento, várias etapas devem ser respeitadas. No Brasil, desenvolvimento, registro, fabricação e comercialização, são amparados por atos regulatórios editados pela ANVISA. A RDC 55/2010, estabelece requisitos mínimos para registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos no país, visando garantir a qualidade, segurança e eficácia desses medicamentos. Considerando a origem biológica dos princípios ativos e a diversidade dos processos tecnológicos utilizados para a produção, todas as solicitações de registro de produtos biológicos novos são analisadas de acordo com os requisitos estabelecidos nessa RDC e pela legislação sanitária vigente

(BRASIL, 2010b). Entretanto as alterações pós-registro e revalidações de registro para produtos biológicos terminados são regulamentadas pela RDC 315/2005 (BRASIL, 2005c).

A RDC 17/2010, que revogou a RDC 210/2003, correlacionou os conceitos de garantia da qualidade, de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de controle de qualidade, e contemplando-os no gerenciamento da qualidade, enfatizando as suas relações e sua importância para a fabricação de medicamentos (BRASIL, 2010a). A RDC 17/2010 possui, ainda, o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos a serem obedecidos na fabricação de medicamentos para padronizar as inspeções sanitárias na verificação do cumprimento das BPF de medicamentos de uso humano. Todas as empresas envolvidas na fabricação de um produto biológico novo ou produto biológico devem ser detentoras do certificado BPF emitido pela ANVISA.

O INCQS por sua vez, é a autoridade nacional, vinculada ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, responsável pela manutenção e estabelecimento dos parâmetros de segurança, qualidade e eficácia dos lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e no exterior, bem como o ambiente e serviços vinculados (BRASIL, 2008). Nesse contexto, cabe ao INCQS avaliar todos os lotes quanto às suas especificações, de acordo com as normas oficiais e metodologias validadas apresentadas pelo detentor do registro e aprovadas pela Anvisa. No procedimento para a liberação dos lotes pode ser considerada a análise dos processos e protocolos de produção dos imunobiológicos emitidos pelo produtor e controle de qualidade e/ou análise laboratorial antes da liberação do produto para o mercado (NETTO et al., 2010).

Na década de 1980, a Comunidade Europeia (CE) iniciou a harmonização dos requisitos regulatórios e o desenvolvimento de um mercado único de produtos farmacêuticos. O sucesso alcançado na Europa demonstrou que a harmonização era viável. Ao mesmo tempo, houve debates entre Europa, Japão e os EUA sobre as possibilidades de harmonização. No entanto, somente na Conferência da OMS de Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA), em 1989, foi discutida a harmonização internacional de requerimentos técnicos para registro de medicamentos para uso humano, sendo criada assim a International Conference on Harmonisation (ICH) (<http://www.ich.org/about/history.html>).

Com base nessa tendência de harmonização global, o INCQS e os laboratórios nacionais produtores de imunobiológicos têm se mobilizado na atualização e harmonização de métodos e materiais de referência.

Na atualidade, para liberação da vacina tríplice viral, o fabricante e o INCQS se baseiam nas especificações de qualidade descritas na Farmacopéia Brasileira, OMS e Farmacopéia Européia.

1.7 MATERIAIS DE REFERÊNCIA

Os materiais de referência (MRs) são utilizados nos laboratórios para o controle das análises químicas, físico-químicas e microbiológicas, na calibração de equipamentos, acompanhamento e avaliação de analistas, controle e atribuição de valores a materiais e desenvolvimento de metodologias. A ISO reconhece duas classes de materiais de referência, sendo 'materiais de referência certificados' (MRCs) e 'materiais de referência' (MRs).

Segundo a ABNT ISO GUIA 30:2011 e o Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM:2012), os MRs são materiais suficientemente homogêneos e estáveis no que diz respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que tenham sido estabelecidos para atender de forma apropriada o uso para o qual estejam destinados em um processo de medição. O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) destaca que os materiais de referência são importantes ferramentas na determinação de muitos aspectos da qualidade de medição e são utilizados para fins de validação de método, calibração, estimativa da incerteza de medição, treinamento e para fins de Controle de Qualidade Interno (CQ) e Garantia de Qualidade Externa (GQ).

Na ABNT ISO GUIA 30:2000, o MRC é descrito como um material de referência, acompanhado por certificado, com um ou mais valores de propriedade, habilitado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual valores de propriedades são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido. Em muitos casos, os MRC são apropriados para as comparações de padrões nacionais de medição entre laboratórios (ABNT ISO GUIA 33:2002). Segundo a ABNT ISO/IEC 17025, a importância dos MRC se deve, principalmente, à garantia da rastreabilidade das medições, validação de métodos, incerteza de medição e controle de qualidade. Portanto, os laboratórios devem usar materiais de referência certificados, provenientes de um fornecedor competente, de forma a dar uma caracterização confiável, física ou química, de um material.

O padrão de referência primário é aquele amplamente reconhecido por possuir as qualidades apropriadas dentro de um contexto específico e cujo conteúdo declarado é aceito

sem requerer comparação com outras substâncias. No padrão de referência secundário ou material de referência de trabalho (MRT), as características são atribuídas e/ou calibradas por comparação com uma substância de referência primária. O grau de caracterização e análise de uma substância de referência secundária pode ser menor do que para uma substância de referência primária (WHO, 2005).

Os MRT são produzidos no próprio laboratório e requerido para uso no dia a dia de acordo com o “Guideline for the *in-house* production of reference materials” (LGC/VAM/1998/40). A elaboração e a produção de MRT devem ser realizadas, considerando-se as necessidades dos usuários - laboratórios envolvidos - e as limitações existentes quanto à manutenção das características do MR para todos os testes envolvidos.

1.7.1 Materiais de referência para produtos biológicos

Um teste biológico é um procedimento laboratorial para a estimativa da natureza ou potência de um material, por meio da reação que se segue à aplicação de alguns elementos de um sistema vivo, como animais de laboratório e células suscetíveis, receptores e enzimas. A potência do material a ser testado é frequentemente definida em Unidades Internacionais ou, em algumas circunstâncias, pode ser definida pelo Sistema Internacional de Unidades (SI) (WHO, 2004).

Os padrões biológicos de referência são utilizados na fase de qualificação ou validação de métodos de ensaio para assegurar a uniformidade na designação da potência ou atividade de preparações biológicas, incluindo vacinas. Estes são necessários para garantir a consistência de produção e minimizar os desvios dos ensaios. Assim, os procedimentos detalhados para a produção e caracterização foram estabelecidos no documento “Recommendations for the Preparation, Characterization and Establishment of International and Other Biological Reference Standards, WHO 2004” (“Recomendações para a Preparação, Caracterização e Estabelecimento de Internacional e Outros Padrões de Referência Biológica, OMS 2004”). Entretanto, estes requisitos de alto nível para um MR biológico internacional são aplicados igualmente aos padrões biológicos secundários. Existem, contudo, diferenças importantes entre as normas internacionais e padrões biológicos secundários que podem permitir desvios destes requisitos (WHO, 2004).

De modo a adequar as normas para o desenvolvimento de materiais de referência secundário, mais recentemente, a OMS (2011) elaborou o documento “WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines” que contém orientações gerais sobre os princípios da preparação de padrões secundários para vacinas e explica em detalhes as questões que devem ser consideradas na elaboração de quaisquer normas específicas, considerando caso a caso (WHO, 2011c).

1.7.1.1 *Material de referência internacional (MRI)*

O material de referência é obtido após a realização de um estudo colaborativo internacional e que se estabelece com a finalidade de unificar em todo o mundo a terminologia e a transmissão de uma unidade de medida (WHO, 2011c).

Os padrões internacionais de referência biológica são estabelecidos pela OMS e compreendem materiais de composição complexa, que requerem ensaios biológicos ou imunológicos para caracterização. Os ensaios utilizados são geralmente comparativos e não de valor absoluto, e o padrão de referência é fundamental na definição da natureza qualitativa e a magnitude relativa da resposta biológica ou imunológica, pois a mesma depende de uma variedade de condições. O valor de atribuição pela Organização Mundial de Saúde é em termos de uma Unidade Internacional (UI) ou outra unidade adequada. A unidade é atribuída a um primeiro padrão internacional de forma arbitrária, após a conclusão de um estudo colaborativo internacional (WHO, 2011c).

O resultado da medição da incerteza, como definida pela ISO 17511, tem sido completamente satisfatório em dispositivos para diagnóstico *in vivo*. No entanto, em padrões de referência biológicos com valor arbitrário em UI, tal valor não é fornecido. Em estudos colaborativos que utilizam métodos diferentes, as diferenças nas estimativas de potência do material podem ser evidentes (ISO 17511, 2003). Além disso, a natureza biológica dos ensaios significa que os mesmos métodos podem diferir em muitos recursos. Na ausência de um método de referência, as suposições sobre um verdadeiro valor de potência do material, ou uma probabilidade de distribuição de valores podem não ser válidas. Com todos os componentes de variabilidade observados em um estudo colaborativo, pode não ser adequado citar um valor único da incerteza, pois esse valor não reflete a variabilidade entre as ampolas do padrão internacional. Os documentos que acompanham padrões de referência devem

conter uma orientação do coeficiente de variação (CV) da preparação estudada para que seja conhecida a variação entre as ampolas (WHO, 2005).

Geralmente, são estabelecidas normas de referência da OMS para analitos para os quais nenhum procedimento de medição de referência ("método de referência") tenha sido convencionado ou estabelecido. Tais padrões são considerados como padrões primários, de ordem mais elevada, e são utilizados para calibração de padrões nacionais e outros padrões secundários (WHO, 2011c).

Os padrões biológicos de referência internacionais não são necessariamente de elevada pureza. No entanto, quando uma preparação é substituída por outra, todo esforço é feito para garantir que a atividade biológica representada por uma UI permaneça constante, mesmo que a atividade específica da preparação seja alterada.

O *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) tem a missão de assegurar a qualidade dos padrões biológicos no mundo. Nesse sentido, o NIBSC, segundo normas internacionais, regula a distribuição e armazenamento de diferentes MRI da OMS como parâmetros de qualidade do produto, tal como o estabelecimento do MRT pelo produtor. (<http://www.nibsc.ac.uk/products.aspx>).

Padrões biológicos de referência internacionais são geralmente disponíveis em quantidades limitadas e destinam-se a serem usados para a caracterização e calibração de preparações secundárias, sejam regionais ou aquelas que serão direcionadas para uso na rotina do laboratório (WHO, 2011c).

1.7.1.2 *Material de referência secundário ou de trabalho (MRT)*

Todos os padrões biológicos ou materiais de referência têm certas características comuns essenciais à sua função, tais como: (a) devem ser de um único lote de recipientes idênticos, preparado utilizando um processo e excipientes apropriados para o produto; (b) as características imunológicas do padrão biológico devem ser comparáveis com os produtos a serem testados para atender aos critérios de validade para ensaios biológicos; (c) uma unidade formalmente definida, atribuída com base em estudos adequadamente projetados, utilizando a metodologia de análise apropriada e (d) devem ser estáveis no que diz respeito à medida definida (WHO, 2011c).

O MRT é destinado à utilização regional, nacional ou na rotina laboratorial e devem ser calibrados com o MRI. Desta forma, atendendo às normas estabelecidas (OMS e ANVISA), o laboratório produtor (Bio-Manguinhos), utilizando um MRI originário do NIBSC, deve estabelecer e validar um material de referência de trabalho (MRT) para ser utilizado na rotina como controle dos ensaios para a determinação de potência da vacina tríplice viral nos laboratórios de controle de qualidade interno e no laboratório nacional de controle (WHO, 2006).

1.7.2 Planejamento de um lote candidato a material de referência de trabalho da vacina tríplice viral para o teste de potência

Um fator determinante para o sucesso do desenvolvimento de um MRT é o bom planejamento através de um projeto. As atividades para o desenvolvimento do MRT só devem ser iniciadas após terem sido estabelecidos alguns parâmetros fundamentais tais como: definição do material de referência candidato, condições de armazenamento, nível de incerteza de medição desejado, modelos de estudos a serem utilizados, assim como as metodologias, equipamentos e reagentes necessários. É nessa etapa que devem ser definidos quais modelos experimentais serão adotados para os estudos que serão a base do MRT: (i) caracterização da propriedade, (ii) estudo de homogeneidade e (iii) estudo de estabilidade (ABNT ISO Guia 35:2012).

Um dos primeiros e mais importantes itens a serem definidos na etapa de planejamento é a quantidade de amostra necessária, uma vez que essa deve ser suficiente para realizar todos os estudos citados (ABNT ISO Guia 35:2012; ZELENY et al., 2009). Em seguida, é preciso que sejam definidas com clareza as condições adequadas de embalagem, manuseio e armazenamento do material candidato à MRT, de forma que este mantenha suas características físicas, químicas e microbiológicas e ao mesmo tempo não ofereça risco ao manipulador. Portanto, devem ser conhecidas as recomendações sobre o candidato à MRT fornecidas pelo fabricante, compêndios oficiais, fichas de segurança ou literatura científica (ABNT ISO Guia 35:2012; ABNT ISO Guia 34:2009).

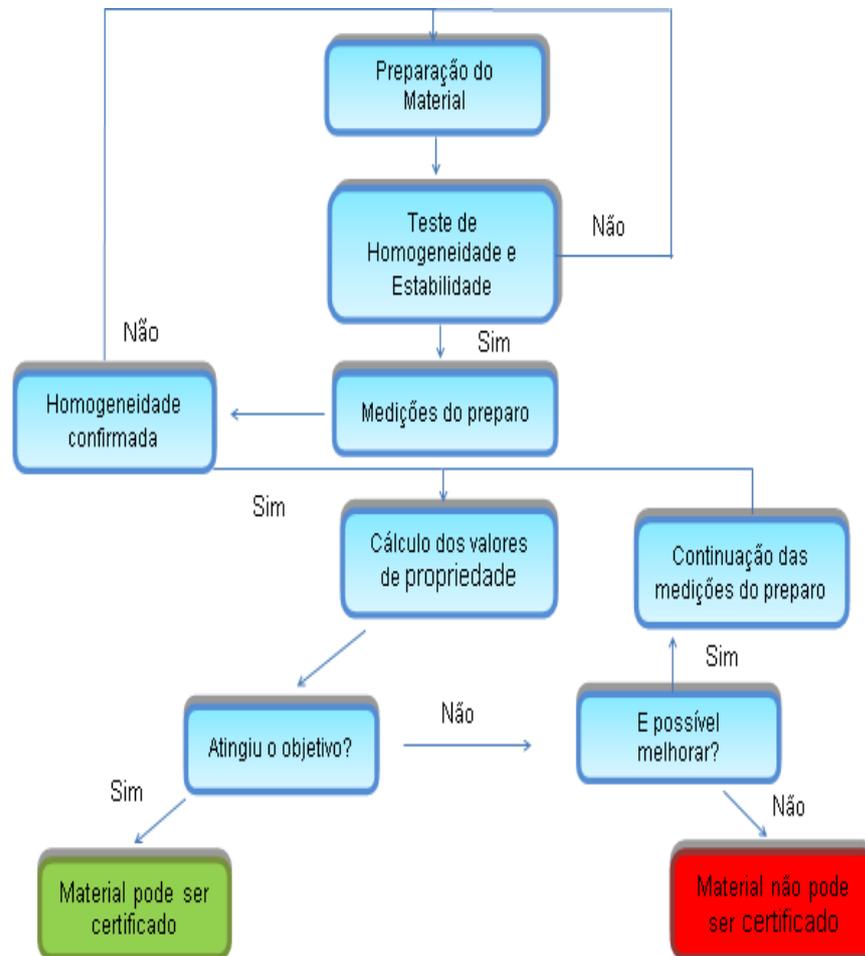
O prazo de validade e as condições recomendadas de armazenamento e transporte devem ser respeitados. Por essas razões, as condições de manuseio e armazenamento

assumem papel relevante na capacidade do MRT de auxiliar na garantia da rastreabilidade dos resultados das medições ao Sistema Internacional de Unidades (ABNT ISO Guia 33:2002).

Após o planejamento, segue o desenvolvimento do projeto e, nesta etapa, o candidato a MRT deve ser preparado, analisado e armazenado de acordo com as condições e métodos estabelecidos no planejamento. O candidato a MRT é submetido aos ensaios analíticos para avaliação de sua qualidade, ensaio de caracterização, estudo de homogeneidade e estudo de estabilidade de curta e longa duração conforme esquematizado na figura 10 (ABNT ISO Guia 35:2012; COTTA, 2007; ISHIKAWA, 2009).

De acordo com ILAC (1998), os produtores de MRT devem criar, implementar e manter um sistema de gestão da qualidade adequado à extensão das suas atividades, incluindo o tipo, faixa e magnitude do MRT produzido em cumprimento a tais quesitos. Deve ser incluído na política de qualidade também o compromisso de produzir o MRT de acordo com as definições das normas vigentes, onde valores de propriedade são assegurados utilizando técnicas estatísticas aceitáveis.

Figura 9. Esquema experimental do preparo do material de referência



Fonte: Adaptado do ISO GUIA

1.7.3 Caracterização de material de referência de trabalho

A caracterização de um MRT é o processo de determinação de valores de propriedade como parte da certificação do processo. Na certificação do lote produzido, a caracterização refere-se a valores próprios do lote (ABNT ISO GUIA 35:2012).

De acordo com a ABNT ISO Guias 30-35, os MRT são caracterizados com relação à homogeneidade, estabilidade e o(s) valor(es) de propriedade certificado(s). Para o Controle de Qualidade Interno (CQI), o último requisito pode ser relevado, porém, a homogeneidade e estabilidade adequadas são considerados critérios essenciais (INMETRO, 2010).

1.7.3.1 *Estudo de homogeneidade*

O estudo de homogeneidade visa demonstrar, na prática, se o candidato a MRT é suficientemente homogêneo em relação a uma determinada propriedade, ou seja, se a diferença entre os valores desta propriedade entre diversas porções do material é desprezível se comparada com um dos componentes de incerteza do material. A preparação e o envase do material devem ser realizados de forma que seja possível obter um material com a maior homogeneidade possível (ABNT ISO Guia 35:2012).

Há duas possibilidades de avaliação da homogeneidade: (i) homogeneidade dentro do frasco (intra-frasco), que dita a menor quantidade de amostra consumida que é representativa do candidato a MRT e para a qual a incerteza estabelecida ainda é válida, e (ii) homogeneidade entre frascos (inter-frasco), que determina a variação entre as unidades do lote. O ponto comum entre as duas modalidades consiste no fato de que ambas devem ser capazes de distinguir a diferença entre a variação do material e a variação das medições e amostragens.

O estudo pode ser conduzido com um modelo de amostragem por modo aleatório, aleatório estratificado ou sistemático (LINSINGER et al., 2001; ZELENY et al., 2009; ABNT ISO Guia 35:2012). Já dentre os modelos experimentais recomendados para o estudo de homogeneidade, há o randômico, randômico estratificado e sistemático. É recomendado que sejam utilizadas 10 a 30 unidades, levando em consideração o tamanho do lote (ABNT ISO Guia 35:2012).

1.7.3.2 *Estudo de estabilidade*

De acordo com ABNT ISO Guia 35:2012, o estudo de estabilidade tem o “objetivo de determinar o grau de instabilidade de um material candidato a MRT ou confirmar a estabilidade do material”. Na prática, esse estudo, além de fornecer informações importantes acerca de possível degradação química e alterações físicas do MRT, serve também para fixar as condições adequadas de armazenamento e transporte, além de ser fonte de dados para calcular a incerteza de medição associada à estabilidade do MRT (LINSINGER, 2001; ZELENY et al., 2009).

Quanto ao planejamento do estudo de estabilidade, este pode ser isócrono ou clássico. O primeiro consiste em expor as amostras progressivamente às condições do estudo com posterior análise simultânea das mesmas, permitindo analisar uma série de amostras sob condições de repetibilidade e obter resultados com baixos desvios e incertezas. O planejamento clássico consiste em um modelo experimental cujas amostras individuais são submetidas simultaneamente às condições do estudo de estabilidade e testadas no decorrer do tempo. Este modelo experimental permite acompanhar a estabilidade do material a cada nova análise, mas é realizado sob condições de reprodutibilidade do laboratório, o que leva a uma incerteza relativamente elevada, devido à variabilidade dos sistemas utilizados (VAN DER VEEN et al., 2001; ABNT ISO Guia 35:2012).

1.7.3.2.1 *Estudo de estabilidade acelerado*

No estudo de estabilidade acelerado, o candidato a MRT é acondicionado em diferentes temperaturas que aceleram sua degradação química, física e/ou biológica. Este estudo deve ser realizado ao menos nos tempos 0, 3 e 6 meses, caso a validade do produto seja superior a 12 (doze) meses podendo durar mais quando as condições ideais de armazenamento têm que ser simultaneamente determinadas, constituindo assim, em uma tentativa de simular e prever o grau de estabilidade/instabilidade do material frente a variações das condições recomendadas para a cadeia de distribuição do MR entre produtor e usuário (BRASIL, 2011).

A incerteza de medição do estudo de estabilidade de curta duração somente será uma fonte de contribuição relevante para a incerteza de medição do candidato a MRT quando a

estabilidade do mesmo for afetada pela condição de transporte, ou seja, se a temperatura e/ou umidade excederem as condições de transporte recomendadas na entrega do material ao usuário. Neste caso, será então possível entrar com um componente extra de incerteza para a propriedade certificada, proveniente do estudo de estabilidade de curto prazo. Na prática, a inclusão da incerteza de estabilidade de curto prazo (u_{sts}) no cálculo de incerteza do candidato a MRC é realizada somente quando u_{sts} é da mesma ordem de grandeza da incerteza do estudo de estabilidade de longo prazo (u_{lts}) (VAN DER VEEN et al., 2001).

1.7.3.2.2 *Estudo de estabilidade de longa duração*

No estudo de estabilidade de longa duração, o candidato a MRT é armazenado sob condições que assegurem a manutenção de todas as suas características, ou seja, que garanta a estabilidade do mesmo durante o armazenamento correto dentro do prazo de validade. Essas condições devem estar bem definidas antes do início do estudo (VAN DER VEEN et al., 2001).

Para produtos com prazo de validade superior a 12 (doze) meses, os testes do estudo devem ser conduzidos ao menos a cada 3 (três) meses no primeiro ano de estocagem, a cada 6 (seis) meses no segundo ano e anualmente após este período. Essa modalidade de estudo requer um número considerável de frascos (unidades), de preferência, é conveniente que mais de um frasco esteja disponível para cada ponto no tempo (BRASIL, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Desde 2004, o Laboratório de Controle Microbiológico de Bio-Manguinhos vem utilizando uma vacina trivalente (sarampo caxumba e rubéola) da GSK - cedida através do acordo de transferência de tecnologia - como MRT nos ensaios para determinação lote a lote da potência da vacina tríplice viral fabricada em Bio-Manguinhos.

Em documentos oficiais, a OMS recomenda que cada produtor estabeleça e verifique o seu MRT frente ao respectivo MRI (WHO, 2011c). Diante do avançado estágio da transferência de tecnologia da vacina sarampo, caxumba e rubéola da GSK para Bio-Manguinhos, a proposta de se estabelecer e implementar um lote de vacina a ser utilizada como MRT para os respectivos componentes, seguindo as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Boas Práticas de Laboratório (BPL), contribuirá para a harmonização dos parâmetros técnicos de controle de qualidade realizados pela Instituição.

Uma vez que o padrão de qualidade exigido tem sido cada vez maior, seja através da intercambialidade do que se é produzido ou mesmo através da personalização de produtos, faz-se necessária a busca pela auto-suficiência do conhecimento nas técnicas produtivas e de medição, correspondendo diretamente aos anseios do mercado. No entanto, para caracterizar uma medição não basta dominar a técnica, sendo necessário, sobretudo, estar provido de sistemas autômatos e confiáveis capazes de garantir um nível mínimo exigível como resultado (WHO, 2006).

A ANVISA em sua Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Vigilância Sanitária propõe como estratégias o desenvolvimento de materiais de referências e a avaliação da conformidade de produtos e processos para suporte ao componente laboratorial das ações de vigilância sanitária (ANVISA, 2011).

Além disso, a necessidade de materiais de referência no controle de qualidade de produtos imunobiológicos é notória e evidente. O avanço e o desenvolvimento de novas metodologias propiciado pelas pesquisas visam à melhoria da caracterização de produtos industrializados. O material de referência é um recurso de alto valor agregado presente em inúmeros produtos dos mais diversos setores da indústria (WHO, 2006). Além disso, os materiais de referência serão primordiais, quando se considera as perspectivas urgentes de harmonização de metodologias entre os laboratórios produtores e o Laboratório de Controle Nacional (INCQS).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer o Material de Referência de Trabalho (MRT_{Bio}) para ser utilizado na rotina da determinação de potência da vacina atenuada de sarampo, caxumba e rubéola na seção de potência do DEQUA/ Bio-Manguinhos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar os parâmetros de processo de produção e controle da qualidade de um lote da vacina sarampo, caxumba e rubéola produzida como candidato MRT ($cMRT_{Bio}$);
- b) Realizar a caracterização do lote candidato quanto à homogeneidade e estabilidade;
- c) Estimar a potência nominal do $cMRT_{Bio}$;
- d) Elaborar certificado de análise com as características do material de referência candidato da vacina Tríplice viral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA DE TRABALHO DA VACINA TRÍPLICE VIRAL

O lote da vacina candidato a MRT_{Bio} foi originário de uma partida de produção de rotina. É uma preparação trivalente liofilizada das cepas de vírus atenuados de sarampo (cepa Schwarz), caxumba (cepa RIT 4385 - derivada da cepa Jeryl Lynn) e rubéola (cepa Wistar RA 27/3), obtida por propagação, em culturas de tecido de ovos embrionados de galinha (caxumba e sarampo) e células diplóides humanas MRC₅ (rubéola). Os concentrados virais monovalentes foram produzidos na GSK (sarampo: AMESAVA062, caxumba: AMUJBVA014, rubéola: ARUBAVA040) e enviados à Bio-Manguinhos para a formulação do produto trivalente. O produto foi avaliado pelo controle de qualidade de modo a verificar se o mesmo atendia as especificações relacionadas no quadro 1.

Quadro 1. Especificação da Vacina tríplice viral

Teste	Especificação
Aspecto	Pastilha compacta, ligeiramente rósea. Após reconstituição: solução rósea
Umidade residual	Máximo de 2,5%
Esterilidade	Ausência de crescimento bacteriano ou fúngico
Identidade para rubéola	Positivo por soroneutralização
Identidade para sarampo	Positivo por soroneutralização
Identidade para caxumba	Positivo por soroneutralização
Potência para rubéola	Mínimo de 3,0 log ₁₀ CCID ₅₀ /dose
Potência para sarampo	Mínimo de 3,0 log ₁₀ CCID ₅₀ /dose
Potência para caxumba	Mínimo de 3,7 log ₁₀ CCID ₅₀ /dose
Termoestabilidade de rubéola	Após 7 dias a 37 °C, não deve perder mais que 1,0 log ₁₀ em relação ao título da vacina conservada em condições adequadas de temperatura
Termoestabilidade de sarampo	
Termoestabilidade de caxumba	
Conteúdo de sulfato de Neomicina	Menor que 25 µg/dose
Toxicidade Inespecífica	Satisfatório se os animais permanecem saudáveis e tiverem ganho de peso

Fonte: Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Européia e OMS.

Após aprovação do produto formulado a granel (PAG), foram realizados o envase e a liofilização, dando origem ao lote identificado como 131VVA002Z, como especificado na árvore genealógica de codificação da vacina (Figura 10). Uma vez avaliado pelo controle de qualidade, os resultados (Anexo 1) demonstraram que o mesmo atendia as especificações, sendo designado para este estudo como cMRT_{BIO}.

Figura 10. Árvore genealógica do lote 131VVA002Z originário do cMRT_{BIO}



O quantitativo disponibilizado para ser utilizado como cMRT_{BIO} foi de 2.000 frascos, que foram armazenados a -20 °C na Seção de Amostragem do DEQUA/Bio-Manguinhos. A quantidade de frascos utilizadas neste estudo está descrito na tabela 1.

Os protocolos de produção deste lote seguiram os critérios de Boas Práticas de Fabricação segundo as normas preconizadas pela “Guidelines release Authorities vaccine (OECD)”.

Cada dose de 0,5 mL do cMRT_{BIO} reconstituído contém não menos que o equivalente a 1.000 CCID₅₀ (dose 50% infectante em culturas de células) vírus do sarampo, 5.000 CCID₅₀ vírus da caxumba e 1.000 CCID₅₀ vírus da rubéola.

Tabela 1. Número de frascos da vacina cMRT_{BIO} utilizadas neste estudo

Ensaio realizado	Número de frascos
Teste de Potência	37
Estabilidade Longa Duração	40
Estabilidade Acelerado	20

4.2 MATERIAL DE REFERÊNCIA INTERNACIONAL

Foram utilizados os seguintes MRI_{NIBSC}, monovalentes, provenientes do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), sendo suas especificações descritas no Anexo 2, 3 e 4.

- a) sarampo - *2nd International Reference Reagent for Measles Vaccine (live)* - code: 92/648 - NIBSC, concentração nominal de 4,3 log₁₀CCID₅₀/ DH (dose 50% infectante em culturas de células/dose humana);
- b) caxumba - *1st International Reference Reagent for Mumps Vaccine* - code: 90/534 - NIBSC, concentração nominal de 4,6 log₁₀CCID₅₀/ DH.
- c) rubéola - *1st International Reference Reagent for Rubella (live)*- code: 91/688 - NIBSC, concentração nominal de 3,9 log₁₀CCID₅₀/ DH;

4.3 MATERIAL DE REFERÊNCIA DE TRABALHO GSK

O material de referência de trabalho atualmente utilizado em Bio-Manguinhos - MRT_{GSK} Lote: MJR776A44- é apresentado na forma trivalente e suas especificações se encontram no Anexo 5. As concentrações nominais dos componentes virais são: 3,9 log₁₀CCID₅₀/ DH para o vírus do sarampo, 4,7 log₁₀CCID₅₀/ DH para o vírus da caxumba e 4,0 log₁₀CCID₅₀/ DH para o vírus da rubéola.

4.4 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA OU CONCENTRAÇÃO VIRAL DAS VACINAS

O ensaio de potência fundamenta-se na avaliação da infectividade em cultura de células, dos componentes virais presentes na vacina e expressas em CCID₅₀/DH. Os procedimentos descritos seguem a instrução de trabalho estabelecida e validada pela seção de potência (SEPOT) de Bio-Manguinhos.

4.4.1 Cultura de células suscetíveis ao ensaio de potência

Os procedimentos de preparo de cultivos de células seguem as instruções de trabalho estabelecidas e validadas pela seção de controle de banco de células (SBCEL) de Bio-Manguinhos, e os meios de cultura são fornecidos pelo setor de meios de cultura (SEMES) de Bio-Manguinhos.

Foram utilizadas as linhagens celulares: VERO (células de rim de macaco verde Africano) e RK-13 (célula de rim de coelho), como preconizadas pelos procedimentos internacionais e nacionais.

4.4.1.1 Preparo da suspensão celular RK-13

As células foram cultivadas em meio MEM Eagle Earle suplementado com 5,0 mL de NaHCO_3 4,4%, 2,0 mL de soro fetal bovino (SFB) não inativado, 0,1 mL de sulfato de gentamicina (80mg), 1 mL de solução HEPES 1M para um volume final de 100 mL de meio MEM-Earle. As suspensões celulares foram preparadas na concentração de 2×10^5 células/mL e em seguida distribuídas em um volume de 100 μL em placas de 96 orifícios. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C , em ambiente contendo 5% de CO_2 foi observada a monocamada celular nos orifícios das placas no microscópio invertido e submetidas ao teste de potência.

4.4.1.2 Preparo da suspensão celular VERO

O preparo da suspensão celular Vero foi realizado no mesmo dia da realização do ensaio. As células foram cultivadas em meio 199 com sais de Earle (M-199) suplementado com 2,5 mL de NaHCO_3 4,4%, 3,0 mL de SFB não inativado, 0,1 mL de sulfato de gentamicina (80mg) para um volume final de 100 mL de meio M-199. As suspensões celulares foram preparadas na concentração de 2×10^5 células/mL, em seguida distribuídas em um volume de 100 μL em placas de 96 orifícios e submetidas ao teste de potência.

4.4.2 Preparo dos antissoros e meios de diluição

Com o objetivo de eliminar a interferência entre os componentes virais, foram adicionados de antissoros heterólogos específicos aos meios de cultura utilizados como diluentes (Tabela 2), ou seja:

- (a) o vírus do sarampo foi titulado em células VERO, após o vírus da caxumba ter sido neutralizado com o soro anticaxumba;
- (b) vírus da caxumba foi titulado em células VERO, após o vírus do sarampo ser neutralizado com o soro antissarampo e

(c) o vírus da rubéola foi titulado em células RK-13, após o vírus da caxumba ser neutralizado com o soro anticaxumba.

Tabela 2. Meios de cultura utilizados para diluição das vacinas

Componente	Preparo do meio
Caxumba	M-199 + 100 mg/L canamicina + 10 mg/L eritromicina + 2,5% NaHCO ₃ 4,4% + antissoro de sarampo capaz de neutralizar 100-300 CCID ₅₀ de vírus
Sarampo ou Rubéola	M-199 + 100 mg/L canamicina + 10 mg/L eritromicina + 2,5% NaHCO ₃ 4,4% + antissoro de caxumba capaz de neutralizar 1000 CCID ₅₀ de vírus

4.4.3 Procedimentos para diluição e determinação da potência

A vacina cMRT_{Bio} foi mantida à temperatura de -20° C e reconstituída com 5 mL de água para injetáveis no momento da realização do teste. Foram utilizados três frascos da vacina por teste e cada frasco foi testado em quadruplicata.

Para a determinação da concentração viral foram realizadas as mesmas diluições em todas as vacinas testadas - MRI_{NIBSC}, MRT_{GSK} e cMRT_{Bio} – considerando-se os procedimentos específicos para cada um dos vírus.

As diluições foram realizadas à temperatura ambiente para que ocorresse a reação de neutralização após cada mistura de vacina e antissoros.

Na determinação do vírus da caxumba, as amostras foram diluídas, utilizando-se fator 10, até a concentração de 10⁻³. A partir desta, utilizando-se um fator de diluição 4, foram realizadas mais três diluições (Tabela 3).

Tabela 3. Esquema de diluições para determinação da concentração viral da caxumba

Diluição (Log ₁₀)	Meio de Diluição (μL)	Vacina em teste (μL)
-1,0	900	100 da vacina
-2,0	900	100 da diluição -1
-3,0	900	100 da diluição -2
-3,6	900	300 da diluição -3
-4,2	900	300 da diluição -3,6
-4,8	900	300 da diluição -4,2

Na determinação dos vírus do sarampo e da rubéola, as amostras foram diluídas, utilizando-se fator 10, até a concentração de 10⁻². A partir desta, utilizando-se um fator de diluição 4, foram realizadas mais quatro diluições (Tabela 4).

Tabela 4. Esquema de diluições para determinação da concentração viral do sarampo e da rubéola

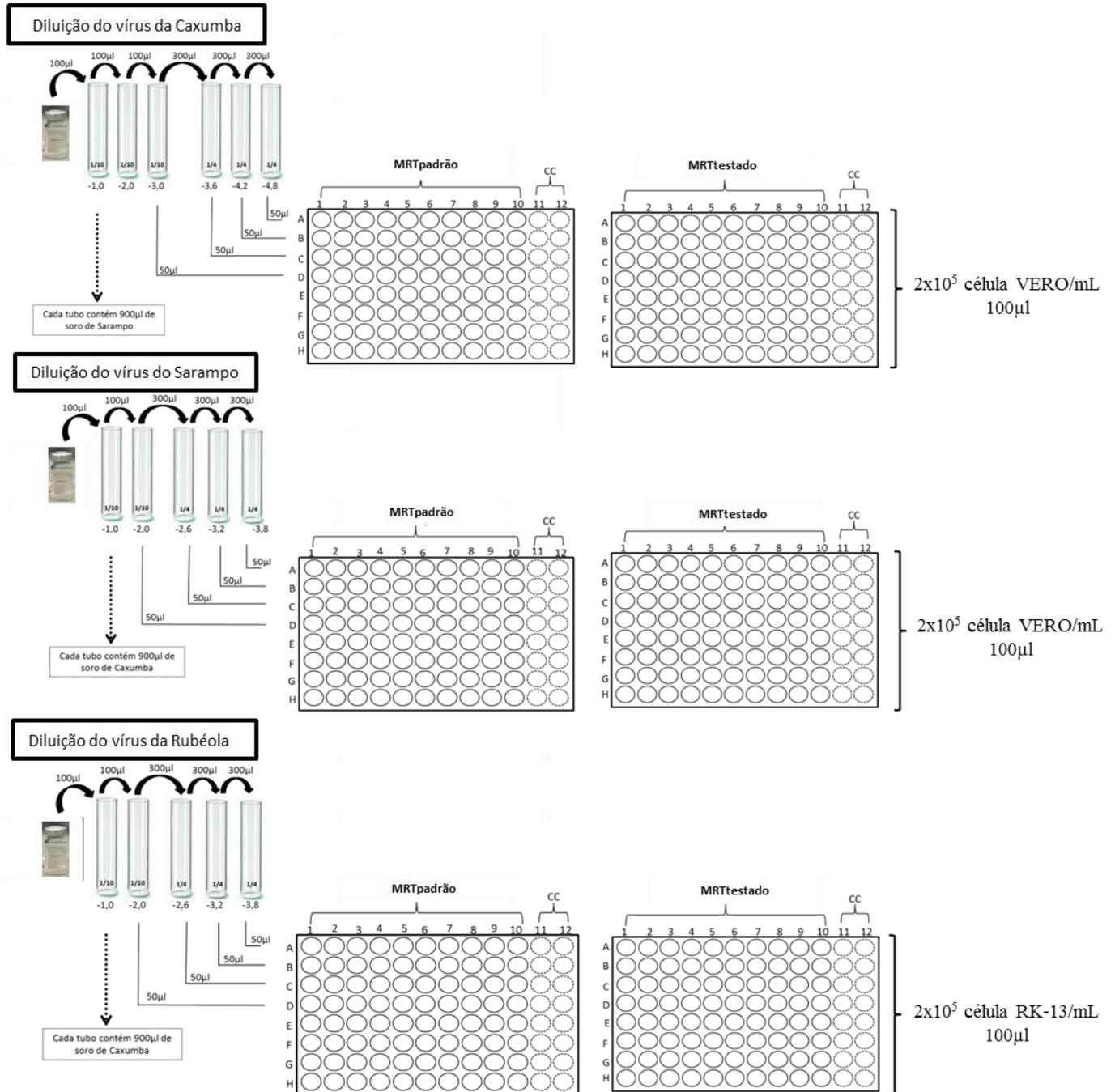
Diluição (Log ₁₀)	Meio de Diluição (μL)	Vacina em teste (μL)
-1,0	900	100 da vacina
-2,0	900	100 da diluição -1
-2,6	900	100 da diluição -2
-3,2	900	300 da diluição -2,6
-3,8	900	300 da diluição -3,2
-4,4	900	300 da diluição -3,8

Após a diluição das vacinas, foram distribuídos 50 μL das 4 últimas diluições (começando do mais diluído para o mais concentrado) em 10 poços na horizontal (conforme figura 12), já contendo monocamada celular.

O MRI_{NIBSC} foi distribuído da mesma maneira, entretanto, foram utilizadas todas as diluições. Para a titulação do vírus da caxumba e do vírus do sarampo, a inoculação foi realizada em células VERO, enquanto que, para a rubéola, em células RK-13. As microplacas foram seladas com filme adesivo e incubadas à temperatura de 33°C, por 9 dias, em estufa contendo 5% de CO₂. Nas mesmas condições, como controle negativo, foram utilizadas 2 colunas (11 e 12, conforme figura 11) da placa, onde foram adicionados volumes de 50μL por poço de meio de cultura.

No nono dia de incubação, as culturas foram observadas no microscópio invertido quanto à presença ou ausência de efeito citopático (ECP) em cada uma das diluições. Os títulos dos vírus presentes na vacina foram calculados pelo método de Reed-Muench (Reed e Muench, 1938), com base nas leituras dos vírus do sarampo, caxumba e rubéola e foram expressos em CCID₅₀ (dose 50% infectante em cultura de célula) por DH (dose humana).

Figura 11. Desenho esquemático do protocolo de diluição das suspensões virais



4.4.3.1 Critérios de aceitação do ensaio

Para que os testes fossem considerados válidos, os seguintes critérios foram analisados:

- a) ao final do ensaio, o controle negativo deve apresentar monocamada de células inalterada;
- b) a variação do título da vacina de referência deve ser no máximo $0,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ do seu título médio para cada tipo de vírus;
- c) o ECP deve ser inversamente proporcional às diluições;
- d) as diluições utilizadas no ensaio devem estar entre 10% e 90% das culturas de células inoculadas.

A vacina tem a sua potência aprovada quando o título obtido estiver dentro das especificações conforme descrito na tabela 5.

Tabela5. Especificações para a aprovação do ensaio de potência da vacina tríplice viral

Componente viral	Potência $\log_{10} \text{CCID}_{50} / \text{DH}$
Sarampo	$\geq 3,0$
Caxumba	$\geq 3,7$
Rubéola	$\geq 3,0$

4.5 ENSAIO DE CALIBRAÇÃO

Devido às variações relativamente grandes na estimativa da potência de um material biológico, nem sempre é recomendado que ele fosse utilizado como padrão de calibração. Assim, os valores de unidade devem ser usados como um guia para os usuários finais que podem precisar estimar o conteúdo desta preparação em seus próprios ensaios. Neste sentido,

alguns MR são geralmente utilizados como controles positivos, podendo ser referenciados como padrões para a determinação da eficácia do desempenho do ensaio, sendo geralmente executados em simultâneo com uma série de testes para fins de determinação da validade do ensaio.

Visto que é preconizado pela OMS a calibração do MRT frente ao MRI, inicialmente, foi realizada uma análise de equivalência entre o MRI proveniente do NIBSC, denominado nesse estudo como MRI_{NIBSC} versus o atual MRT de Bio-Manguinhos, denominado de MRT_{GSK} . Esta proposta teve como objetivo utiliza-lo como referência para calibração dos ensaios da validação do $cMRT_{Bio}$. Este desenho experimental foi elaborado levando em conta duas variáveis: a quantidade limitada do MRI distribuídos pelo NIBISC, sendo estes destinados para caracterização e calibração de padrões secundários e o tipo de calibração utilizado no ensaio de desempenho, que não requer precisão quantitativa conforme justificado acima.

4.6 HOMOGENEIDADE DO LOTE CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA DE TRABALHO PARA O TESTE DE POTÊNCIA

Dez frascos do lote $cMRT_{Bio}$ foram selecionados aleatoriamente, sendo avaliados em quadruplicata. Os resultados de potência obtidos foram analisados para quantificar a variabilidade inter e intra-frasco, utilizando o modelo de efeitos aleatórios. Os desvios-padrão estimados pelo modelo e os coeficientes de variação (CV) foram utilizados para expressar a variabilidade (MONTGOMERY, 2008; SHAPIRO, 1965). Esta avaliação foi realizada utilizando o software R Project. Devido a variabilidade intrínseca dos ensaios biológicos, seguindo a recomendação da WHO (1997), é aceitável o valor de acima de 50% de variabilidade.

4.7 ENSAIO DE TERMOESTABILIDADE DO LOTE CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA DE TRABALHO PARA O TESTE DE POTÊNCIA

Foram realizados testes de potência em 3 frascos estocados à temperatura de 2-8°C e 3 frascos do mesmo lote mantidos a 37°C por 7 dias. Os frascos foram testados individualmente em paralelo ao MRT_{GSK} . A perda do título em amostras que permaneceram a 37°C em comparação com as amostras mantidas a temperatura de 2-8°C deverá ser no máximo de um logaritmo conforme os limites de especificação descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Limites de aceitação do ensaio de termoestabilidade

Vírus	MRT _{Bio} (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)	
	2 – 8°C	37°C
Sarampo	≥ 3.0	Variação ≤ 1 log ₁₀ CCID ₅₀ em relação ao título médio dos frascos estocados a 2- 8°C
Caxumba	≥ 3,7	
Rubéola	≥ 3,0	

4.8 CRITÉRIOS PARA REPROVAÇÃO DOS TESTES DE POTÊNCIA E TERMOESTABILIDADE

Todos os resultados que apresentaram valores diferentes dos apresentados na tabela Tabela 5.

4.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE

A vacina tríplice viral é uma preparação de vírus vivo. Sua estabilidade é monitorada pela potência em termos de CCID₅₀/DH. Embora a temperatura recomendada para estocagem e distribuição da vacina liofilizada ser de 2-8°C, para materiais de referência a OMS recomenda a temperatura de -20 °C, podendo esta estender o tempo de vida do produto sem afetar suas propriedades.

Conforme recomendação da OMS (2011), o estudo de estabilidade realizado pelo fabricante serve como uma indicação da estabilidade esperada para o produto, uma vez que o cMRT_{Bio} é derivado de um lote de vacina produzido comercialmente. Assim, como a temperatura de armazenamento do produto prescrito pela Farmacopéia Brasileira é de 2-8°C e todo o estudo de estabilidade de longa duração feito pelo fabricante é realizado nesta temperatura, utilizamos os mesmos parâmetros para avaliar a perda de potência biológica do cMRT_{Bio}.

Foram avaliados 3 frascos do cMRT_{Bio} mantidos na temperatura de -20°C e 2-8°C por um período de até 3 meses. Seus valores de potência biológica foram comparados com dados iniciais (T₀) obtidos na temperatura de 2-8°C, conforme mostra a Tabela 7.

Uma predição inicial da estabilidade do $cMRT_{Bio}$ será baseada no estudo de estabilidade realizada pela intuição. Tal estudo, conduzido em tempo real na temperatura recomendada pela OMS para MRT ($-20^{\circ}C$), será complementado pela análise comportamental do lote mantido pelos próximos 3 anos através de cartas de controle. Os parâmetros para o acompanhamento do decaimento da potência seguem as especificações da Farmacopéia Brasileira e os valores de T_0 .

De modo a atender os critérios preconizados pela OMS que recomenda avaliar o material em condições de estresse, o estudo de estabilidade acelerado foi avaliado conforme Tabela 7, no qual o candidato foi acondicionado em temperatura de $25^{\circ}C$ por um período de até 3 meses. Foram analisados 3 frascos do $cMRT_{Bio}$ nestas condições e comparados com resultados obtidos de frascos armazenados a temperatura de $2-8^{\circ}C$ (T_0).

Tabela 7. Matriz do estudo de estabilidade

Demonstração da estabilidade	Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento			
		T_0	T_2	T_3	T_6-T_{36}
Longa duração	$2-8^{\circ}C$	CQ	CQ	CQ	Pr
	$-20^{\circ}C$	-	CQ	CQ	CQ/pr
Acelerada	$25^{\circ}C$	-	CQ	CQ	CQ (6 meses)

CQ: teste de controle de qualidade.

Pr: predição baseado em histórico de lotes liberados pela Instituição.

T: tempo em meses

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As avaliações gráficas realizadas permitem verificar se os resultados obtidos variam de forma diferenciada conforme o dia e a amostra testada. A fim de avaliar a potência média para cada componente, considerando e quantificando as variações que são devidas aos diferentes dias e amostras, o modelo de efeitos aleatórios foi utilizado (Pinheiro & Bates, 2000). Este modelo permite estimar a proporção da variabilidade (CV e desvio padrão) em relação aos diferentes dias e amostras, além de considerar a influência destes fatores na estimação da potência média. Esta avaliação foi realizada utilizando o software R Project.

A potência estabelecida foi a combinação de todos os frascos analisados, e expressos em $CCID_{50}/DH$ e o intervalo de confiança de 95% (IC95%).

De modo a garantir a confiabilidade dos dados, o perfil dos resultados foi avaliado através do uso de cartas de controle que demonstra que o processo de medição está sob controle estatístico, permitindo ainda, uma avaliação correta da conformidade de um produto. A elaboração de cartas de controle foi realizada pelo uso do programa de controle estatístico de processo, SPC Explorer RT, da empresa Quality America Inc.

Em decorrência da influência dos dias nos valores de potência, os valores inseridos nos gráficos controle foram as diferenças das médias das quadruplicatas $cMRT_{Bio}$ e do padrão MRT_{GSK} . Os limites de confiança foram calculados a partir da dispersão das diferenças supracitadas. Os valores que sinalizam uma diferença sistemática nos testes de desempenho realizados pelo Software são:

- (a) 1 ponto fora do 3-DP;
- (b) 9 pontos sucessivos do mesmo lado da linha central;
- (c) 6 pontos sucessivos subindo ou descendo.

5 RESULTADOS

5.1 CALIBRAÇÃO DO MRT_{GSK} frente MRI_{NIBSC}

Os resultados obtidos da calibração do MRT_{GSK} frente ao MRI_{NIBSC} foram avaliados em quadruplicata, sendo verificado que a potência estimada para todos os vírus se encontra dentro da faixa de especificação do material, conforme demonstrado na Tabela 8. Assim, os dados de potência média dos vírus verificam que o MRT_{GSK} se encontra dentro das especificações, conforme preconizado pelo fornecedor GSK, podendo ser utilizado como MR calibrador do $cMRT_{Bio}$.

Tabela 8. Dados obtidos no ensaio de calibração do MRT_{GSK} frente ao MRI_{NIBSC}

Potência (\log_{10} CCID ₅₀ / DH)						
Vírus componente	Sarampo		Caxumba		Rubéola	
Replicata	MRI_{NIBSC}	MRT_{GSK}	MRI_{NIBSC}	MRT_{GSK}	MRI_{NIBSC}	MRT_{GSK}
1	3,60	3,90	4,47	4,90	3,47	4,26
2	3,45	3,73	4,41	4,86	3,45	4,25
3	3,47	3,90	4,74	5,20	3,51	4,11
4	3,45	4,13	4,71	4,96	3,7	4,11
Média	3,49	3,90	4,58	4,98	3,53	4,18

5.2 HOMOGENEIDADE

Para a avaliação da homogeneidade do lote candidato, 10 frascos do $cMRT_{Bio}$ foram selecionados aleatoriamente e analisados no mesmo dia. A homogeneidade foi avaliada pela variabilidade inter e intra-frasco.

Com este propósito foram avaliados os valores da quadruplicata de cada frasco, sendo as variações nos 10 frascos calculados para a obtenção dos valores de desvio e coeficiente de

variação (CV) intra-frasco. De acordo com os cálculos estatísticos, verificamos valores de desvio abaixo de 0,5 e CV inferior a 10%, conforme dados da Tabela 8.

Para a análise inter-frasco foi calculada a média das quadruplicatas de cada frasco e estes valores utilizados para a análise estatística do cálculo do desvio e CV entre os frascos. Conforme observado na Tabela 9, verificamos que para a variação inter-frasco, o desvio foi menor que 0,5 e o CV menor que 10%.

Tabela 9. Resultados estatísticos do estudo de homogeneidade

Vírus componente	Sarampo			Caxumba			Rubéola				
	Potência (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)			Potência (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)			Potência (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)				
	cMRT _{Bio}		MRT _{GSK}	cMRT _{Bio}		MRT _{GSK}	cMRT _{Bio}		MRT _{GSK}		
Frasco	Potência	Média ^a	Potência	Potência	Média	Potência	Potência	Média	Potência		
1	3,47	3,5	3,61	3,81	4,13	4,14	4,29	4,24	3,38	3,32	3,41
	3,55	3,9				4,34	4,19		3,47	3,47	
2	3,66	3,8	3,78			4,36	4,24	4,39	3,51	3,60	3,53
	3,71	3,9				4,60	4,35		3,55	3,45	
3	3,74	3,5	3,63			4,41	4,55	4,49	3,47	3,34	3,40
	3,85	3,4				4,39	4,60		3,38	3,41	
4	3,79	3,6	3,80			4,77	5,06	4,97	3,38	3,34	3,34
	3,74	4,0				4,98	5,06		3,41	3,21	
5	3,74	3,4	3,56			4,23	4,51	4,45	3,26	3,55	3,38
	3,66	3,4				4,46	4,60		3,38	3,34	
6	3,50	3,5	3,52	5,01	4,95	5,00	3,43	3,76	3,60		
	3,41	3,6		5,03	5,01		3,60	3,60			
7	3,30	3,3	3,42	4,06	4,06	3,94	3,47	3,50	3,44		
	3,41	3,6		3,79	3,86		3,55	3,25			
8	3,41	3,6	3,48	5,20	5,45	5,20	3,43	3,79	3,59		
	3,35	3,5		5,10	5,03		3,74	3,39			
9	3,29	3,2	3,27	4,06	4,06	4,10	3,41	3,34	3,43		
	3,49	3,0		4,16	4,11		3,47	3,50			
10	3,24	3,6	3,49	4,86	4,79	4,91	3,39	3,34	3,37		
	3,47	3,6		4,94	5,03		3,41	3,33			
Média ^b	3,56		-	4,57		-	3,45		-		
Desvio inter-frasco	0,138		-	0,421		-	0,074		-		
CV inter-frasco (%)	3,88		-	9,21		-	2,13		-		
Desvio intra-frasco	0,167		-	0,124		-	0,110		-		
CV intra-frasco (%)	4,70		-	2,71		-	3,18		-		

^a Média referente as quadruplicatas do frasco de cMRT_{Bio}.

^b Média referente as médias de cada frasco cMRT_{Bio}.

Dada à natureza do teste biológico, os resultados obtidos podem ser considerados homogêneos intra e inter-frascos, já que todos os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 10%, estando dentro do limite de aceitação (WHO, 1997). Desta forma, o lote pode ser considerado homogêneo para o fim desejado. Estes resultados indicam que a variância dos resíduos é constante ($P > 0,05$) e os resíduos são normais ($P > 0,05$). Assim, podemos concluir que as suposições do modelo (homocedasticidade e normalidade) são válidas e o lote pode ser considerado homogêneo.

5.3 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA BIOLÓGICA

5.3.1 Avaliação da influência de diferentes parâmetros na potência biológica

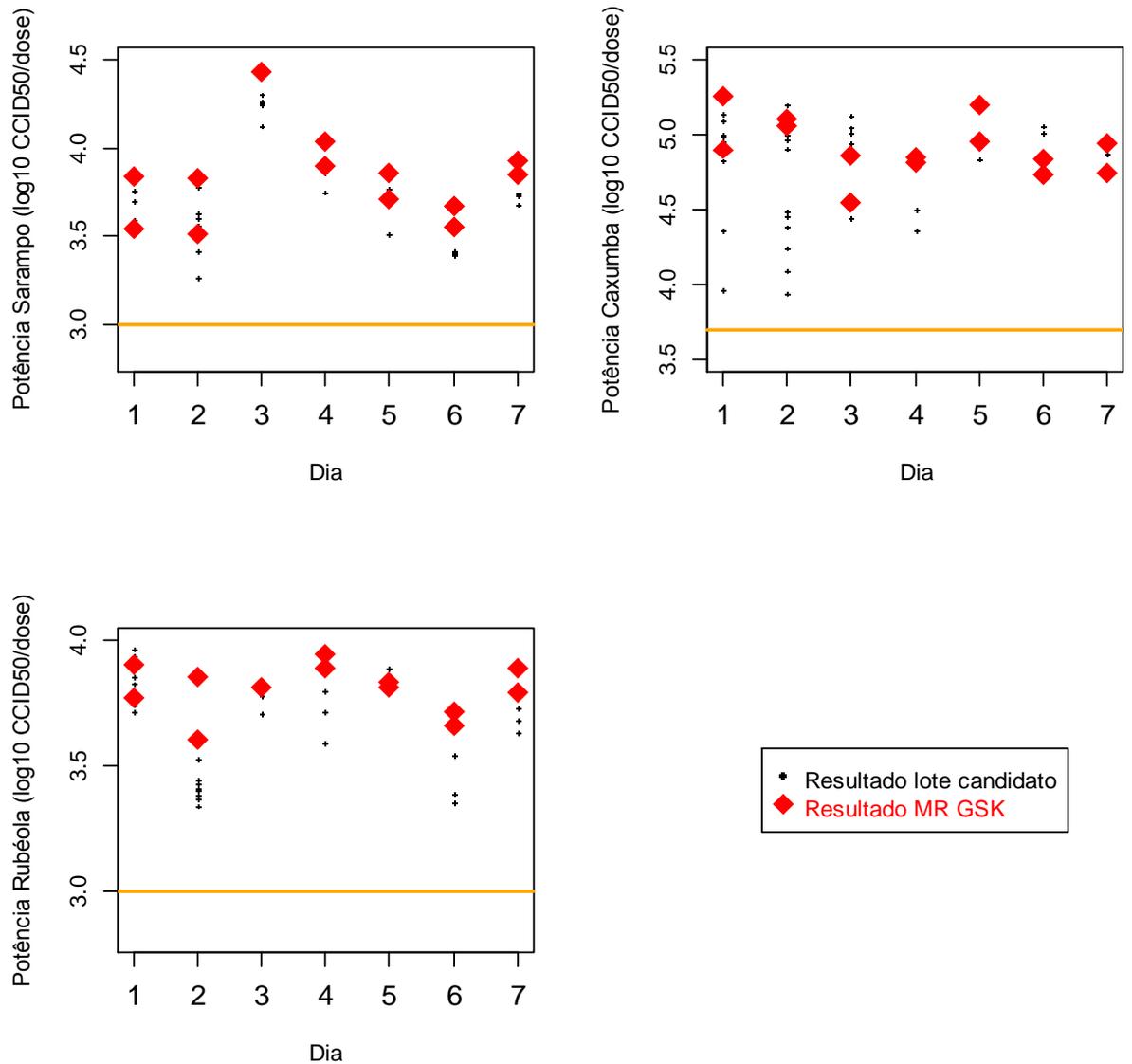
Para a determinação da potência estimada de cada vírus que compõe o $cMRT_{Bio}$, foram avaliados 30 frascos individuais, sendo a análise feita em quadruplicata conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Dados obtidos nos testes de potência

Vírus componente		Sarampo			Caxumba			Rubéola		
		Potência (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)			Potência (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)			Potência (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)		
		cMRT _{Bio}		MRT _{GSK}	cMRT _{Bio}		MRT _{GSK}	cMRT _{Bio}		MRT _{GSK}
Dia	Frasco	Absoluta	Média	Absoluta	Absoluta	Média	Absoluta	Absoluta	Média	Absoluta
1	1	3,47 3,55	3,50 3,90	3,61	4,14 4,34	4,29 4,19	4,24	3,38 3,47	3,32 3,47	3,41
	2	3,66 3,71	3,81 3,95	3,78	4,36 4,60	4,24 4,35	4,39	3,51 3,55	3,60 3,45	3,53
	3	3,74 3,85	3,51 3,43	3,63	4,41 4,39	4,55 4,60	4,49	3,47 3,38	3,34 3,41	3,40
	4	3,79 3,74	3,66 4,02	3,80	4,77 4,98	5,06 5,06	4,97	3,38 3,41	3,34 3,21	3,34
	5	3,74 3,66	3,41 3,43	3,56	4,23 4,46	4,51 4,60	4,45	3,26 3,38	3,55 3,34	3,38
	6	3,50 3,41	3,50 3,66	3,52	5,01 5,03	4,95 5,01	5,00	3,43 3,60	3,76 3,60	3,60
	7	3,30 3,41	3,30 3,66	3,42	4,06 3,79	4,06 3,86	3,94	3,47 3,55	3,50 3,25	3,44
	8	3,41 3,35	3,66 3,50	3,48	5,20 5,10	5,45 5,03	5,20	3,43 3,74	3,79 3,39	3,59
	9	3,29 3,49	3,29 3,00	3,27	4,06 4,16	4,06 4,11	4,10	3,41 3,47	3,34 3,50	3,43
	10	3,24 3,47	3,66 3,60	3,49	4,86 4,94	4,79 5,03	4,91	3,39 3,41	3,34 3,33	3,37
2	1	-	-	-	4,35 4,23	4,55 4,30	4,36	3,74 3,71	- 3,73	3,73
	2	3,70 3,90	3,71 3,71	3,76	5,09 5,07	4,85 4,94	4,99	3,66 3,66	3,77 3,88	3,74
	3	3,49 3,30	3,73 3,79	3,58	4,99 4,86	5,03 5,13	5,00	3,81 3,66	3,82 3,88	3,79
	4	3,90 3,66	3,83 3,94	3,83	3,71 4,17	4,11 3,86	3,96	3,76 3,72	3,71 3,66	3,71
	5	3,82 3,84	3,90 3,66	3,81	4,90 4,95	4,86 4,81	4,88	3,60 4,01	3,86 3,67	3,79
	6	-	-	-	4,70 4,79	4,90 4,93	4,83	3,85 3,84	3,77 3,83	3,82
	7	3,60 3,90	3,85 3,43	3,70	5,05 5,25	5,20 5,07	5,14	3,83 3,95	4,09 3,98	3,96
	8	-	-	-	5,20 5,01	4,94 5,20	5,09	3,90 3,89	3,84 3,79	3,86
	9	3,33 3,50	3,60 3,77	3,55	4,95 4,95	4,84 4,84	4,90	3,90 3,94	3,85 3,90	3,90
	10	3,47 3,45	3,79 3,65	3,59	4,98 4,93	4,93 4,98	4,96	3,96 3,94	3,83 4,01	3,94
3	1	3,99 4,33	4,41 4,30	4,26	5,37 5,03	4,90 5,20	5,13	3,89 3,94	3,81 3,71	3,84
	2	4,07 4,15	4,34 4,45	4,25	4,90 4,99	4,95 4,94	4,95	3,85 3,71	3,82 3,85	3,81
	3	4,46 4,14	4,20 4,15	4,24	4,55 4,39	4,39 4,46	4,45	4,85 5,16	-	4,11
	4	4,26 4,10	4,41 4,43	4,30	4,90 4,94	5,10 5,09	5,01	3,90 3,79	3,47 3,66	3,71
	5	4,06 4,03	4,25 4,15	4,12	5,25 4,99	5,15 4,81	5,05	3,81 3,66	3,79 3,83	3,77
4	1	3,50 3,71	3,89 3,90	3,75	-	-	-	3,60 3,50	3,71 3,55	3,59
	2	3,94 3,77	3,90 3,83	3,86	4,20 4,35	4,33 4,29	4,37	5,11 5,15	3,71 3,66	4,24
	3	3,95 3,85	3,81 3,84	3,86	4,66 4,40	4,33 4,60	4,50	3,81 3,84	3,90 3,65	4,19
5	1	3,83 3,76	3,46 3,89	3,74	4,70 4,66	5,03 4,97	4,84	3,77 3,94	3,77 3,87	3,84
	2	3,38 3,36	3,84 3,46	3,51	4,16 4,01	4,01	-	5,50 5,25	3,89 3,76	4,13
	3	3,79 3,82	3,81 3,67	3,77	-	-	-	3,85 3,90	3,83 3,97	4,11
6	1	3,43 3,39	3,43 3,39	3,41	-	-	-	3,66 3,50	3,50 3,50	3,54
	2	3,47 3,39	3,33 3,39	3,40	3,97 3,85	3,85	5,05	5,03	5,14	4,01
	3	3,46 3,35	3,41 3,39	3,40	5,03 5,06	4,94 4,99	5,01	3,39 3,33	3,30 3,39	3,96
7	1	3,66 3,74	3,84 3,71	3,74	4,91 4,85	4,84 4,90	4,88	3,60 3,71	3,60 3,79	3,68
	2	3,66 3,74	3,66 3,66	3,68	4,15 4,23	4,23	4,96	5,04	4,23	4,09
	3	3,85 3,79	3,55 3,71	3,73	5,06 4,90	5,01 4,79	4,94	3,79 3,43	3,60 3,70	3,63

Os dados do comportamento da análise de potência do MRT_{GSK} e $cMRT_{Bio}$ foram agrupados pelo dia de análise, o que permitiu observar que apresentaram o mesmo padrão de variação conforme mostra a Figura 12.

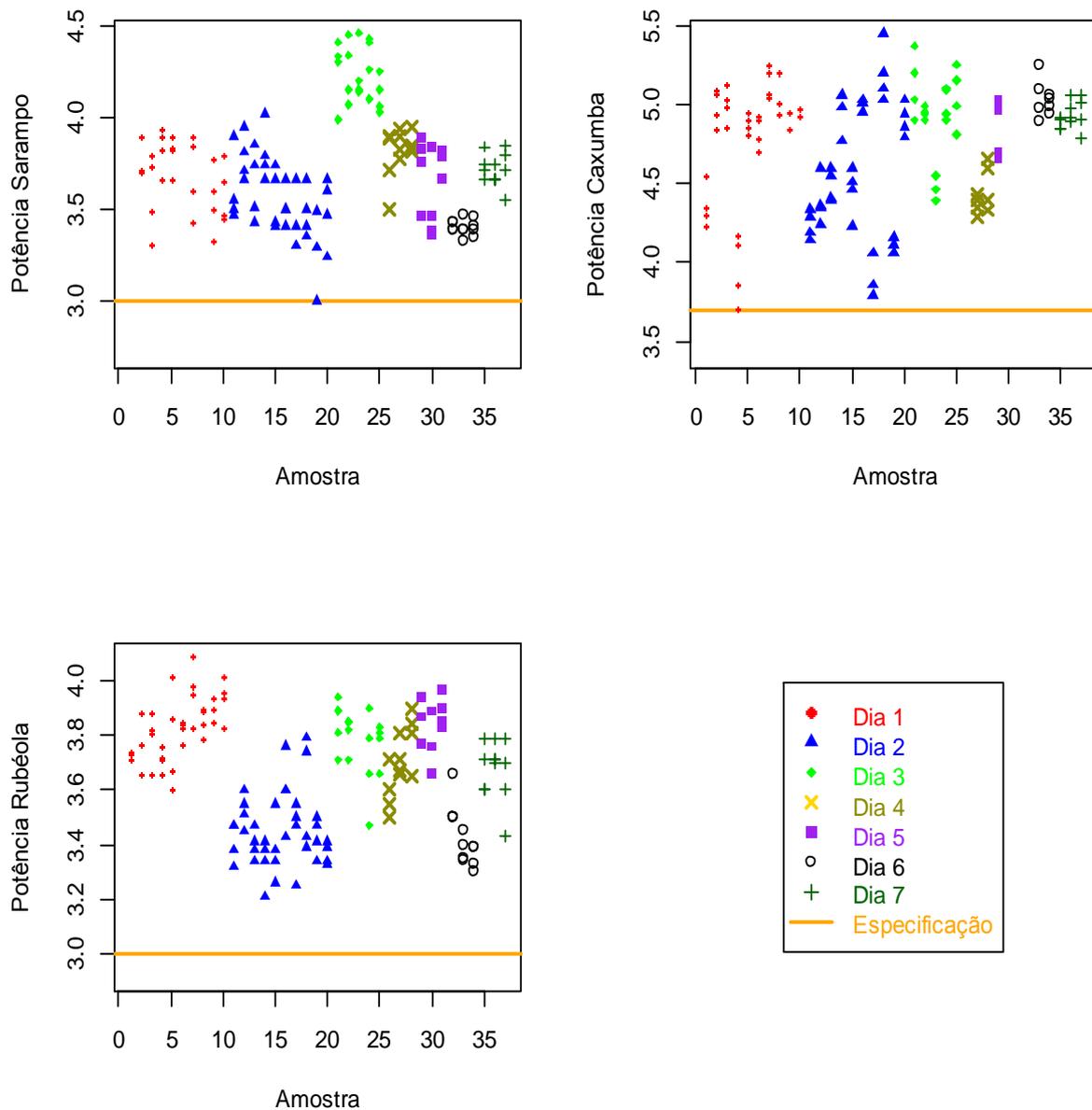
Figura 12. Influência do dia nas médias dos Resultados de Potência do $cMRT_{Bio}$ e do padrão MRT_{GSK}



(+) resultados individuais da potência média dos frascos do $cMRT_{Bio}$ e (◊) resultados individuais da potência média dos frascos do MRT_{GSK} . (—) especificação da potência viral.

Para possibilitar uma melhor visualização da variabilidade de cada grupo de resultados, considerando as possibilidades de variação entre dias, entre e intra frascos, os valores de potência foram agrupados em relação a estas variáveis (Figura 13). Foi observado comportamento similar entre frascos e suas replicatas nos diferentes dias de ensaio.

Figura 13. Influência do dia e dos frascos nos resultados de potência do cMRT_{Bio}



As potências individuais obtidas pelos ensaios realizados no mesmo dia estão representados pelo mesmo símbolo.

As variações relativas a estes parâmetros foram quantificadas utilizando um modelo de efeitos aleatórios (Pinheiro & Bates, 2009). Baseado nestes cálculos foi possível quantificar as fontes de variabilidade que compõem a variância da potência viral, usando o desvio padrão estimado, coeficiente de variação e intervalo de 95% de confiança. O conhecimento destes componentes de variância permite melhor avaliação de respostas a diferentes ensaios, conduzidos ou não no mesmo dia. Os valores calculados individualmente para os componentes virais do $cMRT_{Bio}$ se encontram nas Tabela 11, 12 e 13.

5.3.2 Potência estimada do vírus do sarampo

Na avaliação do componente sarampo, os componentes de variância foram estimados conforme supracitado. As suposições do modelo utilizado foram verificadas e satisfeitas e não foram identificados valores discrepantes.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 11, verificamos um desvio padrão menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter e intra-frasco), bem como, o coeficiente de variação menor que 10%, sendo que a maior fonte estimada de variabilidade foi entre dias distintos.

Tabela 11. Componentes da variância para sarampo

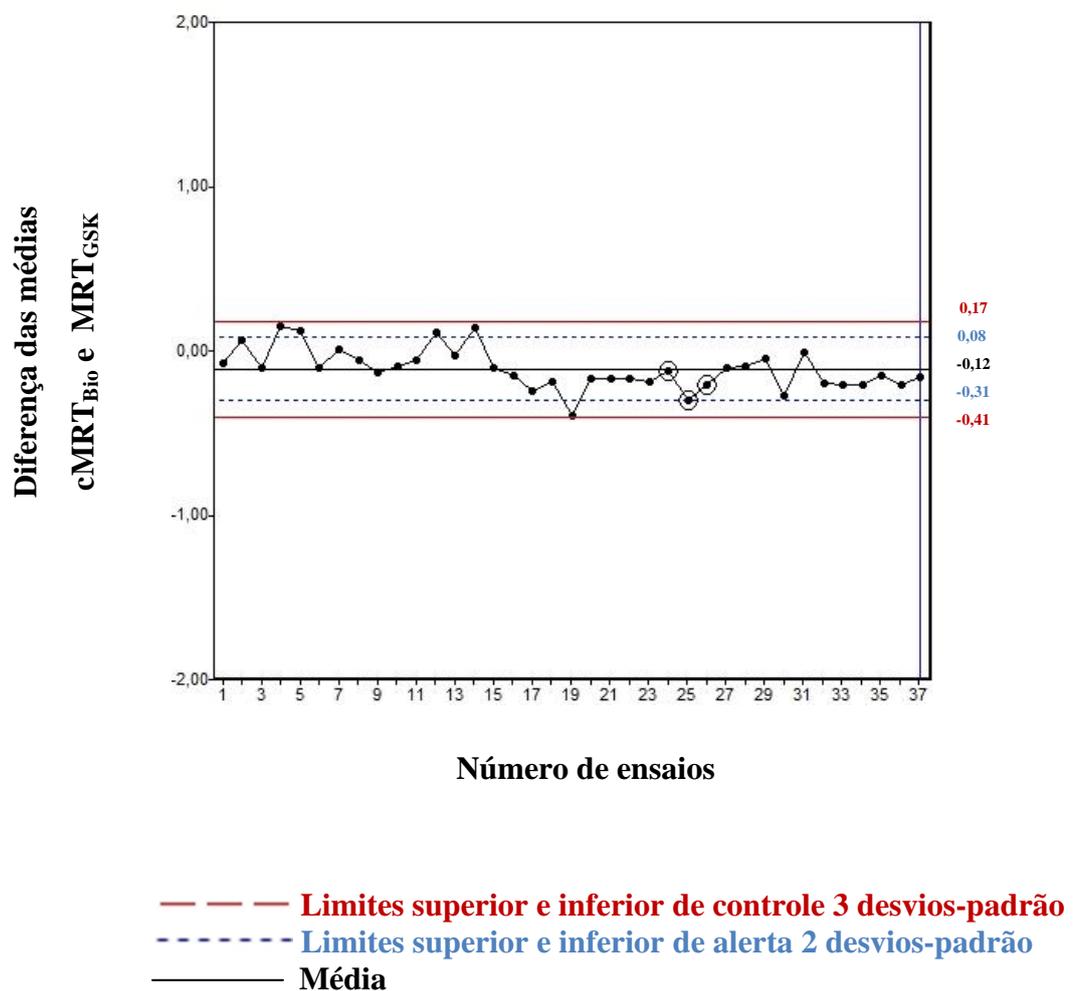
Fonte de variação	Desvio-padrão estimado	CV (%)	IC 95%
Entre dias	0,254	6,82	0,143 – 0,451
Inter-frasco	0,092	2,48	0,052 – 0,141
Intra-frasco	0,149	4,01	0,134 – 0,173

Baseado nos componentes de variância, a potência média para sarampo no $cMRT_{Bio}$ pôde ser estimada e seu intervalo de confiança calculado considerando as fontes de variação estudadas. Assim, a potência média estimada do componente sarampo para este lote foi de **3,73** com os seus intervalos de confiança (IC95%) entre 3,48 – 3,98.

De modo a garantir a confiabilidade dos dados apresentados, foi avaliado o perfil dos resultados através do uso de cartas controle que demonstra que o processo de medição está

sob controle estatístico, permitindo ainda, uma avaliação correta da conformidade de um produto (OMS). No gráfico da figura 14, três resultados foram marcados por um círculo, o que demonstra que esses valores sinalizam um possível erro sistemático nos testes de desempenho realizados pelo Software. Estes valores (ensaios de números 24 a 26) se encaixam no critério “nove valores consecutivos no mesmo lado da média”. Assim, de acordo com a premissa deste controle verificamos que os dados obtidos para o componente viral sarampo estão dentro dos limites estabelecidos, reforçando a veracidade dos dados.

Figura 14. Carta controle da potência biológica do componente viral sarampo do $cMRT_{BIO}$



5.3.3 Potência estimada do vírus da caxumba

Na avaliação do componente caxumba, os componentes de variância foram estimados conforme supracitado, sendo verificadas as suposições do modelo utilizado como satisfeitas e não foram identificados valores discrepantes.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 12, verificamos um desvio padrão menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter e intra-frasco), bem como, o coeficiente de variação menor que 10%, conforme o observado para o vírus do sarampo. Para o componente caxumba, a variabilidade entre dias não foi estatisticamente significativa, uma vez que o intervalo de confiança para este componente inclui o valor zero. A maior fonte estimada de variabilidade foi entre frascos.

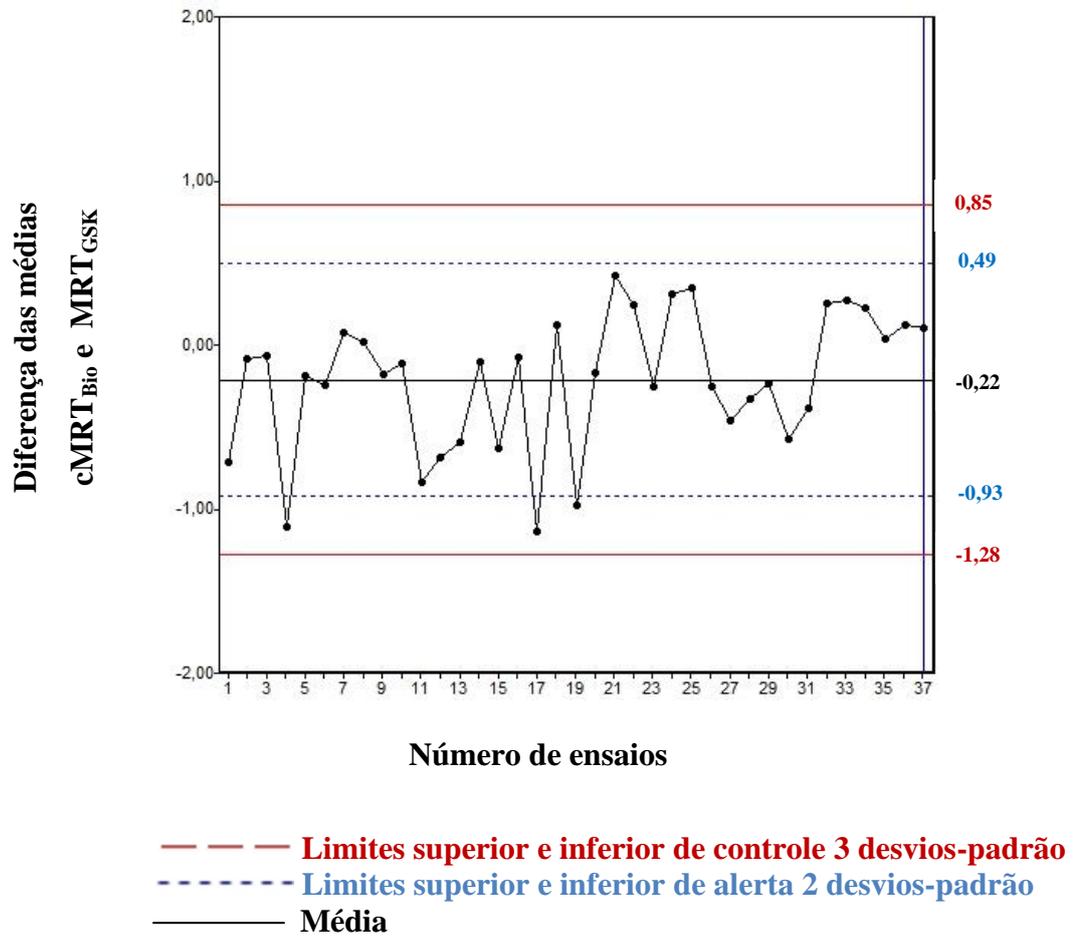
Tabela 12. Componentes da variância para caxumba

Fonte de variação	Desvio-padrão estimado	CV (%)	IC 95%
Entre dias	0,110	2,30	0 – 0,310
Inter-frasco	0,338	7,10	0,263 – 0,451
Intra-frasco	0,123	2,58	0,108 – 0,142

Baseado nestes componentes de variância, a potência média para caxumba no $cMRT_{BIO}$ pôde ser estimada e seu intervalo de confiança calculado considerando as fontes de variação estudadas. Assim, a potência média estimada do componente caxumba para este lote foi de **4,75** com os seus intervalos de confiança (IC95%) entre 4,57 – 4,94.

A ferramenta carta controle foi utilizada para avaliar os resultados da potência do componente viral caxumba, onde pode-se observar que os resultados obtidos estão dentro dos limites estatisticamente estabelecidos. No gráfico da figura 15, não foi sinalizado nenhum ensaio fora dos limites de controle (3DP).

Figura 15. Carta controle da potencia biológica do componente viral caxumba do $cMRT_{BIO}$



5.3.4 Potência estimada do vírus da rubéola

Na avaliação do componente rubéola, os componentes de variância foram estimados conforme supracitado, sendo verificadas as suposições do modelo utilizado como satisfeitas e não foram identificados valores discrepantes. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 13, verificamos um desvio padrão menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter e intra-frasco), bem como, o coeficiente de variação menor que 10%, conforme o observado para o vírus do sarampo. Para o componente da rubéola, a maior fonte estimada de variabilidade foi entre dias distintos, assim como no componente sarampo.

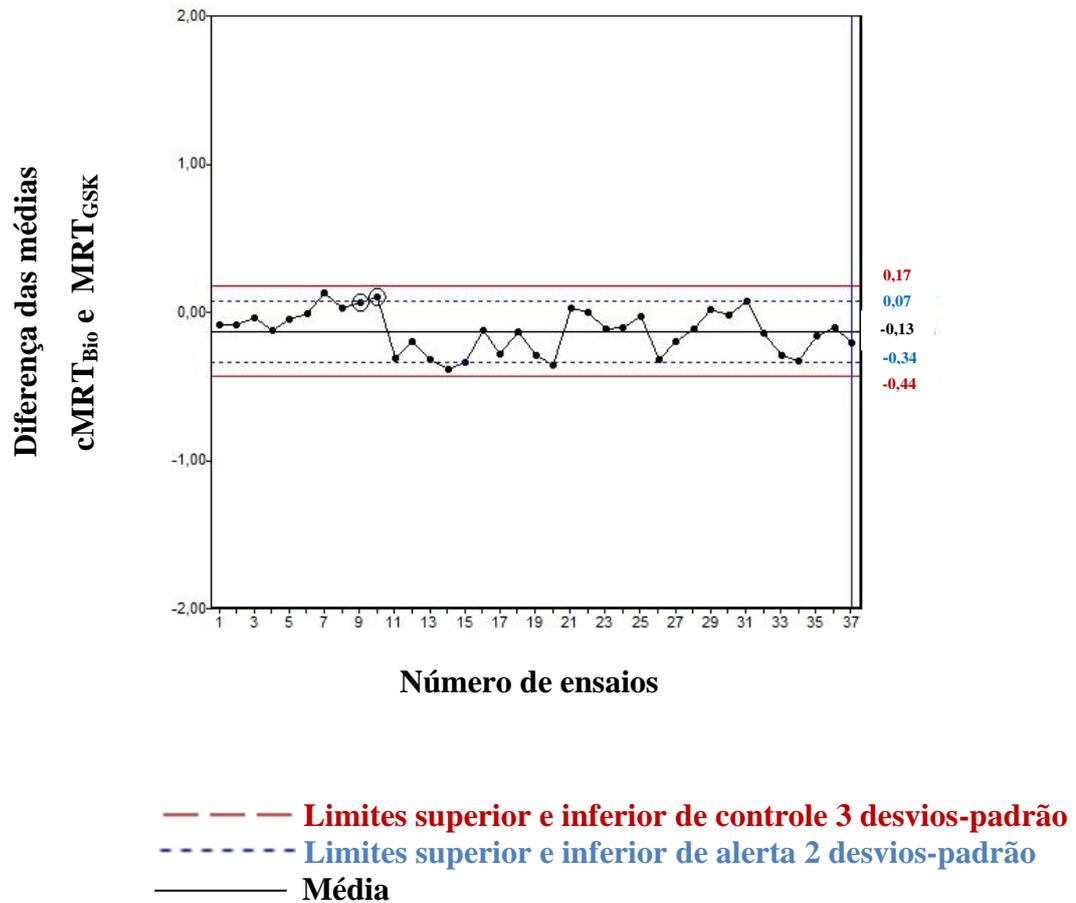
Tabela 13. Componentes da variância para rubéola

Fonte de variação	Desvio-padrão estimado	CV (%)	IC 95%
Entre dias	0,167	4,54	0,094 – 0,297
Inter-frasco	0,068	1,85	0,043 – 0,100
Intra-frasco	0,098	2,68	0,087 – 0,113

Baseado nestes componentes de variância, a potência média para rubéola no $cMRT_{BIO}$ pôde ser estimada e seu intervalo de confiança calculado considerando as fontes de variação estudadas. Assim, a potência média estimada do componente rubéola para este lote foi de **3,67** com os seus intervalos de confiança (IC95%) entre 3,51 – 3,83.

A confiabilidade do resultado da potência do componente viral rubéola foi avaliado pelo uso de cartas controle que demonstrou que o processo de medição está sob controle estatístico, uma vez que os resultados estão dentro dos limites estabelecidos. No gráfico da Figura 16 dois valores estão envoltos por um círculo (ensaios de números 9 e 10), que se encaixam no critério “nove valores consecutivos no mesmo lado da média”. Assim, de acordo com a premissa deste controle verificamos que os dados obtidos para o componente viral rubéola estão dentro dos limites estabelecidos, reforçando a veracidade dos dados.

Figura 16. Carta controle da potencia biológica do componente viral rubéola do cMRT_{Bio}.



Assim, conforme os resultados obtidos, verificamos que as potências dos componentes virais do lote cMRT_{Bio} não apresentaram valores discrepantes, estando estas dentro das especificações previstas para o conforme sumarizado na Tabela 14.

Tabela 14. Sumário das especificações e valores obtidos da potência do cMRT_{Bio}

Vírus	cMRT _{Bio} (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)	
	Especificações	Resultados
Sarampo	≥ 3,0	3,73
Caxumba	≥ 3,7	4,75
Rubéola	≥ 3,0	3,67

5.4 ENSAIO DE TERMOESTABILIDADE

Para o ensaio de termoestabilidade foram avaliados 3 frascos do cMRT_{Bio} no estado liofilizado a 37 °C por 7 dias e avaliados em paralelo com 3 frascos da cMRT_{Bio} estocada a 2-8°C conforme recomendação do fabricante. Conforme os resultados da Tabela 15, verificamos que a potência do lote cMRT_{Bio} se encontra dentro das especificações após o ensaio de termoestabilidade, sendo observado que cada componente da vacina não variou mais do que 1 log₁₀ CCID₅₀/ DH.

Tabela 15. Resultado do ensaio de termoestabilidade

Vírus	cMRT _{Bio} (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)				
	Especificações			Resultados	
Temperatura	2 – 8°C	37°C	2 – 8°C	37°C	Perda
Sarampo	≥ 3,0	Varição ≤ 1 log ₁₀	5,06	4,70	0,36
Caxumba	≥ 3,7	CCID ₅₀ em relação	3,81	3,45	0,36
Rubéola	≥ 3,0	ao título médio dos frascos estocados a 2- 8°C	3,94	3,64	0,37

5.5 ESTABILIDADE

5.5.1 Longa duração

Embora a estocagem de temperatura recomendada para distribuição da vacina liofilizada ser de 2-8°C, a estocagem da vacina em temperaturas inferiores é recomendável podendo estender seu tempo de vida e ser apropriado para a estocagem de padrões secundários, sem afetar a qualidade do produto. Em contrapartida, a OMS (2011) recomenda a utilização do estudo de estabilidade histórico do produtor quando o MRT é oriundo de um lote comercial para dar uma indicação da estabilidade esperada do produto. De modo a identificar a perda de potência da amostra mantida na mesma temperatura de armazenamento prescrita para a vacina, armazenamos em paralelo o cMRT_{Bio} na temperatura de 2-8 °C e verificamos perdas mínimas na potência do lote (Tabela 16), estando em conformidade com

as especificações e em consonância com os dados obtidos no estudo de estabilidade da vacina realizada por Bio-Manguinhos.

Tabela 16. Resultado do ensaio de estabilidade a 2 – 8°C.

Vírus	cMRT _{Bio} (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)					
	Tempo	Especificações		Resultados		
		t ₀	t ₂	t ₃	t ₀ -t ₂	t ₀ -t ₃
Temperatura	2 – 8°C	2 – 8°C	2 – 8°C	2 – 8°C	Variação	Variação
Sarampo	≥ 3,0	3,81	3,63	3,67	-0,18	-0,14
Caxumba	≥ 3,7	5,06	4,75	4,53	-0,31	-0,53
Rubéola	≥ 3,0	3,94	3,67	3,76	-0,27	-0,18

t: tempo em meses

Em paralelo, de modo a identificar a perda de potência da amostra mantida na temperatura prevista para materiais de referência foram analisados 3 frascos do cMRT_{Bio} na temperatura de -20°C por um período de até 3 meses e comparadas com a temperatura de armazenamento prescrita para o lote de 2-8°C, conforme o desenho experimental da Tabela 7. Foram verificadas perdas mínimas na potência do lote, estando estas dentro das especificações do produto (Tabela 17).

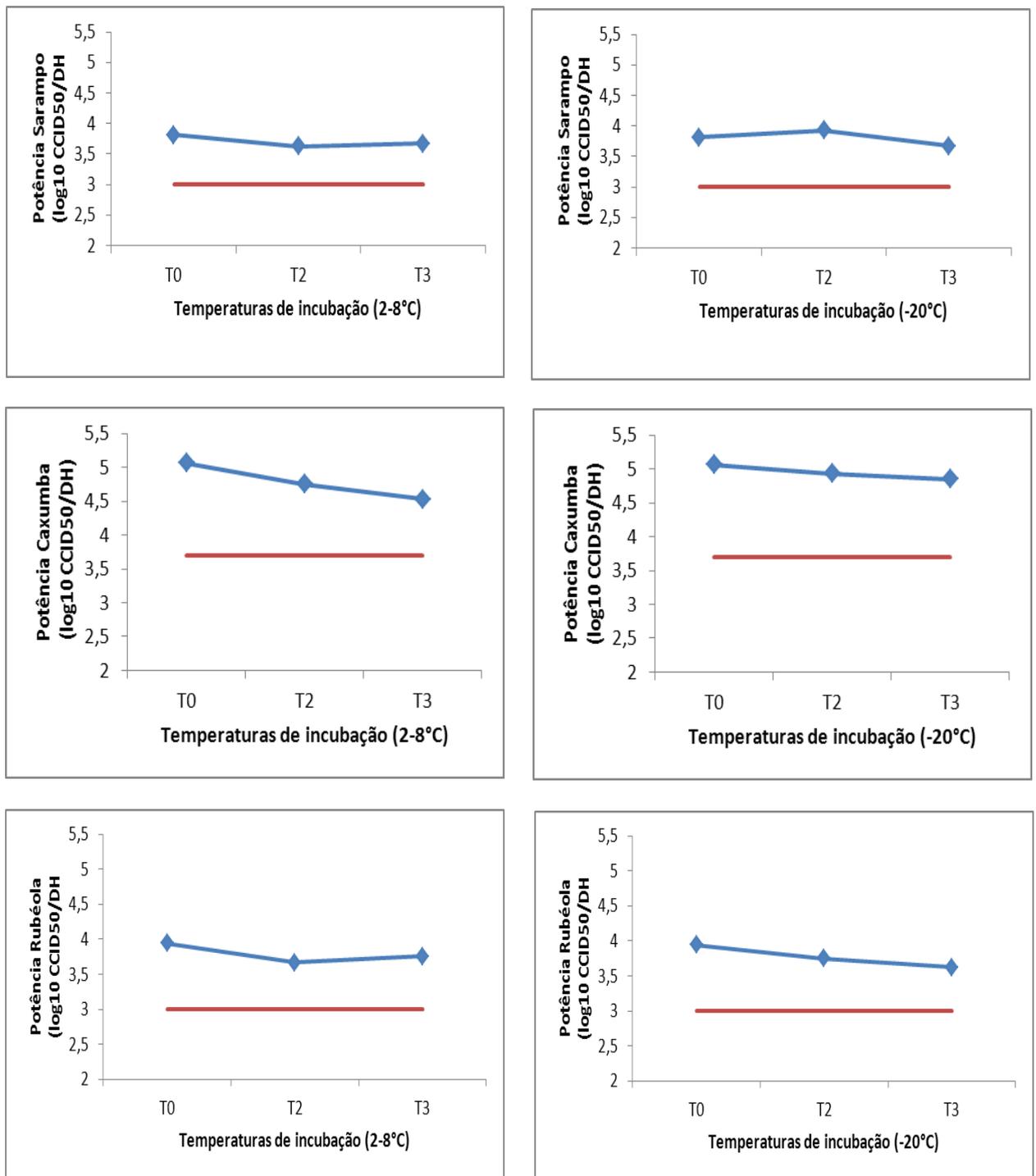
Tabela 17. Resultado do ensaio de estabilidade a -20°C.

Vírus	cMRT _{Bio} (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)					
	Especificações		Resultados			
Tempo		t ₀	t ₂	t ₃	t ₀ -t ₂	t ₀ -t ₃
Temperatura	2 – 8°C	2 – 8°C	-20°C	-20°C	Variação	Variação
Sarampo	≥ 3,0	3,81	3,93	3,67	0,12	-0,14
Caxumba	≥ 3,7	5,06	4,93	4,85	-0,13	-0,21
Rubéola	≥ 3,0	3,94	3,75	3,62	-0,19	-0,32

t: tempo em meses

Assim, conforme os resultados obtidos, verificamos que as potências dos vírus componentes do lote cMRT_{Bio} não apresentaram decaimento relevante das potências dos componentes virais, conforme análise estatística, se mantendo dentro das especificações previstas, no período de tempo avaliado, conforme ilustrado nos gráficos da Figura 17.

Figura 17. Resultados dos ensaios de estabilidade na temperatura de 2-8 °C e -20 °C no período de 3 meses



— Especificação da Potência Viral (limite inferior)
— Potência da vacina cMRT_{Bio} obtida durante o estudo de estabilidade

5.5.2 Acelerado

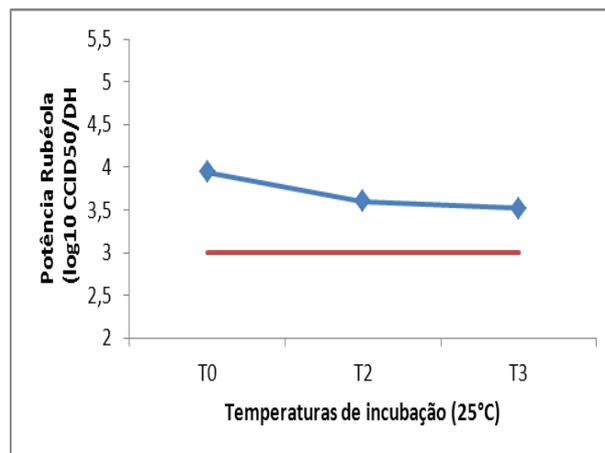
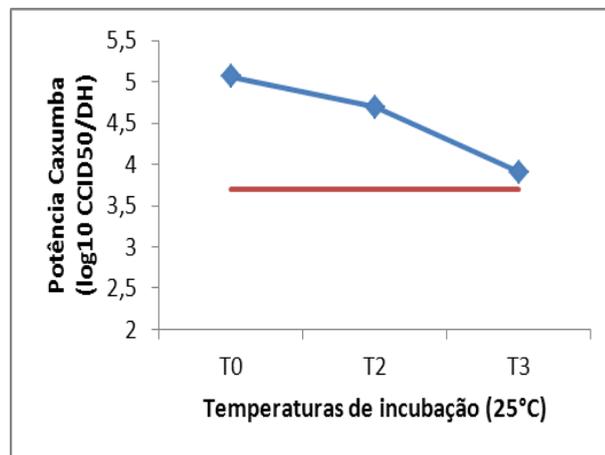
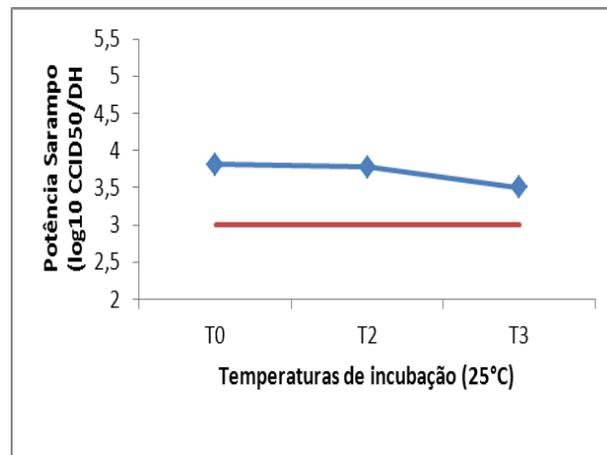
No estudo de degradação acelerado, o cMRT_{Bio} foi incubado a uma temperatura de 25°C durante 3 meses. A tentativa era simular e prever o grau de estabilidade/instabilidade do material frente a variações das condições recomendadas para a cadeia de distribuição do MR entre produtor e usuário. Conforme dados mostrados na Tabela 18 e Figura 18, a potência biológica do cMRT_{Bio} apresentou um decaimento mais acentuado quando comparado com as temperaturas descritas anteriormente neste estudo. Os títulos da potência de todos os componentes virais ainda se encontraram dentro dos limites especificados pela Farmacopéia Brasileira. A exceção foi a componente caxumba, uma vez que o decaimento de potência verificado foi de 1,15 log₁₀ CCID₅₀/ DH ultrapassando o máximo permitido que é de 1 log₁₀ CCID₅₀/ DH.

Apesar dos dados do estudo de estabilidade serem considerados pela Instituição segredo industrial conforme Art. 22, Lei 12.527/2011 - Lei de Acesso à Informação, o cMRT_{Bio} apresenta uma curva comportamental de perda de potência biológica similar àquelas observadas durante o estudo de estabilidade realizados em lotes produzidos pela Instituição. De acordo com estes dados, podemos prever que o cMRT_{Bio} deverá apresentar uma estabilidade funcional de 3 anos. Entretanto, o perfil da potência biológica do cMRT_{Bio} deverá ser acompanhado na temperatura de armazenamento prescrito pela OMS (-20°C) através de cartas de controle e, quando necessário, revalidados frente ao MRI, conforme preconizado pela OMS.

Tabela 18. Resultado do ensaio de estabilidade a 25°C

Vírus	cMRT _{Bio} (log ₁₀ CCID ₅₀ / DH)					
	Especificações	Resultados				
Tempo		t ₀	t ₂	t ₃	t ₀ -t ₂	t ₀ -t ₃
Temperatura	2 – 8°C	2 – 8°C	25°C	25°C	Variação	Variação
Sarampo	≥ 3,0	3,81	3,78	3,5	0,03	0,31
Caxumba	≥ 3.7	5,06	4,69	3,91	0,37	1,15
Rubéola	≥ 3,0	3,94	3,6	3,52	0,34	0,42

Figura 18. Resultados dos ensaios de estabilidade na temperatura de 25°C no período de 3 meses



— Especificação da Potência Viral (limite inferior)
— Potência da vacina cMRT_{Bio} obtida durante o estudo de estabilidade

5.6 DOCUMENTAÇÃO REFERENTE A ANÁLISE DA VACINA CANDIDATO A MRT

Os dados pertinentes ao MRT devem ser sumarizados no informe que acompanha o material. De acordo com as normas da OMS (2011), este documento deve incluir os seguintes dados: (1) condições de estocagem, (2) potência do padrão, (3) tipo de ensaio que deve ser utilizado, (4) instruções de reconstituição da vacina, (5) confirmação da estabilidade do MRT em condições de transporte, (6) informações relevantes de segurança, (7) informações para contato e (8) ficha de segurança. Seguindo as recomendações, foi elaborado o informe do MRT_{Bio}, cadastrado e designado como MRT(B)TVV01/13 (anexo 6).

Segundo os requerimentos das boas práticas de produção de produtos biológicos e instruções da OMS (2011), todos os frascos do MRT devem estar rotulados com as seguintes informações: nome do depositário, nome do material, algum código de acesso, potência estimada, temperatura de estocagem e os dizeres de “Não é para uso humano”. Neste caso o MRT estabelecido neste estudo para o ensaio de potência biológica da vacina tríplice viral, teve os valores de potência atribuídos em todos os componentes virais do material especificado no rótulo. Seguindo as recomendações, segue ilustrado na Figura 19, o modelo de etiqueta proposto para o MRT da vacina tríplice viral, designado de MRT(B)TVV01/13, após aprovação e qualificação das especificações exigidas para a produção do MRT.

Figura19. Modelo proposto para a rotulagem do MRT biológico de Bio-Manguinhos (MRT(B)TVV001/13)

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz	 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos
<p>Material de Referência de Trabalho Tríplice viral (caxumba, sarampo, rubéola) Potência: Sarampo 3,73 log₁₀ CCID₅₀/ DH Caxumba 4,75 log₁₀ CCID₅₀/ DH Rubéola 3,67 log₁₀ CCID₅₀/ DH Advertência: Não usar em humanos Av Brasil, 4365-Manguinhos/Rio de Janeiro/Brasil</p>	
<p>MRT(B)TVV01/13 Manter a -20°C FAB: 03/12</p>	

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizado o estabelecimento do primeiro MRT da vacina tríplice viral de Bio-Manguinhos, com o intuito de ser utilizado no ensaio de potência biológica dos lotes da vacina de TVV liberados pelo DEQUA. A iniciativa de nacionalização de um MRT faz parte do processo de transferência de tecnologia, uma vez que o atual MRT utilizado na liberação de lotes vacinais pela instituição é proveniente da empresa fornecedora da tecnologia, a GSK.

Segundo a OMS, os MRs utilizados nos laboratórios de controle de qualidade da indústria farmacêutica são necessários para testar e/ou calibrar, validar ou verificar uma amostra ou equipamento e instrumentos (WHO, 2007). Porém, os MRs biológicos compreendem materiais de alta complexidade, impactando num maior grau de incerteza, uma vez que os mesmos são caracterizados por ensaios biológicos ou imunobiológicos apropriados (WHO, 2007). Assim, além de fatores como procedência e lote dos reagentes, que podem impactar nos resultados, existem variações inerentes aos testes biológicos *in vivo* ou *in vitro*, que devem ser bem analisadas e controladas de modo a garantir a qualidade dos resultados obtidos.

Seguindo as premissas de produção e elaboração de MRs contidos em OMS (2004) e as adequações destas normas para materiais de referência secundários - OMS (2011) foi realizado o planejamento para o estabelecimento do candidato a MRT de Bio-Manguinhos, denominado, nesse momento, cMRT_{Bio}.

Apesar da fabricação de padrões de referência não exigirem a adesão das Boas Práticas de Fabricação (BPF), é importante que todo o processo de preparo do padrão seja controlado e documentado no contexto de um sistema de qualidade. Visto que o lote originário do cMRT_{Bio} corresponde a um lote da Tríplice viral comercial, foram realizadas avaliações no produto que demonstraram que todas as etapas relacionadas à produção se encontravam em consonância com as Boas Práticas de Fabricação e que o mesmo se encontrava dentro das especificações determinadas para a aprovação do produto. Essas avaliações prévias determinaram que o lote designado de 131VVA002Z poderia ser utilizado como um lote candidato a MRT para o teste de potência da Tríplice viral, cMRT_{Bio}. Apesar da não obrigatoriedade do cMRT_{Bio} ser originário de um lote comercial, os resultados de potência obtidos através da verificação com esse padrão puderam se aproximar mais do valor real de potência das vacinas destinadas ao

uso, uma vez que, outros componentes presentes na formulação e que poderiam vir a interferir na potência também estariam presentes neste lote.

Após a conclusão que o lote produzido para o preparo do MRT apresentou características como integridade, composição e potência em conformidade com as especificações exigidas, a etapa seguinte recomendada pela OMS para MR secundários é a calibração frente ao MRI. Especificamente, neste ensaio biológico para a avaliação da potência dos componentes virais da vacina tríplice, o MR é utilizado como controle positivo, ou seja, é um padrão para a determinação da eficácia do desempenho do ensaio. Assim, o MR é executado em paralelo com o lote de liberação para fins de determinação se o ensaio (corrida) em particular é válido, permitindo verificar se os valores de unidade atribuídos ao material também seriam encontrados. Além disso, tais valores devem ser utilizados como uma referência para usuários finais estimarem o valor de potência da amostra em teste.

Como preconizado pela OMS, é necessária a calibração do MRT frente ao MRI. Por isso, foi elaborado o desenho experimental cruzado, onde inicialmente realizou-se a análise de equivalência entre o MRI_{NIBSC} *versus* o atual MRT de Bio-Manguinhos, denominado de MRT_{GSK}. O desenho levou em consideração duas variáveis: a quantidade limitada do MRI destinada na caracterização e calibração dos padrões secundários e o tipo de calibração utilizado no ensaio de desempenho, que não requer precisão quantitativa conforme justificado anteriormente. Uma vez reafirmada à eficiência do MRT_{GSK} como controle do ensaio, este padrão de referência foi utilizado em todos os ensaios de determinação da potência dos componentes virais. A importância da recalibração do MRT_{GSK} frente ao MRI_{NIBSC} trouxe outra relevância: a revalidação do desempenho do ensaio de potência utilizado pela Instituição e previamente validado e protocolado junto a ANVISA, uma vez que tanto o MRI_{NIBSC} como o MRT_{GSK} (utilizado na rotina laboratorial) apresentaram resultados de potência dentro das especificações dos fornecedores.

Nesse sentido, os valores obtidos pelo MR a cada ensaio puderam ser avaliados utilizando uma importante ferramenta estatística: a confecção de cartas controle dos MRs para análise de tendências dos resultados e variações no processo de produção, sendo uma recomendação da OMS (WHO, 1997; 2009), os quais utilizamos neste trabalho como suporte para avaliação do perfil de variação do padrão de calibração fornecido pela GSK (MRT_{GSK}) utilizado neste estudo e na rotina de Bio-Manguinhos. A partir dos dados obtidos pela Instituição no ano de 2013, verificamos que os CVs inter-frasco dos componentes virais do MRT_{GSK} são de 4,24% para o vírus do sarampo, 2,69% para o vírus da caxumba e 4,15% para o vírus da rubéola. Estes resultados demonstram que o cMRT_{Bio} apresenta um comportamento

similar ao padrão de calibração do ensaio (MRT_{GSK}) com relação à variação, sendo um interessante ponto de referência interno para o estudo, uma vez que estes são dados provenientes de uma mesma rotina laboratorial.

Tendo conhecimento que as variações encontradas no MR podem ocorrer por alteração da atividade do produto, mas também do próprio método (insumos, reagentes, equipamentos, operadores, ambiente) além de outros fatores envolvidos, como linhagens celulares, optamos pelo uso de cartas controle dos MR, para avaliar as tendências dos resultados obtidos durante os ensaios de potência biológica dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$. Visto que as potências biológicas flutuam, principalmente, de acordo com os dias, sendo esta afirmativa embasada no perfil comparativo com a potência do controle MRT_{GSK} , analisamos as cartas controle do processo de caracterização do $cMRT_{Bio}$ pela diferença entre a sua potência estimada e a do MRT_{GSK} . Esta estratégia visou reduzir a interferência da variável dia na determinação dos limites de controle de 2 desvios-padrão 2DP e 3DP, parâmetros estes utilizados na realização de testes de desempenho (WHO, 1997; 2009). De acordo com os gráficos, verificamos que o desempenho dos testes estava sob controle estatístico, apresentando flutuações dentro dos limites esperados para um produto biológico avaliado por um ensaio biológico. Assim, esta ferramenta traz confiabilidade aos resultados declarados para as potências estimadas dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$ reforçando a conformidade do produto e assegurando a sua qualidade mas, principalmente, sendo mais um controle e critério de validação do ensaio e, conseqüentemente dos resultados obtidos com as amostras.

A utilização de MR certificados e com potência verificada é uma importante ferramenta que assegura a qualidade dos ensaios, porém a caracterização destes materiais frente ao ensaio biológico apresenta variações relativamente grandes na estimativa do conteúdo, não sendo recomendado que ele seja considerado um padrão de calibração certificado (WHO, 2011). Desta forma, em casos específicos, os valores atribuídos do MR devem ser usados somente como um guia para os usuários finais que podem precisar estimar o conteúdo desta preparação em seus próprios ensaios. Neste sentido, são geralmente utilizados como controle positivo sendo um componente da adequação do sistema. Quando usado para este propósito, o MR destina-se a verificar o desempenho de um método de análise de acordo com os parâmetros validados cada vez que ele é realizado, além do acompanhamento adequado do MR alertar para variações anormais no processo observado através dos gráficos de controle.

Seguindo as etapas de caracterização do lote $cMRT_{Bio}$, selecionamos 10 frascos aleatórios para o estudo de homogeneidade, avaliados em quadruplicatas. A variação entre as quadruplicatas (CV-intra-frasco) foi inferior a 5% e, entre os frascos (CV inter-frascos), inferior a 10%. As variações encontradas para todos os componentes virais foram consideradas de baixa relevância quando levamos em conta que o quantitativo aceitável para ensaios biológicos, segundo a OMS, é superior a 50%. Assim, a partir de análises estatísticas, considerando as variáveis importantes na determinação da homogeneidade do lote, consideramos o lote $cMRT_{Bio}$ como homogêneo.

Para a avaliação da potência biológica dos vírus que compõem o $cMRT_{Bio}$, optou-se pela avaliação da potência entre frascos e intra-frascos, para ter um suporte quantitativo de valores de potência que reflitam o valor estimado mais próximo ao real e com menos interferentes, uma vez que as variáveis decorrentes do perfil biológico do ensaio justificam estas variações. Em um primeiro momento, realizamos uma análise de comportamento entre as médias dos frascos do MRT_{Bio} e MRT_{GSK} e verificamos que as potências oscilam de acordo com o dia, sendo este perfil pareado com o padrão MRT_{GSK} . De posse deste entendimento, optamos em realizar uma análise das variáveis que influenciam, principalmente, os limites de potência, utilizando o cálculo de efeitos aleatórios, levando em consideração as variáveis dia, inter-frascos e intra-frascos. Uma vez ajustada a potência e seus limites através de cálculos estatísticos, determinamos a potência estimada de cada componente viral do $cMRT_{Bio}$ em: $3,73 \log_{10} CCID_{50} / DH$ para o vírus do sarampo, $4,75 \log_{10} CCID_{50} / DH$ para o vírus da caxumba e $3,67 \log_{10} CCID_{50} / DH$ para o vírus da rubéola (Tabela 14).

De modo a determinar a consistência dos valores de potência estimados, o cálculo do CV foi realizado para todos os componentes da vacina, sendo observado que os valores foram inferiores a 5% para o CV intra-frasco e menores que 10% para o CV inter-frascos, levando em consideração o aceitável pela OMS, estas pequenas variações intrínsecas e características de ensaios biológicos são justificadas. Corroborando com estes dados, o desvio padrão de todos os ensaios foi menor que 0,5 para todas as fontes de variação (entre dias, inter-frascos e intra-frasco), porém, esta fonte de variação não representa um valor referencial, o que dificulta um pouco sua interpretação. Assim, visto que não existe um padrão de variação definido e por se tratar de um ensaio biológico, consideramos que os valores de CV e desvios encontrados nas variáveis avaliadas são insignificantes, ponderando os valores aceitáveis pela OMS (1997). Isto reforça que os valores encontrados neste trabalho trazem grande credibilidade a potência estimada para os componentes virais do MRT_{Bio} .

Devido à falta de parâmetro da variabilidade aceitável para MR biológicos, a proposta de que o índice de 10% de variação seria um ótimo resultado de confiança dos testes foi reforçada por alguns estudos colaborativos descritos na literatura. Baseado nestes dados verificamos que a consistência da potência viral da vacina tríplice viral oriunda de diferentes laboratórios produtores foi determinada pelo cálculo do CV, sendo observados valores de até 7,7% para sarampo, 11,6 % para o vírus da caxumba e 11,7% para o vírus da rubéola quando analisadas as diferentes vacinas e de 10,8% para sarampo, 16,9 % para o vírus da caxumba e 13,7% para o vírus da rubéola quando avaliada a média do padrão de referência NIBISC entre os laboratórios participantes do estudo colaborativo (Forsey et al., 1993). Em contrapartida, os CVs encontrados neste estudo foram de 2,5% para o vírus do sarampo, 7,1% para o vírus da caxumba e 1,8% para o vírus da rubéola demonstrando que o $cMRT_{Bio}$ apresenta consistência da potência estimada com pouca variabilidade. Porém, a maior variabilidade encontrada no trabalho supracitado pode ser decorrente da pouca consistência entre os laboratórios envolvidos neste estudo colaborativo, sendo este perfil de variação já relatado previamente em um estudo internacional, variações aceitáveis pela OMS de: $1.0 \log_{10}$ para sarampo, $2.0 \log_{10}$ para caxumba e $2.0 \log_{10}$ para rubéola.

De modo a minimizar as variações inerentes ao teste, optou-se por fazer a análise de modelos aleatórios que retiram os possíveis interferentes. No componente sarampo, foi verificado que a maior fonte estimada de variabilidade foi entre dias, similar ao observado para a rubéola. Em contrapartida, considerando o vírus da caxumba, a maior fonte estimada de variabilidade foi entre frascos, porém o valor encontrado para o CV foi de 7%. De acordo com Forsey e colaboradores (1993), verificou-se através da análise de CV do MRI_{NIBISC} que o componente viral da caxumba apresenta maior variação percentual do CV, quando comparado com os outros componentes, reforçando a tendência dos dados encontrados neste estudo.

A determinação da estabilidade de MRs avaliada pela perda da atividade de potência é uma variável a ser determinada, conforme recomendação da OMS. Assim, variáveis como tempo e temperatura foram avaliados como fatores importantes para a atividade biológica deste material. Seguindo a exigência da Farmacopéia Brasileira, foi realizado o estudo de termoestabilidade, no qual o material foi desafiado a uma temperatura de $37^{\circ}C$ por 7 dias. Após este período comparou-se com a temperatura de armazenamento da vacina de $2-8^{\circ}C$. Os resultados estatísticos mostraram perda não significativa da potência dos componentes virais, estando todos dentro dos limites especificados para a vacina.

Através de abordagem mais detalhada do efeito da temperatura e tempo frente ao material, foi realizado o estudo de estabilidade utilizando as duas temperaturas no processo de estocagem e armazenamento do MRT: 2-8°C e -20°C, conforme recomendado pela Farmacopéia Brasileira e OMS (2011). O percentual de perda de potência da amostra foi estimado em comparação com outra estocada na condição de 2 a 8°C, uma vez que esta mesma recomendação é seguida pelo produtor na avaliação dos resultados do estudo de estabilidade quando o MRT é proveniente de um lote da vacina.

De modo a comparar os resultados obtidos nesta dissertação com aqueles do estudo de estabilidade realizado pela Instituição produtora, optamos por considerar a temperatura recomendada pelo fabricante como temperatura de referência. De acordo com os resultados, foi verificado uma perda estatisticamente insignificante da potência dos vírus componentes do cMRT_{Bio}, estando os valores abaixo de 1 log₁₀ CCID₅₀/DH. Estes resultados foram comparados e complementados com o estudo de estabilidade realizado por Bio-Manguinhos de lotes produzidos anteriormente, conforme sugerido pela OMS (2011), objetivando prever a estabilidade deste lote produzido. Assim, baseado em estudo preliminar, podemos estimar que o cMRT_{Bio} apresenta estabilidade funcional de três anos. Entretanto, o perfil da potência biológica do cMRT_{Bio} deverá ser acompanhado na temperatura de armazenamento prescrito pela OMS (-20°C) através de cartas controle e, quando necessário, revalidados frente ao MRI, conforme preconizado pela OMS.

A fim de complementar os estudos de estabilidade, foram realizados ensaios acelerados, no qual o cMRT_{Bio} foi armazenado a 25°C por até três meses. De acordo com os resultados, verificamos que apesar do título da potência de todos os componentes virais ainda se encontrarem dentro dos limites especificados pela Farmacopéia Brasileira, o componente caxumba apresentou-se fora das especificações no quesito decaimento de potência, sendo este comportamento apenas observado no terceiro mês de análise, estando os resultados obtidos nos períodos anteriores em concordância com as especificações da vacina. Tal fato, não reflete negativamente sobre a validação do MRT, uma vez que é recomendável estocar o produto em temperaturas elevadas por um período de tempo predefinido, normalmente de 1 a 8 semanas, estando o nosso desenho experimental avaliando períodos mais prolongados (Armstrong, 2001). Desta forma, esta análise comportamental aponta que o material possui tendência em declinar na sua atividade biológica na condição de estresse especificada, perfil esperado por se tratar de uma vacina atenuada.

Ainda de acordo com os resultados obtidos na dissertação, verificamos que o cMRT_{Bio} apresentou todas as características exigidas para ser utilizado como MRT, sendo este material protocolado na Instituição como MRT(B)TVV001/13. Atendendo as recomendações da OMS (2011) foi proposta a elaboração de um material de rotulagem e instruções de uso, de modo a tornar o material rastreável no departamento de qualidade de Bio-Manguinhos.

Apesar de a OMS explicitar que é possível a elaboração do MRT sem o estudo colaborativo quando se trata de um grande e único produtor da vacina em âmbito nacional, encontra-se em andamento o estudo colaborativo com o INCQS, laboratório responsável pelo controle nacional de produção de vacinas, de modo a fortalecer o estudo e enriquecer o trabalho que se encontra em processo de preparo para submissão.

7 CONCLUSÃO

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

O lote designado de 131VVA002Z utilizado como cMRT_{Bio} para o teste de potência da vacina tríplice viral apresentou características como integridade, composição e potência em conformidade com as especificações exigidas pela OMS;

1. No estudo de homogeneidade os resultados intra e inter-frascos foram considerados homogêneos, com coeficientes de variação inferiores a 10%, correspondendo a faixa esperada para o limite de aceitação. Sendo as suposições do modelo de homocedasticidade e normalidade válidas e o lote sendo HOMOGÊNEO;
2. A potência estimada de cada componente viral do cMRT_{Bio} foi de: 3,73 log₁₀ CCID₅₀/ DH para o vírus do sarampo, 4,75 log₁₀ CCID₅₀/ DH para o vírus da caxumba e 3,67 (log₁₀ CCID₅₀/ DH) para o vírus de rubéola, correspondendo a faixa prevista nas especificações;
3. As cartas de controle foram consideradas uma importante ferramenta para a confiabilidade do resultado da potência estimada dos componentes virais do cMRT_{Bio} que demonstrou que o processo de medição está sob controle estatístico;
4. No estudo de estabilidade de longa duração, verificamos que as potências dos vírus componentes do lote cMRT_{Bio} não apresentaram decaimento relevante das potências dos componentes virais se mantendo dentro das especificações previstas, assim, podemos prever que o cMRT_{Bio} deverá apresentar uma estabilidade funcional de três anos.

8. REFERÊNCIAS

ACHARYA, A.; DIAZ- ORTEGA, J. L.; TAMBINI, G.; QUADROS, C.; ARITA, I. Cost-effectiveness of measles elimination in Latin America and the caribbean: a prospective analysis. **Vaccine**, EUA, v. 10, n. 20, p. 3332- 3341, set. 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Agenda Nacional de Prioridades em Vigilância Sanitária. **Núcleo de Educação, Pesquisa e Conhecimento – NEPEC/ANVISA**. Brasília, 2011.

ARMSTRONG, P. In vitro diagnostic reagent, calibrator and control material stability. **In vitro veritas**, v.2, 2001. Disponível em: <[http://www.22: < accllc.cat>](http://www.22.accllc.cat)>. Acesso em: 12 de janeiro de 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 30**: Termos e Definições Relacionados com Materiais de Referência. Rio de Janeiro, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 31**: Conteúdo de Certificados de Materiais de Referência. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 32**: Calibração em química analítica e uso de materiais de referência. Rio de Janeiro, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 33**: Utilização de materiais de referência certificados. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 34**: Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 35**: Utilização de materiais de referência: princípios gerais e estatísticos para certificados. Rio de Janeiro, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

AZEVEDO, N. Bio-Manguinhos na origem: um capítulo da história da auto-suficiência tecnológica em saúde no Brasil. In: AZEVEDO, N. **Inovação em saúde: dilemas e desafios de uma instituição pública**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2007. p. 53 – 82.

BANATVALA, J. E.; BROWN, D. W. G. Rubella. **The Lancet**, v. 363, n. 9415, p. 1127-1137, abril. 2004.

BANKAMP, Bettina et al. Genetic characterization of measles vaccine strains. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. suppl 1, p. S533-S548, 2011.

BENCHIMOL, J. L. **Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001.

BEST, J. M. Rubella. In: **Seminars in fetal and neonatal medicine**. WB Saunders, 2007. p. 182-192.

BIO-MANGUINHOS; 2002. **Home Page**. Disponível em:<<http://www.bio.fiocruz.br>>. Acesso em: 08agosto de 2013.

BIO-MANGUINHOS; 2003. **Home Page**. Disponível em:<<http://www.bio.fiocruz.br>>. Acesso em: 08agosto de 2013.

BIO-MANGUINHOS; 2010. **Home Page**. Disponível em:<<http://www.bio.fiocruz.br>>. Acesso em: 08agosto de 2013.

BRASIL. DECRETO Nº 78.231, DE 12 DE AGOSTO DE 1976. Dispõe Sobre a Organização das Ações de Vigilância Epidemiológica, Sobre o Programa Nacional de Imunizações, Estabelece Normas Relativas a Notificação Compulsória de Doenças, e da Outras Providencias.**Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 12 de agosto de 1976. Disponível em: <www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/.../index.php?p=5700>. Acesso em: 10 de outubro de 2012.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Sistema de Avaliação da Conformidade de Material Biológico**. Brasília, SENAI/DN, 2002. 102p. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/Temas/Desenv/MaterialBiologico.pdf>>. Acesso em: 30 outubro de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Imunizações 30 anos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003a. 212 p.

BRASIL. Lei nº 10.742, de 06 de outubro de 2003b. Define normas de regulação para o setor farmacêutico, cria a Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos - CMED e altera a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 06 out. 2003b. p.12647. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos++Comercializacao++Pos+Uso/Regulacao+de+Mercado/Assunto+de+Interesse/Legislacao+da+CMED/Leis,+Medidas+Provisorias+e+Decretos>>. Acesso em: 22 maio de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005a. p.656-657. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005b. p.652-672. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 315, de 23 de outubro de 2005c. Dispõe sobre o regulamento técnico de registro, alterações pós-registro e revalidação de registro de produtos biológicos terminados. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 31 out. 2005. Suplemento ANVISADOU1, n. 209, p.58. 2005c. Disponível em:<http://bvs/saudelegis/2005/res0315_26_10_2005.http>. Acesso em: 23 abril de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º73, de 21 de outubro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 22 out. 2008. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/15056-73.html>>. Acesso em: 23 abril de 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Saúde. **Doenças de Notificação**. Brasília, 2008 a. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em: 23 set.2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 17, de 16 de abril de 2010a. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 abr. 2010. Seção 1, n.73, p.94. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/17_99rdc.htm>. Acesso em: 21 abril de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 55, de 16 de dezembro de 2010b. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 dez. 2010. Seção. 1, n. 241, p. 110. Disponível em:<http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl_1307385325.pdf>. Acesso em: 23 março de 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica N.º **6/2011/CGDT- CGPNI/DEVEP/SVS/MS**: Recomendações frente aos cenários epidemiológicos internacionais e nacionais de sarampo e rubéola, 2011. CARBONE, K. M.; WOLINSKY, J.S. Mumps Virus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins Publishers, Cap.43, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 50, de 20 de setembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, 22 set. 2011; Seção 1, n.183, p.694.

CASTILLO-SOLÓRZANO, Carlos et al. New horizons in the control of rubella and prevention of congenital rubella syndrome in the Americas. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. Supplement 1, p. S146-S152, 2003.

CDC - Center for Diseases Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-preventable Diseases*. Atlanta, p. 67-83, 2000.

CDC - Center for Diseases Control and Prevention. Update: global measles control and mortality reduction – worldwide. Atlanta, p. 471-475, 1991 – 2001.

CHANTLER, J.; WOLINSKY, J. S.; TINGLE, A. Rubella Virus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. Cap.31.

COONEY, MARION K.; FOX, JOHN P.; HALL, CARRIE E. The Seattle virus watch VI. Observations of infections with and illness due to parainfluenza, mumps and respiratory syncytial viruses and Mycoplasma pneumoniae. **American journal of epidemiology**, v. 101, n. 6, p. 532-551, 1975.

COTTA, J. A. B. **Estudo da homogeneidade e atribuição de valores e incertezas certificados a um material de referência de basalto (BRP-1 basalto de Ribeirão Preto)**. 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Geociências) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

Dados históricas e eventos relacionados às vacinas e imunização no mundo. Disponível em: <<http://www.immunize.org/timeline/>>. Acesso em: 23 de outubro de 2013.

DATASUS. Ministério da Saúde/SVS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Disponível em:< <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0101.def>>. Acesso em:02 de janeiro de 2014.

DECKER, M. D.; EDWARDS, K. M. Combination Vaccines. In: Plotkin, S. A.; Orenstein, W. A. **Vaccines**, 3. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999. P. 508–530.

ECDC - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Monthly measles and rubella monitoring**. Stockholm, June. 2013. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Measles-rubella-monitoring_June_2013.pdf>. Acesso em: 08 de agosto de 2013.

EHRETH, Jenifer. The value of vaccination: a global perspective. **Vaccine**, v. 21, n. 27, p. 4105-4117, jan. 2003.

ENDERS, J. F. Mumps: techniques of laboratory diagnosis, tests for susceptibility, and experiments on specific prophylaxis. **The Journal of pediatrics**, v. 29, n. 2, p. 129-142, 1946.

ENDERS, J. F. et al. Studies on an attenuated measles-virus vaccine: Development and preparations of the vaccine: Technics for assay of effects of vaccination. **New England Journal of Medicine**, v. 263, n. 4, p. 153-159, 1960.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. Ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FEIJÓ, R.B.; SÁFADI, M.A. Immunizations: three centuries of success and ongoing challenges, **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3 (Supl), p.51-53, 2006.

FERNANDES, Tania. Vacina antivariólica: seu primeiro século no Brasil (da vacina jenneriana à animal). **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, Rio de Janeiro , v. 6, n. 1, p.29-51, Jun. 1999 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010459701999000200002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 março de 2013.

FOLB et al. A Global Perspective on Vaccine Safety and Public Health: The Global Advisory Committee on Vaccine Safety. **American Journal of Public Health**, Geneva, v. 94, n. 11, p. 1926-1931, Nov. 2004. Disponível em:

<http://www.who.int/vaccine_safety/about/en/vaccine.pdf>. Acesso em: 26 de outubro de 2012.

FORSEY, T. et al. A European collaborative study to assess the proficiency of laboratory estimates of potency of live measles, mumps and rubella tri-valent vaccines. **Biologicals**, v. 21, n. 3, p. 239-49, 1993.

GALASKA, A. M., ROBERTSON, S. E.; KRAIGER, A. Mumps and mumps vaccine: A global review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 1, p. 3-14, 1999.

Glaxo SmithKline Brasil Ltda. Assuntos Regulatórios. Documentação Técnica – Vacina combinada contra Sarampo, Caxumba e Rubéola. Rio de Janeiro: 2003

GRIFFIN, D.E. Measles Virus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. Cap.44.

HABEL, Karl. Cultivation of mumps virus in the developing chick embryo and its application to studies of immunity to mumps in man. **Public Health Reports (1896-1970)**, p. 201-212, 1945.

HABEL, KARL. Vaccination of human beings against mumps: Vaccine administered at the start of an epidemic I. Incidence and severity of mumps in vaccinated and control groups. **American Journal of Epidemiology**, v. 54, n. 3, p. 295-311, 1951.

HERSH, Bradley S. et al. Review of regional measles surveillance data in the Americas. **The Lancet**, Washington, v. 355, n. 9219, p. 1943-1948, Jun. 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02325-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02325-4)>. Acesso em: 26 de outubro de 2012.

HINMAN, Alan R. Rubella and the Americas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 14, n. 5, p. 298-299, Nov. 2003. Disponível em: <http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102049892003001000002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 de Fevereiro de 2013.

HINMAN, Alan R. Rubella vaccination strategy. **Jornal de pediatria**, v. 83, n. 5, p. 389-391, 2007.

HISTÓRIA DAS VACINAS, 2012. Disponível em: <<http://www.vacinas.com.pt/vacinas/historia-das-vacinas>>. Acesso em 10 de outubro de 2013.

ILAC. **Guideline for the in-house Production of reference Materials**. LGC/VAM/1998/040, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Apresentação**. Rio de Janeiro, 2008 a. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/Index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57>. Acesso em: 17 julho de 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Análises – Produtos Biológicos**. Rio de Janeiro, 2008b. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=87&Itemid=57>.

mid=95>. Acesso em: 17 julho de 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA.
Orientações para seleção e uso de materiais de referência. DOQ-CGCRE - 016; 2005.

ISHIKAWA, K. et al. Mass balance method for purity assay of phthalic acid esters: development of primary reference materials as traceability sources in the Japan Calibration Service System. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 16, p. 311-322, 2009.

ISO 17511. In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials, 2003.

KATZ, S.L.; MILOVANOVIC, M. V.; ENDERS, J. F. Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 97, n. 1, p. 23-29, 1958.

KATZ, S. L., ENDERS, J. F. Measles virus vaccine—a reminiscence. In: Springer Berlin Heidelberg. **Measles**. V. 329, p. 3-11, 2009.

KRUGMAN, S. Posibilidades de vacunacion contra la rubéola. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**. jul. 1967.

LEE, J. Y.; BOWDEN, D. S. Rubella virus replication and links to teratogenicity. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 571-587, 2000.

LEVI, G. C.; KALLÁS, E. G. Varíola, sua prevenção vacinal e ameaça como agente de bioterrorismo. **Rev Assoc Med Bras**, v. 48, n. 4, p. 357-362, 2002.

LEVITT, Lawrence P. et al. Mumps in a general population: A sero-epidemiologic study. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 120, n. 2, p. 134, 1970.

LINDEGREN, M. L. et al. Update: Rubella and congenital syndrome 1980-1990. **Epidemiologic Reviews**, v. 13, n. 1, p. 341-348, 1991.

LINSINGER, T. P. J. et al. Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation Quality Assurance**, v. 6, p. 20-25, 2001.

MARTINS, R. M.; MAIA, M. L. S.; HOMMA, A. Breve História das Vacinações. In: FARHAT, C. K.; WECKX, L. Y.; CARVALHO, L. H.; SUCCI, R. C. **Imunizações: fundamentos e práticas**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, cap. 1, p. 3-23, 2008.

MEYER, Mary B. An epidemiologic study of mumps; its spread in schools and families. **American Journal of Epidemiology**, v. 75, n. 2, p. 259-281, 1962.

MEYER, H. M., PARKMAN, P. D., HOBBS, T. E. Attenuated rubella virus: laboratory clinical characteristics. **American Journal of Diseases of Children**, v. 118, n. 2, p. 155-165, 1969.

- MILLER, E. MMR vaccine: review of benefits and risks. **Journal of Infection**, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2002.
- MILOVANOVIC, M. V., ENDERS, J. F.; MITUS, A. Cultivation of measles virus in human amnion cells and in developing chick embryo. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 95, p. 120-127, 1957.
- MODLIN, J. F.; ORENSTEIN, A.; BRANDLING-BENNETT, A. David. Current status of mumps in the United States. **Journal of Infectious Diseases**, v. 132, n. 1, p. 106-109, 1975.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, p. 680, 2008.
- MORGAN, E. M.; RAPP, F. Measles Virus and its Associated Diseases. **Bacteriological Reviews**, EUA, v. 41, n. 3, p.636-666, set. 1977.
- NETTO, E. J. R. et al. Avaliação do controle da qualidade realizado nos produtos vacinais para sarampo, caxumba, rubéola utilizados no Programa Nacional de Imunizações do Brasil no período de 1999 a 2007. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, n. 3, p. 408-414, 2010.
- OSTER, N.V. et al. International importation of measles vírus – United States, 1993 – 2001. **Journal of Infectious Diseases** , v.189, n. Supplement 1, p. S48 – 53, 2004.
- PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Measles/Rubella Weekly Bulletin, vol. 19, nº 29, July 20, 2013. Disponível em:< <http://new.paho.org/>>. Acessado em: 10 de agosto, 2013.
- PONTE, C. F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, V. 10, n. Supl. 2, p. 619-653, 2003.
- PEEBLES, T. C., MCCARTHY, K.; ENDERS, J. F.; Holloway, A. Behavior of monkeys after inoculation of virus derived from patients with measles and propagated in tissue culture together with observations on spontaneous infections of these animals by an agent exhibiting similar antigenic properties. **J. Immunol**, v. 78, n. 1, p. 63-74, 1957.
- PINHEIRO, J.; BATES, D. **Mixed-Effects Models in S and S-PLUS (Statistics and Computing)**. 1ed. Springer, 530 p, 2009.
- PLOTKIN, A. S. Mumps Vaccine. In: PLOTKIN, A. S.; ORESTEIN, A. W. **Vaccines**. 4. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2004. cap.20.
- PLOTKIN, A. S. REEF, S. Rubella Vaccine. In: PLOTKIN, A. S.; ORESTEIN, A. W. **Vaccines**. 4. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2004. cap.26.
- PLOTKIN, A. S. Rubella eradication. **Vaccine**, v. 19, n. 25, p. 3311-3319, 2001.
- PREBLUD, S. R. et al. Rubella vaccination in the United States: a ten-year review. **Epidemiologic reviews**, v. 2, p. 171-194, 1980.
- PURGACHEV, K. V.; ABERNATHY, E. S.; FREY, T. K. Genomic Sequence of the RA27/3 Strain of Rubella Virus. **Archives of Virology**, v. 142, n. 6, p.1165-1180, fev. 1997.

QUADROS, C. A. et al. Measles eradication in the Americas: progress to date. **Journal of infectious diseases**, v. 189, n. Supplement 1, p. S227-S235, 2004.

QUADROS, C. A. **Vacinas: Prevenindo a Doença & Protegendo a Saúde**. Editora Roca, 2008.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org/>. 2012.

SCHLESINGER & SCHLESINGER, M. J. Togaviridae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lipincott-Raven Publishers, 2001. Cap.29.

SHAPIRO, S. S. & WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES (SI), 6a edição, Inmetro- CNI- Senai, Brasília, 2000.

SOUZA, V. et al. Evaluation of the stability of ethanol in water certified reference material: measurement uncertainty under transport and storage conditions. **Accreditation Quality Assurance**, v. 13, p. 717-721, 2008.

STRATEN, M. R.; TYRING, S. K. **Rubella**. **Dermatologic clinics**, v. 20, n. 2, p. 225-231, 2002.

STREBEL, P. M.; PAPANIA, M.J.; HAISEY, N. A. Measles Vaccine. In: PLOTKIN, A. S.; ORESTEIN, A. W. **Vaccines**. 4. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2004. cap.19.

TECNOLOGIA, Inmetro et al. Vocabulário Internacional de Metrologia—Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012).

TEIXEIRA, L. A.; ALMEIDA, M. de: Os primórdios da vacina antivariólica em São Paulo: uma história pouco conhecida. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 10, p. 475-498, 2003.

TEMPORÃO, J. G. O Programa Nacional de Imunizações (PNI): origens e desenvolvimento. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, p. 601-617, 2003.

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.; CAVALHEIRO, J.R. (Org). **Vacinas, soros e imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, cap. 5, 2005.

THE UNITED States pharmacopeia 32. National formulary 27: 32. Rockville: U. S. Pharmacopeia, 2009. 3 v.

USP COUNCIL OF EXPERTS; USP REFERENCE STANDARDS COMMITTEE; WALTER W. HAUCK. Primary and Secondary Reference Materials for Procedures to Test the Quality of Medicines and Foods. **Springer**, v. 29, p. 922–931, 2012.

VAN DER VEEN, A. M. H. et al. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study. **Accreditation Quality Assurance**, v. 6, p. 257-263, 2001.
VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia. Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados, 2012. Disponível em:

< http://www.inmetro.gov.br/noticias/verNoticia.asp?seq_noticia=3400>. Acesso em : 20 de julho de 2013.

VISSER, L. E. et al. An outbreak of mumps in the Province of Leon, Spain 1995-1996. **Eurosurveillance**. V. 3, n. 2, p. 14-8, 1998.

WEBSTER, William S. Teratogen update: congenital rubella. **Teratology**, v. 58, n. 1, p. 13-23, 1998.

WOLINSKY, J. S.; SERVER, A. C. Mumps virus. **Virology**, v. 1, p. 1243-1265, 1996.

ZELENY, R. et al. Development of a certified reference material for the content of nitroimidazole parente drugs and hydroxy metabolites in pork meat. *Analytica Chimica Acta*, v. 634, p. 237-242, 2009.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing congenital rubella syndrome. **Weekly Epidemiological Record**, v. 36, n.75, p.: 290-295, 2000.

WHO-WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION. MEETING. **WHO Expert Committee on Biological Standardization: Fifty- fifth Report**. World Health Organization, n. 932, 2004.

WHO-WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION. MEETING. **WHO Expert Committee on Biological Standardization: Fifty-fourth Report**. World Health Organization, n. 927, 2005.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Reports Series, **Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards**. n. 932, 2006.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: forty-first report**. World Health Organization, n. 943, p. 1-156, 2007.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Mumps Vaccine**. USA, 2009. Disponível em:< http://www.who.int/vaccines-diseases/diseases/mumps_vaccine.shtm>. Acesso em: 10 de julho de 2012.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Immunization, Vaccines and Biologicals**. 2010. Disponível em:< <http://www.who.int/immunization/topics/measles/en/index.html>>. Acesso em: 15 de agosto de 2012.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Immunization surveillance, assessment and monitoring**. 2011a. Disponível em:
<http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/measles/en/ - 23k>. Acesso em: 10 de setembro de 2012.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Measles Surveillance**. 2011b. Disponível em: <http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/big_measlesreportedcases6months_PDF.pdf>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2012.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manual for the establishment of the national and other secondary standard for vaccines**. Geneva, World Health Organization, WHO/IVB/11.03 . June 2011c.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Immunization surveillance, assessment and monitoring**, 2012a. Disponível em: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/en/>. Acesso em: 30 de dezembro 2012.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Measles outbreaks: Regions of the Americas, Europe and Africa**, 2012b. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/2011_10_07/en/>. Acesso em: 26 de outubro de 2012.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Press release: **WHO warns of increased risk of disease epidemics in Syria and in neighbouring countries as summer approaches**. June, 2013. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/press-releases/2013/disease-epidemics-syria.html>>. Acesso em: 20 de agosto de 2013.

YORKE, JAMES A.; LONDON, WAYNE P. Recurrent outbreaks of measles, chickenpox and mumps II. Systematic differences in contact rates and stochastic effects. **American Journal of Epidemiology**, v. 98, n. 6, p. 469-482, 1973.

ANEXO

ANEXO 1 - Especificação da Vacina tríplice viral candidata a MRT_{Bio}

CERTIFICADO DE ANÁLISE vacina sarampo, caxumba, rubéola 10 doses	DI: 5545
	Número do lote: 131VVA002Z

Nome do produto: **vacina sarampo, caxumba, rubéola 10 doses**

Número do lote: **131VVA002Z**

PRODUTO ACABADO - vacina sarampo, caxumba, rubéola 10 doses

TESTES	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Sulfato Neomicina	< 25 µg/dose.	Satisfatório
Umidade Residual	<= 2,5 %	1,80 %
Aspecto	Pastilha móvel, inteiriça de coloração alaranjada. Após reconstituição da forma liofilizada o sólido deve estar completamente dissolvido não deixando resíduos visíveis nem materiais insolúveis e a solução reconstituída deve estar alaranjada, límpida e livre de partículas estranhas observáveis na inspeção visual.	Satisfatório
pH	Entre 6,5 e 7,5	7,3
Esterilidade	Ausência de crescimento microbiano	Satisfatório
Identidade - Componente Caxumba	Positivo	Satisfatório
Identidade - Componente Rubéola	Positivo	Satisfatório
Identidade - Componente Sarampo	Positivo	Satisfatório
Potência - Componente Caxumba	>= 3,7 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH	5,06 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH
Termoestabilidade - Componente Caxumba	>= 3,7 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH	4,70 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH
Potência - Componente Rubéola	>= 3,0 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH	3,94 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH
Termoestabilidade - Componente Rubéola	>= 3,0 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH	3,64 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH
Potência - Componente Sarampo	>= 3,0 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH	3,81 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH
Termoestabilidade - Componente Sarampo	>= 3,0 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH	3,45 Log ₁₀ CCID ₅₀ /DH
Toxicidade Inespecífica	O peso de cada animal tem que ser superior ao peso inicial. Nenhum animal pode morrer ou apresentar qualquer alteração no estado de saúde durante o período de observação.	Satisfatório

Observação: -- X --

Informação Complementar: ---X---

CONCLUSÃO: - X --

Certificado de análise: vacina sarampo, caxumba, rubéola 10 doses
Gerado em: 16/9/2013 às 14:16 hs

C036fc8a8b-c9db-4438-8e02-948d0e3bc332

Data da aprovação DI 15/07/2013	Revisão 01	Página 2 / 13
------------------------------------	---------------	------------------

ANEXO 2 – Especificação do Material de Referência Internacional (Caxumba)



**WHO Reference Reagent
1st International Reference Reagent for Mumps Vaccine
NIBSC code: 901634
Instructions for use
(Version 3.0, Dated 03/03/2008)**

1. INTENDED USE

This international standard is the 1st International Reference Reagent of Mumps Vaccine (Live), established by the WHO Expert Committee on Biological Standardisation (ECBS) in 1994.

2. CAUTION

This preparation is not for administration to humans.

The preparation contains material of human origin, and either the final product or the source materials, from which it is derived, have been tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and HCV RNA. As with all materials of biological origin, this preparation should be regarded as potentially hazardous to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures should include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols. Care should be exercised in opening ampoules or vials, to avoid cuts.

3. UNITAGE

On the basis of the results of a collaborative study the Committee assigned a titre of $4.5 \log_{10}$ to the contents of each ampoule. For practical purposes the titre may be taken as the equivalent of 40,000 infectious units per ampoule.

4. CONTENTS

Country of origin of biological material: United Kingdom

Each ampoule contains a freeze-dried residue comprising, under an atmosphere of nitrogen:

- mumps virus Urabe strain, prepared in chicken cell cultures
- stabiliser
- human serum albumin
- neomycin

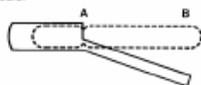
5. STORAGE

Unopened ampoules should be stored at -20°C or below.

Please note: because of the inherent stability of lyophilized material, NIBSC may ship these materials at ambient temperature.

6. DIRECTIONS FOR OPENING

Tap the ampoule gently to collect the material at the bottom (labelled end). Ensure ampoule is scored all round at the narrow part of the neck. Use a diamond or tungsten carbide tipped glass knife file or other suitable implement before attempting to open. Place the ampoule in the ampoule opener, positioning the score at position 'A'; shown in the diagram below. Surround the ampoule with cloth or layers of tissue paper. Grip the ampoule and holder in the hand and squeeze at point 'B'. The ampoule will snap open. Take care to avoid cuts and projectile glass fragments that enter eyes. Take care that no material is lost from the ampoule and that no glass falls into the ampoule.



Side view of ampoule opening device containing an ampoule positioned ready to open. 'A' is the score mark and 'B' the point of applied pressure.

7. USE OF MATERIAL

No attempt should be made to weigh out any portion of the freeze-dried material prior to reconstitution.

Dissolve the total contents of the ampoule with 0.5ml of sterile distilled water. Rinse the ampoule with about 0.4ml of sterile distilled water and make up the total volume to 1.0ml with water. This solution will contain mumps virus at a concentration of 40,000 infectious units/ml.

8. STABILITY

Reference materials are held at NIBSC within assured, temperature-controlled storage facilities. Reference Materials should be stored on receipt as indicated on the label.

NIBSC follows the policy of WHO with respect to its reference materials.

9. REFERENCES

a) World Health Organisation, Expert Committee on Biological Standardisation, (1995) WHO Technical Report Series, 45th meeting.

b) Unpublished document (1994), a copy of which may be obtained by making application to this Institute.

10. ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable

11. FURTHER INFORMATION

Further information can be obtained as follows:

This material: enquiries@nibsc.org

WHO Biological Standards:

<http://www.who.int/biologicals/en/>

JCTLM Higher order reference materials:

<http://www.bipm.org/en/committees/cjctlm/>

Derivation of International Units:

http://www.nibsc.org/products/biological_reference_materials/frequently_asked_questions/how_are_international_units.aspx

Ordering standards from NIBSC:

http://www.nibsc.org/products/ordering_information/frequently_asked_questions.aspx

NIBSC Terms & Conditions:

http://www.nibsc.org/terms_and_conditions.aspx

12. CUSTOMER FEEDBACK

Customers are encouraged to provide feedback on the suitability or use of the material provided or other aspects of our service. Please send any comments to enquiries@nibsc.org

13. CITATION

In all publications, including data sheets, in which this material is referenced, it is important that the preparation's title, its status, the NIBSC code number, and the name and address of NIBSC are cited and cited correctly.

14. MATERIAL SAFETY SHEET

Physical and Chemical properties	
Physical appearance: Lyophilised powder	Corrosive: No
Stable: Yes	Oxidising: No
Hygroscopic: No	Irritant: No



National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG
WHO International Laboratory for Biological Standards, UK Official Medicines Control Laboratory



T +44 (0)1707 641000
nibsc.org



Flammable: No	Handling: See caution, Section 2	18. INFORMATION FOR CUSTOMS USE ONLY Country of origin for customs purposes*: United Kingdom * Defined as the country where the goods have been produced and/or sufficiently processed to be classed as originating from the country of supply, for example a change of state such as freeze-drying. Net weight: 0.1g Toxicity Statement: Non-toxic Veterinary certificate or other statement if applicable. Attached: No
Other (specify):	Contains material of human origin	
Toxicological properties		
Effects of inhalation:	Not established, avoid inhalation	
Effects of ingestion:	Not established, avoid ingestion	
Effects of skin absorption:	Not established, avoid contact with skin	
Suggested First Aid		
Inhalation:	Seek medical advice	
Ingestion:	Seek medical advice	
Contact with eyes:	Wash with copious amounts of water. Seek medical advice	
Contact with skin:	Wash thoroughly with water.	
Action on Spillage and Method of Disposal		
Spillage of ampoule contents should be taken up with absorbent material wetted with an appropriate disinfectant. Rinse area with an appropriate disinfectant followed by water. Absorbent materials used to treat spillage should be treated as biological waste.		

16. LIABILITY AND LOSS

Information provided by the Institute is given after the exercise of all reasonable care and skill in its compilation, preparation and issue, but it is provided without liability to the Recipient in its application and use.

It is the responsibility of the Recipient to determine the appropriateness of the standards or reference materials supplied by the Institute to the Recipient ("the Goods") for the proposed application and ensure that it has the necessary technical skills to determine that they are appropriate. Results obtained from the Goods are likely to be dependent on conditions of use by the Recipient and the variability of materials beyond the control of the Institute.

All warranties are excluded to the fullest extent permitted by law, including without limitation that the Goods are free from infectious agents or that the supply of Goods will not infringe any rights of any third party.

The Institute shall not be liable to the Recipient for any economic loss whether direct or indirect, which arise in connection with this agreement.

The total liability of the Institute in connection with this agreement, whether for negligence or breach of contract or otherwise, shall in no event exceed 120% of any price paid or payable by the Recipient for the supply of the Goods.

If any of the Goods supplied by the Institute should prove not to meet their specification when stored and used correctly (and provided that the Recipient has returned the Goods to the Institute together with written notification of such alleged defect within seven days of the time when the Recipient discovers or ought to have discovered the defect), the Institute shall either replace the Goods or, at its sole option, refund the handling charge provided that performance of either one of the above options shall constitute an entire discharge of the Institute's liability under this Condition.



National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG
WHO International Laboratory for Biological Standards, UK Official Medicines Control Laboratory



T +44 (0)1707 641000
nibsc.org

ANEXO 3 - Especificação do Material de Referência Internacional (Rubéola)



WHO Reference Reagent
1st International Reference Reagent for Rubella (Live)
NIBSC code: 81/888
Instructions for use
(Version 4.0, Dated 26/02/2008)

1. INTENDED USE

This International Standard is the 1st International Reference Reagent for Rubella (Live), established by the Expert Committee on Biological Standardisation (ECBS) in 1954.

2. CAUTION

This preparation is not for administration to humans.

The preparation contains material of human origin, and either the final product or the source materials, from which it is derived, have been tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and HCV RNA. As with all materials of biological origin, this preparation should be regarded as potentially hazardous to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures should include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols. Care should be exercised in opening ampoules or vials, to avoid cuts.

3. UNITAGE

On the basis of the results of a collaborative study the Committee assigned a titre of $3.9 \log_{10}$ to the contents of each ampoule. For practical purposes the titre may be taken as the equivalent of 8000 infectious units per ampoule.

4. CONTENTS

Country of origin of biological material: United Kingdom.

Each ampoule contains a freeze dried-residue comprising, under an atmosphere of nitrogen:

- rubella virus (RA27 vaccine strain), prepared in human diploid MRC-5 cells
- stabiliser
- human serum albumin
- neomycin

5. STORAGE

Unopened ampoules should be stored at -20°C or below.

Please note: because of the inherent stability of lyophilized material, NIBSC may ship these materials at ambient temperature.

6. DIRECTIONS FOR OPENING

DIN ampoules have an 'easy-open' coloured stress point, where the narrow ampoule stem joins the wider ampoule body.

Tap the ampoule gently to collect the material at the bottom (labeled) end. Ensure that the disposable ampoule safety breaker provided is pushed down on the stem of the ampoule and against the shoulder of the ampoule body. Hold the body of the ampoule in one hand and the disposable ampoule breaker covering the ampoule stem between the thumb and first finger of the other hand. Apply a bending force to open the ampoule at the coloured stress point, primarily using the hand holding the plastic collar.

Care should be taken to avoid cuts and projectile glass fragments that might enter the eyes, for example, by the use of suitable gloves and an eye shield. Take care that no material is lost from the ampoule and no glass falls into the ampoule. Within the ampoule is dry nitrogen gas at slightly less than atmospheric pressure. A new disposable ampoule breaker is provided with each DIN ampoule.

7. USE OF MATERIAL

No attempt should be made to weigh out any portion of the freeze-dried material prior to reconstitution.

Dissolve the total contents of the ampoule with 0.5ml of sterile distilled water. Rinse the ampoule with about 0.4ml of sterile distilled water and make up the total volume to 1.0ml with water. This solution will contain rubella virus at a concentration of 8000 infectious units/ml.

8. STABILITY

Reference materials are held at NIBSC within assured, temperature-controlled storage facilities. Reference Materials should be stored on receipt as indicated on the label.

NIBSC follows the policy of WHO with respect to its reference materials.

9. REFERENCES

World Health Organisation, Expert Committee on Biological Standardisation, (1995) WHO Technical Report Series.

Unpublished document (1994), a copy of which may be obtained by making application to this Institution.

10. ACKNOWLEDGEMENTS

Not Applicable

11. FURTHER INFORMATION

Further information can be obtained as follows:

This material: enquiries@nibsc.org

WHO Biological Standards:

<http://www.who.int/biologicals/en/>

JCTLM Higher order reference materials:

<http://www.bipm.org/en/committees/cjctlm/>

Derivation of International Units:

http://www.nibsc.org/products/biological_reference_materials/frequently_asked_questions/how_are_international_units.aspx

Ordering standards from NIBSC:

http://www.nibsc.org/products/ordering_information/frequently_asked_questions.aspx

NIBSC Terms & Conditions:

http://www.nibsc.org/terms_and_conditions.aspx

12. CUSTOMER FEEDBACK

Customers are encouraged to provide feedback on the suitability or use of the material provided or other aspects of our service. Please send any comments to enquiries@nibsc.org

13. CITATION

In all publications, including data sheets, in which this material is referenced, it is important that the preparation's title, its status, the NIBSC code number, and the name and address of NIBSC are cited and cited correctly.

14. MATERIAL SAFETY SHEET

Physioal and Chemical properties	
Physical appearance: Lyophilised powder	Comosive: No
Stable: Yes	Oxidising: No
Hygroscopic: No	Irritant: No
Flammable: No	Handling: See caution, Section 2
Other (specify):	Contains material of human origin

Medicines and Healthcare
Products Regulatory Agency

National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG
WHO International Laboratory for Biological Standards, UK Official Medicines Control Laboratory

World Health
Organization

T +44 (0)1707 641000
nibsc.org



Toxicological properties	
Effects of inhalation:	Not established, avoid inhalation
Effects of ingestion:	Not established, avoid ingestion
Effects of skin absorption:	Not established, avoid contact with skin
Suggested First Aid	
Inhalation:	Seek medical advice
Ingestion:	Seek medical advice
Contact with eyes:	Wash with copious amounts of water. Seek medical advice
Contact with skin:	Wash thoroughly with water.
Action on Spillage and Method of Disposal	
Spillage of ampoule contents should be taken up with absorbent material wetted with an appropriate disinfectant. Rinse area with an appropriate disinfectant followed by water. Absorbent materials used to treat spillage should be treated as biological waste.	

16. LIABILITY AND LOSS

Information provided by the Institute is given after the exercise of all reasonable care and skill in its compilation, preparation and issue, but it is provided without liability to the Recipient in its application and use.

It is the responsibility of the Recipient to determine the appropriateness of the standards or reference materials supplied by the Institute to the Recipient ("the Goods") for the proposed application and ensure that it has the necessary technical skills to determine that they are appropriate. Results obtained from the Goods are likely to be dependent on conditions of use by the Recipient and the variability of materials beyond the control of the Institute.

All warranties are excluded to the fullest extent permitted by law, including without limitation that the Goods are free from infectious agents or that the supply of Goods will not infringe any rights of any third party.

The Institute shall not be liable to the Recipient for any economic loss whether direct or indirect, which arise in connection with this agreement.

The total liability of the Institute in connection with this agreement, whether for negligence or breach of contract or otherwise, shall in no event exceed 120% of any price paid or payable by the Recipient for the supply of the Goods.

If any of the Goods supplied by the Institute should prove not to meet their specification when stored and used correctly (and provided that the Recipient has returned the Goods to the Institute together with written notification of such alleged defect within seven days of the time when the Recipient discovers or ought to have discovered the defect), the Institute shall either replace the Goods or, at its sole option, refund the handling charge provided that performance of either one of the above options shall constitute an entire discharge of the Institute's liability under this Condition.

18. INFORMATION FOR CUSTOMS USE ONLY

Country of origin for customs purposes*: United Kingdom
* Defined as the country where the goods have been produced and/or sufficiently processed to be classed as originating from the country of supply, for example a change of state such as freeze-drying.
Net weight: 0.1g
Toxicity Statement: Non-toxic
Veterinary certificate or other statement if applicable.
Attached: No



National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG
WHO International Laboratory for Biological Standards, UK Official Medicines Control Laboratory



T +44 (0)1707 641000
nibsc.org

ANEXO 4 - Especificação do Material de Referência Internacional (Sarampo)



WHO Reference Reagent
2nd International Reference Reagent for Measles Vaccine (Live)
NIBSC code: 92/648
Instructions for use
(Version 4.0, Dated 26/02/2008)

1. INTENDED USE

This International standard is the 2nd International Reference Reagent for Measles vaccine (Live), established by the Expert Committee on Standardisation (ECBS) in 1994

2. CAUTION

This preparation is not for administration to humans.

The material is not of human or bovine origin. As with all materials of biological origin, this preparation should be regarded as potentially hazardous to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures should include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols. Care should be exercised in opening ampoules or vials, to avoid cuts.

3. UNITAGE

On the basis of the results of a collaborative study the Committee assigned a titre of 4.3 log₁₀ as titrated on Vero cells, to the contents of each vial. For practical purposes the titre may be taken as the equivalent of 20,000 infectious units per vial.

4. CONTENTS

Country of origin of biological material: United Kingdom.

Each vial contains a freeze dried-residue comprising:

- measles virus (Schwartz vaccine strain), prepared on chick embryo fibroblasts
- stabilizer (including dextran and sorbitol)
- neomycin

5. STORAGE

Unopened vials should be stored at -20°C or below
Please note: because of the inherent stability of lyophilized material, NIBSC may ship these materials at ambient temperature.

6. DIRECTIONS FOR OPENING

Vials have a 'flip-up' circular cap. Either on the cap or the collar of the vial, there is an indication of the point at which to lever off the cap. This exposes an area of the stopper through which reconstitution and withdrawal of the preparation can be made using a hypodermic needle and syringe. If use of a pipette is preferred, then fully remove the metal collar using, for example, forceps, taking care to avoid cuts by wearing appropriate gloves. Remove the stopper for access. Care should be taken to prevent loss of the contents.

7. USE OF MATERIAL

No attempt should be made to weigh out any portion of the freeze-dried material prior to reconstitution

Dissolve the total contents of the vial with 0.5ml of sterile distilled water. Rinse the vial with about 0.4ml of sterile distilled water and make up the total volume to 1.0ml with water. this solution will contain measles virus at a concentration of 20,000 infectious units/ml.

8. STABILITY

Reference materials are held at NIBSC within assured, temperature-controlled storage facilities. Reference Materials should be stored on receipt as indicated on the label.

NIBSC follows the policy of WHO with respect to its reference materials.

9. REFERENCES

World Health Organisation, Expert Committee on Biological Standardisation, (1995) WHO Technical Report Series.

Unpublished document (1994), a copy of which may be obtained by making application to this Institution

10. ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable

11. FURTHER INFORMATION

Further information can be obtained as follows;

This material: enquiries@nibsc.org

WHO Biological Standards:

<http://www.who.int/biologicals/en/>

JCTLM Higher order reference materials:

<http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>

Derivation of International Units:

http://www.nibsc.org/products/biological_reference_materials/frequently_asked_questions/how_are_international_units.aspx

Ordering standards from NIBSC:

http://www.nibsc.org/products/ordering_information/frequently_asked_questions.aspx

NIBSC Terms & Conditions:

http://www.nibsc.org/terms_and_conditions.aspx

12. CUSTOMER FEEDBACK

Customers are encouraged to provide feedback on the suitability or use of the material provided or other aspects of our service. Please send any comments to enquiries@nibsc.org

13. CITATION

In all publications, including data sheets, in which this material is referenced, it is important that the preparation's title, its status, the NIBSC code number, and the name and address of NIBSC are cited and cited correctly.

14. MATERIAL SAFETY SHEET

Physical and Chemical properties	
Physical appearance: Lyophilised powder	Corrosive: No
Stable: Yes	Oxidising: No
Hygroscopic: Yes	Irritant: No
Flammable: No	Handling: See caution, Section 2
Other (specify): Not applicable	
Toxicological properties	
Effects of inhalation: Not established, avoid inhalation	
Effects of ingestion: Not established, avoid ingestion	
Effects of skin absorption: Not established, avoid contact with skin	
Suggested First Aid	
Inhalation:	Seek medical advice
Ingestion:	Seek medical advice
Contact with eyes:	Wash with copious amounts of water. Seek medical advice
Contact with skin:	Wash thoroughly with water.



National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG
 WHO International Laboratory for Biological Standards, UK Official Medicines Control Laboratory



T +44 (0)1707 641000
nibsc.org



Action on Spillage and Method of Disposal
Spillage of ampoule contents should be taken up with absorbent material wetted with an appropriate disinfectant. Rinse area with an appropriate disinfectant followed by water. Absorbent materials used to treat spillage should be treated as biological waste.

16. LIABILITY AND LOSS

Information provided by the Institute is given after the exercise of all reasonable care and skill in its compilation, preparation and issue, but it is provided without liability to the Recipient in its application and use.

It is the responsibility of the Recipient to determine the appropriateness of the standards or reference materials supplied by the Institute to the Recipient ("the Goods") for the proposed application and ensure that it has the necessary technical skills to determine that they are appropriate. Results obtained from the Goods are likely to be dependent on conditions of use by the Recipient and the variability of materials beyond the control of the Institute.

All warranties are excluded to the fullest extent permitted by law, including without limitation that the Goods are free from infectious agents or that the supply of Goods will not infringe any rights of any third party.

The Institute shall not be liable to the Recipient for any economic loss whether direct or indirect, which arise in connection with this agreement.

The total liability of the Institute in connection with this agreement, whether for negligence or breach of contract or otherwise, shall in no event exceed 120% of any price paid or payable by the Recipient for the supply of the Goods.

If any of the Goods supplied by the Institute should prove not to meet their specification when stored and used correctly (and provided that the Recipient has returned the Goods to the Institute together with written notification of such alleged defect within seven days of the time when the Recipient discovers or ought to have discovered the defect), the Institute shall either replace the Goods or, at its sole option, refund the handling charge provided that performance of either one of the above options shall constitute an entire discharge of the Institute's liability under this Condition.

18. INFORMATION FOR CUSTOMS USE ONLY

Country of origin for customs purposes*: United Kingdom * Defined as the country where the goods have been produced and/or sufficiently processed to be classed as originating from the country of supply, for example a change of state such as freeze-drying.
Net weight: 0.1g
Toxicity Statement: Non-toxic
Veterinary certificate or other statement if applicable.
Attached: No



National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG
WHO International Laboratory for Biological Standards, UK Official Medicines Control Laboratory



T +44 (0)1707 641000
nibsc.org

ANEXO 5 - Especificação do Material de Referência de Trabalho GSK



Product : COMBINED MJR VACCINE Lot No : MJR776A44

Lot composition : MJR776	Number of dose(s) per container : 1
Date of potency : 10-Oct-2003	

Tests	Specifications	Results
FINAL CONTAINER		
DESCRIPTION	Cake with slightly pink colour. After reconstitution : clear and pink solution	pass
MOISTURE CONTENT	BY THERMOGRAVIMETRY	0.5 %
STERILITY TEST	FTM (30-35°C)	pass
STERILITY TEST	TSB (20-25°C)	pass
IDENTITY	MEASLES VIRUS BY SERONEUTRALIZATION	positive
IDENTITY	MUMPS VIRUS BY SERONEUTRALIZATION	positive
IDENTITY	RUBELLA VIRUS BY SERONEUTRALIZATION	positive
POTENCY	MEASLES VIRUS BY CELL CULTURE TITRATION	3.9 Log CCID50/d
POTENCY	MUMPS VIRUS BY CELL CULTURE TITRATION	4.7 Log CCID50/d
POTENCY	RUBELLA VIRUS BY CELL CULTURE TITRATION	4.0 Log CCID50/d
POTENCY	MEASLES VIRUS BY CELL CULTURE TITRATION (Aged 7 days at 37°C)	0.5 Log CCID50/d
POTENCY	MUMPS VIRUS BY CELL CULTURE TITRATION (Aged 7 days at 37°C)	0.9 Log CCID50/d
POTENCY	RUBELLA VIRUS BY CELL CULTURE TITRATION (Aged 7 days at 37°C)	0.2 Log CCID50/d
NEOMYCIN SULFATE CONTENT	Not more than 25 µg per dose	< 25 µg/d

Approved by :

W. KEST
QC Lot Release Supervisor
QC Data Management
GlaxoSmithKline Biologicals

Conclusion **PASS** / FAIL

GlaxoSmithKline Biologicals s.a.

Hua de l'Institut 89
9-1330 Rixensart
Belgium

Tel : +32 (0)2 050 81 11
Fax : +32 (0)2 656 80 00

R.C. Nivelles : 86046
TVA : 440.872.918
G-Banque : 271-0518333-94

