

ESTER RIBEIRO DE FIGUEIREDO

**Avaliação da aplicação da legislação e normas vigentes de validação de bioensaios para
pesquisa clínica**

Rio de Janeiro

2014

ESTER RIBEIRO DE FIGUEIREDO

**Avaliação da aplicação da legislação e normas vigentes de validação de bioensaios para
pesquisa clínica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a : Erika Martins de Carvalho

Coorientador (a) : Prof.^a Dr.^a : Sheila Maria Barbosa de Lima

Rio de Janeiro

2014

ESTER RIBEIRO DE FIGUEIREDO

**Avaliação da aplicação da legislação e normas vigentes de validação de bioensaios para
pesquisa clínica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ, para obtenção do Título de Mestre.

Aprovada em _____

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Erika Martins de Carvalho
(Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ)

Prof. Dr.^a : Sheila Maria Barbosa de Lima
(Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Denise Cristina de Souza Matos
(Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - FIOCRUZ)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Bergo de Lacerda
(Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Gisela Freitas Trindade
(Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

F475

Figueiredo, Ester Ribeiro de

Avaliação da aplicação e normas vigentes de validação de bioensaios para pesquisa clínica. / Ester Ribeiro de Figueiredo. – Rio de Janeiro, 2014.

xiii, 96f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Erika Martins de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2014.

Bibliografia: f. 74-81

1. ANVISA. 2. Bioensaios. 3. EMA. 4. FDA. 5. Pesquisa Clínica.
I. Título.

CDD 615.1

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me proporcionar sabedoria, força e me iluminar todos os meus dias.

Aos meus pais Joel e Lúcia, meu marido José Antonio, meus filhos Clara, Vinícius, Vitor e a minha mãe “preta” Maria. Agradeço todos os dias por ter vocês na minha vida!

A minha querida avó Ester (*in memoriam*) pelo exemplo do estudo e pela sua doçura inesquecível. Sei que sempre está do meu lado me abençoando.

As minhas orientadores Erika e Sheila pelo apoio e ajuda durante todo trabalho, pelo incentivo e palavras de força quando sentia vontade de fraquejar.

A Bio-Manguinhos por me proporcionar a cada dia um crescimento profissional e pessoal. Tenho muito orgulho por fazer parte desta instituição tão importante para o país.

A minha antiga chefia Rita Benedetti e Fábio Gonçalez por ter me proporcionado este desafio e a minha atual chefia Marília Vaz e Leonardo Teixeira pelo apoio durante todo curso.

A minha querida e dedicada equipe SEVAN: Maria Betânia, Victor, Mariana, Bruno, Luiz e Leila. Obrigada pelo apoio e peço desculpas pelas ausências e pelo nervosismo!

A amiga Danielle Carneiro por ter me incentivado durante a seleção do mestrado. Sua ajuda foi essencial. Nunca irei esquecer!

Aos amigos do LATEV, Anna, Sheila, Ana Carolina, Emily, Marisol, Vanessa, José Henrique, Renata e Stephanie pela execução dos testes, pelos conhecimentos específicos e pelo apoio primordial!

A minha querida turma do mestrado. Nosso encontro foi abençoado por Deus! Em especial agradeço pelo contato mais próximo da Aline, Marcos, Luciana, Alisson e Juliana. Mas amo e admiro todos vocês! Guardarei na lembrança os incentivos, os desesperos e as gargalhadas!

As secretárias Ariane e Beth pela dedicação, incentivo e carinho durante todo curso.

Aos professores do mestrado pela competência, comprometimento e amizade. Agradeço em especial ao Fernando Medina, Claudia Brandão e Wanise Barroso pelo exemplo de grande educadores!

RESUMO

FIGUEIREDO, Ester R. de. **Avaliação da legislação e normas vigentes para validação de bioensaios em pesquisa clínica**. 2014. 91 f. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

As vacinas são produtos imunobiológicos reconhecidamente seguros, eficazes e com grande participação no controle e/ou erradicação de doenças imunopreveníveis, comprovando uma grande relação custo-benefício. Atualmente, Bio-Manguinhos é o principal fornecedor de vacinas para o Ministério da Saúde e para suprir as demandas do Programa Nacional de Imunização utiliza como uma das estratégias de fornecimento, acordos de transferência de tecnologia com empresas mundiais, como a GlaxoSmithKline e a Sanofi Pasteur, com o objetivo de suprir demandas epidemiológicas brasileiras e adquirir desenvolvimento tecnológico para a instituição, o que caracteriza um processo inovador de grande relevância. Os produtos gerados através deste processo precisam ser submetidos a testes de Controle de Qualidade e pesquisa clínica para comprovar a qualidade e a confirmação terapêutica, através de metodologias analíticas e bioanalíticas (bioensaios) validadas. Este trabalho tem como objetivo avaliar a aplicabilidade da RDC 27 da ANVISA e analisar os demais documentos de validação de bioensaios preconizados pela OMS, FDA, USP e EMEA. Para isto, foi realizada uma análise desses documentos para a verificação de diferenças, semelhanças e aplicação. Um estudo de caso foi realizado através da validação do teste de neutralização por redução de placa de lise para sarampo em placas de 96 poços (*MICRO-PRNT*) que é considerado pela literatura o método mais sensível e específico para a qualificação e quantificação de anticorpos neutralizantes produzidos após a vacinação. Porém, A validação foi desenhada de maneira mais direcionada as características particulares da metodologia, utilizando parâmetros e critérios de aceitação pertinentes, e as diretrizes aplicáveis dos órgãos citados acima. A validação proposta neste estudo apresentou resultados satisfatórios onde todos os parâmetros estabelecidos foram validados. Pode-se concluir que a RDC 27 é direcionada a bioensaios com característica cromatográfica e que os documentos dos demais órgãos também não apresentam uma aplicabilidade total. Na realidade é necessário que a ANVISA elabore um guia ou legislação de validação de metodologia que atenda as particularidades dos bioensaios utilizados nas pesquisas clínicas de vacinas para comprovação de imunogenicidade.

Palavras-chave: ANVISA, bioensaios, EMEA, FDA, pesquisa clínica, OMS, USP, vacinas, validação.

ABSTRACT

Vaccines are immunobiological products and are known to be safe, effective and with great participation in the control and / or eradication of immunopreventable diseases, proving that is an excellent cost benefit relation. Currently, Bio-Manguinhos is the main provider of vaccines for the Ministry of Health and to meet the demands of the National Immunization Program and uses as a strategy of supply, technology transfer agreements with global companies such as GlaxoSmithKline and Sanofi Pasteur, aiming to meet Brazilian epidemiological demands and acquire technological development for the institution, configuring an innovative process of great relevance.

The products generated through this process need to undergo Quality Control testing and clinical research to demonstrate the quality and therapeutic effectiveness through analytical and bioanalytical methods (bioassays) validated. This study aims to evaluate the applicability of the RDC 27 ANVISA and analyze other documents validation of bioassays recommended by WHO, FDA, USP and EMEA. For this, an analysis of these documents for verification of differences, similarities and application was done.

A case study was performed through validation by reduction neutralization test for lysis plate for measles in 96-well plates (MICRO-PRNT) which is considered by the literature the most sensitive and specific method for qualification and quantification of neutralizing antibodies produced after vaccination. However, validation was designed in a more direct way to particular characteristics of the methodology, using parameters and acceptance criteria that are relevant and also applicable directives of the organs mentioned above. The validation proposed in this study showed satisfactory results where all parameters set were validated.

It can be concluded that the RDC 27 is directed to bioassays with chromatographic characteristics and also that the documents of the other organs did not show an overall applicability. In reality, it is necessary that ANVISA prepares a guide or legislation of methodology validation that meets the particularities of bioassays used in clinical research of vaccines to prove the immunogenicity and also be useful for other bioassays with biological targets.

Keywords: ANVISA, bioassays, EMEA, FDA, clinical research, WHO, USP, vaccines, validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Imagem do procedimento de variolização	p.16
Figura 2 –	Imagem do Pavilhão Mourisco	p.19
Figura 3 –	Imagem do Centro Tecnológico de Vacinas	p.19
Figura 4 –	Mapa de exportação de vacina de febre amarela produzida por Bio-Manguinhos	p.23
Figura 5 –	Imagem da vacina tríplice viral produzida por Bio-Manguinhos	p.25
Figura 6 –	Processo de desenvolvimento da capacidade tecnológica nos países em desenvolvimento	p.26
Figura 7 –	Imagem ilustrativa do teste de inibição de hemaglutinação	p.32
Figura 8 –	Imagem ilustrativa do teste de imunofluorescência	p.33
Figura 9 –	Imagem ilustrativa do teste de ELISA	p.34
Figura 10 –	Imagem ilustrativa do ensaio <i>in vivo</i>	p.34
Figura 11 –	Imagem ilustrativa do teste de PRNT em placa de 24 poços	p.36
Figura 12 –	Imagem ilustrativa do teste de micro-PRNT em placa de 96 poços para sarampo	p.44
Figura 13-	Gráfico da curva de calibração 1	p.58
Figura 14-	Gráfico da curva de calibração 2	p.59
Figura 15 -	Gráfico da curva de calibração 3	p.60
Figura 16-	Gráfico de dispersão correspondente aos resultados obtidos dos 200 soros submetidos ao <i>micro</i> PRNT sarampo	p.61
Figura 17-	Placa de MICRO-PRNT caxumba para teste de sensibilidade	p.68
Figura 18 -	Placa de MICRO-PRNT sarampo para teste de sensibilidade	p.69

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1-	Desenvolvimento das vacinas	p.18
Quadro 2 –	Número de casos de doenças imunopreveníveis no Brasil de 1980 a 2012	p.21
Quadro 3 -	Parâmetros de validação segundo a finalidade da metodologia segundo WHO	p.37
Quadro 4-	Parâmetros de validação de bioensaios	p.39
Quadro 5-	Amostras utilizadas no teste de precisão	p.62
Tabela 1-	Portifólio de vacinas de Bio-Manguinhos	p.20
Tabela 2 -	Resultados do parâmetro curva de calibração 1	p.58
Tabela 3-	Resultados do parâmetro curva de calibração 2	p.59
Tabela 4-	Resultados do parâmetro curva de calibração 3	p.60
Tabela 5-	Resultados do parâmetro precisão intracorrida	p.64
Tabela 6-	Resultados do parâmetro precisão intercorrida – analista 1	p.66
Tabela 7-	Resultados do parâmetro precisão intercorrida – analista 2	p.66
Tabela 8-	Resultado do parâmetro exatidão – ensaio 1	p.67
Tabela 9-	Resultado do parâmetro exatidão – ensaio 2	p.67
Tabela 10-	Resultado do parâmetro exatidão – ensaio 3	p.67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPC	Boas Práticas Clínicas
CCD	Cromatografia de camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Cromatografia de papel
CQA	Amostra de controle de qualidade de alta concentração
CQB	Amostra de controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Amostra de controle de qualidade de diluição
CQM	Amostra de controle de qualidade de média concentração
CV	Coefficiente de variação
CTV	Complexo Tecnológico de Vacinas
DEGAQ	Departamento de Garantia de Qualidade
DI	Documento interno
DERED	Departamento de Reativos para Diagnóstico
DTP	Vacina contra difteria, tétano e coqueluche
EIE/ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Fator matriz normalizado
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GSK	GlaxoSmithkline
HBV	Vírus da hepatite B

HCV	Vírus da hepatite C
HI	Teste de inibição da hemaglutinação
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
Hib	Vacina contra <i>Haemophilus influenzae</i>
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LAMEV	Laboratório de Metrologia e Validação
LANEU	Laboratório de neurovirulência
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MS	Ministério da Saúde
NAT	Teste de amplificação de ácido nucléico
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAI	Programa Ampliado de Imunização
PI	Padrão interno
PNI	Programa Nacional de Imunização
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
SECAS	Seção de Caracterização Sorológica
SEVAN	Seção de Validação Analítica
SQG	Sistema de Gestão da Qualidade
SUS	Sistema Único de Saúde
TN	Teste de neutralização

TVV	Vacina tríplice viral: sarampo, caxumba e rubéola
USP	<i>United States Pharmacopeial</i>
VDTEC	Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
WHO/ OMS	<i>World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde</i>

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	p.14
1.1 – Qualidade	p.14
1.2 – Vacinas	p.15
1.2.1 – Vacina Tríplice Viral	p.23
1.3 – Transferência de Tecnologia	p.25
1.4 – Pesquisa Clínica	p.29
1.5 – Métodos Bioanalíticos	p.31
1.6 – Processo de Validação	p.36
1.7 – Validação de métodos bioanalíticos	p.38
2 – JUSTIFICATIVA	p.41
3 – OBJETIVO	p.42
3.1 – Objetivo geral	p.42
3.2 – Objetivos específicos	p.42
4 – METODOLOGIA	p.43
4.1 – Estudo de Caso	p.43
4.1.1 – Princípio da metodologia	p.43
4.1.2 – Material e métodos	p.45
4.1.3 – Cálculos	p.47
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	p.50
6 – CONCLUSÃO	p.72
7 – PERSPECTIVAS	p.73
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p.74
9 – ANEXOS	p.82
9.1 – ANEXO I: Detalhamento do parâmetro de precisão segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.83
9.2 – ANEXO II: Detalhamento do parâmetro de exatidão segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.84
9.3 – ANEXO III: Detalhamento do parâmetro de linearidade/curva de calibração segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.85
9.4 – ANEXO IV: Detalhamento do parâmetro intervalo segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.87

9.5 – ANEXO V: Detalhamento do parâmetro de seletividade/ especificidade segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.88
9.6 – ANEXO VI: Detalhamento do parâmetro de limite de detecção segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.89
9.7 – ANEXO VII: Detalhamento do parâmetro de limite de quantificação segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.90
9.8 – ANEXO VIII: Detalhamento do parâmetro de robustez segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.91
9.9 – ANEXO XIX: Detalhamento do parâmetro de efeito matriz segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.92
9.10 – ANEXO X: Detalhamento do parâmetro de efeito residual segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.93
9.11 – ANEXO XI: Detalhamento do parâmetro de estabilidade do analito na matriz biológica segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA	p.94

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Qualidade

O termo qualidade apresenta várias definições e é aplicado em vários segmentos, como o controle da qualidade e a garantia da qualidade. Segundo FALCONI (1992) o conceito de qualidade é sintetizado da seguinte forma: “um produto ou serviço de qualidade é aquele que atende perfeitamente, de forma confiável, de forma acessível, de forma segura e no tempo certo às necessidades do cliente”.

Nos últimos anos devido a competitividade das empresas e o aumento da produtividade industrial, foi necessário a implementação e desenvolvimento da qualidade de maneira cada vez mais significativa (BRUM, 2009).

Ter qualidade significa que a empresa possui excelência em serviços e produtos e representa um diferencial nos resultados obtidos. No caso das empresas produtoras de bens voltados à saúde, como por exemplo a produção de imunobiológicos, a qualidade está diretamente ligada a saúde da população. Consequentemente, a produção desses produtos está submetida a normas rígidas preconizadas pelos órgãos reguladores e certificadores nacionais e/ou internacionais e são de caráter obrigatórios (BENEDETTI, 2008).

A qualidade é composta por três grandes processos gerenciais: CONCEPÇÃO, CONTROLE e MELHORIA (AUGUSTI & DESCHAMPS, 2013):

- **A CONCEPÇÃO** – Ou simplesmente o planejamento da qualidade visa criar a consciência da necessidade da melhoria, estabelecer as metas, identificar pessoas e áreas que serão impactadas com estas mudanças, projetar os processos e transferir para a produção os planos resultantes e estabelecer controles de processos;
- **O CONTROLE** - Este processo tem como função avaliar o desempenho da qualidade, comparar o desempenho com as metas estabelecidas e adaptar/adequar as diferenças encontradas;

- **A MELHORIA** – Nesta etapa deve-se estabelecer a infra-estrutura para a realização do processo, identificar os projetos ou etapas que devem ser implementadas as melhorias, estabelecer a equipe e prover recursos, treinamento e motivação.

Podemos simplificar a Qualidade como todos os aspectos que influenciam individualmente e coletivamente um produto, com a finalidade de garantir que os medicamentos estejam dentro das especificações e que possam ser utilizados com os fins propostos. Neste contexto é necessário a presença de um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) que é a estrutura organizacional criada para gerir e garantir a Qualidade, os recursos necessários, os procedimentos operacionais e as responsabilidades estabelecidas. Ou seja, é um conjunto de elementos que interagem com a força de trabalho, por meio de diretrizes e padrões pré-estabelecidos com relação às questões de saúde, meio ambiente e segurança (BIO-MANGUINHOS, 2013; ANVISA, 2010)

Biomanguinhos, como produtor de vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico tem definido como missão no Manual do Sistema de Gestão da Qualidade, DI (documento interno) 0008 revisão 07, de Bio-Manguinhos de 2013:

“ Contribuir para a melhoria dos padrões de saúde pública brasileira, por meio da inovação, desenvolvimento tecnológico e produção de imunobiológicos e prestação de serviços para atender prioritariamente às demandas de saúde do país”.

1.2 – Vacinas

As vacinas são uma preparação antigênica com característica imunogênica, que quando inoculada num indivíduo é capaz de induzir uma resposta imunitária protetora específica de um ou mais agentes infecciosos. Estes produtos imunológicos, fabricados ou derivados de organismos vivos são de ação preventiva e é administrada em indivíduos saudáveis, e hoje é uma ferramenta muito importante no controle e erradicação de várias doenças . As vacinas devem ser seguras, eficazes e com custo benefício satisfatório. As principais características das vacinas são proporcionar a proteção efetiva por um longo período de tempo e estimular a produção de anticorpos

neutralizantes para minimizar ou impedir a infecção. Um indivíduo imune é uma pessoa que responde a um antígeno microbiano e está protegido contra exposições posteriores (MOURA, 2009; ABBAS, 2008, DOAN e cols., 2006).

A efetividade da vacinação juntamente com o progresso do saneamento básico é sem dúvida uma das grandes armas contra as doenças infecciosas, tendo como resultado uma melhoria na saúde da população (PINTO e cols., 2011).

Historicamente o uso da imunização de seres humanos é bastante antiga (SILVERSTEIN, 2009). Existem relatos desde o século VII, quando budistas indianos ingeriam veneno de cobra para ficar imunes a picada. Porém a varíola foi o marco inicial na utilização de vacinas (PINTO e cols., 2011).

Porém a utilização das vacinas de forma mais concreta e satisfatória se iniciou apenas no século XVII, em 1796, quando o médico inglês Edward Jenner inoculou em James Phipps de oito anos o pus retirado de Sara Nelmes que sofria de *cowpox*, uma doença similar a varíola que acometia os bovinos. Nestes animais a doença era mais benigna mas com formação das pústulas, onde eram retirados o pus variolítico para novas inoculações. Segundo relatos da época, James adquiriu apenas a infecção benigna e após dez dias estava curado, sendo este processo chamado de “variolização”, conforme ilustrado na figura 1. Após alguns meses Jenner inoculou pus varioloso no menino e a doença não apareceu, surgindo assim a descoberta da vacina no fim de 1797. A partir deste fato, Jenner imunizou crianças com material proveniente das pústulas dos animais passando braço a braço, realizando assim o primeiro processo de imunização contra a varíola. (PLOTKIN, 2005; SILVA, 2005; FERNANDES, 1999).



Figura 1: Imagem do procedimento de variolização. Fonte: <http://linux.an.gov.br/mapa/?p=2746>. Acesso em 18/01/2014.

No Brasil, os primeiros relatos de varíola são do século XVI. Acredita-se que com a chegada dos colonizadores no Brasil, em meados de 1555 o vírus da varíola foi trazido pelos calvanistas franceses que haviam fundado um pequeno vilarejo no Rio de Janeiro com o sonho da França Antártica. Porém, apenas em 1805 o governo português citou em um documento oficial sobre a inoculação da vacina, mas somente em 1811 surgiu uma tentativa de controle da epidemia através do compromisso assumido por D. João VI, que criou a Junta Vacínica da Corte. (GURGEL & ROSA, 2012; LOPES & POLITO, 2007; FERNANDES, 1999).

Outro fato bastante relevante para o desenvolvimento das vacinas foi a descoberta da bacteriologia no final do século XIX, por Robert Koch e Louis Pasteur. Estes dois pesquisadores de forma independente desenvolveram um trabalho que derrubou a teoria da geração espontânea e demonstraram a relação entre doenças infecciosas, como difteria, tuberculose, cólera e febre tifoide, e seus respectivos agentes patogênicos. Louis Pasteur estudou a cólera aviária em galinhas e constatou que a doença era causada pela bactéria *Pasteurella séptica* e que após duas semanas ocorria a diminuição da patogenicidade. Animais foram inoculados com suspensões destas culturas e não apresentaram a doença, demonstrando que os mesmos estavam imunizados quando eram inoculados com cepas de *Pasteurella séptica*, recém semeadas e muito virulentas. Desta forma, Pasteur utilizou o mesmo procedimento de Edward Jenner, utilizando porém as bactérias como agente etiológico da doença, sendo um dos pioneiros na produção de vacinas bacterianas (PLOTKIN, 2005).

No início do século XX os pesquisadores direcionaram o desenvolvimento das vacinas seguindo caminhos empíricos diferentes: utilização de micro-organismos atenuados, onde a virulência é reduzida; a utilização de micro-organismos inativados ou mortos e vacinas com componentes purificados de micro-organismos (PINTO e cols., 2011).

Após estas descobertas, foram desenvolvidas diversas vacinas, conforme relatado no quadro 1:

Quadro 1: Desenvolvimento das vacinas^a

DESENVOLVIMENTO DAS VACINAS ^a	
Primeiras Vacinas	Após a II Guerra Mundial
1798 Varíola	1955 Vacina de pólio Injetável
1885 Raiva	1962 Vacina de Pólio Oral (OPV)
1887 Peste	1963 Sarampo
1909 Febre Tifóide	1967 Caxumba
1917 Cólera	1970 Rubéola
1923 Difteria	1970 Varicela
1926 Pertussis	1978 Vacina atual da Influenza
1927 Tétano	1981 Hepatite B
1935 Febre Amarela	1988 Encefalite Japonesa
1940 Difteria, tétano e coqueluche (DTP)	1990 Pneumocócica, 23 valente
1945 Influenza	1990 Hib <i>Haemophilus influenzae</i>
	1995 Hepatite A
	2006 Papilomavírus Humano
	2006 Rotavírus
	2009 H ₁ N ₁

^a Fonte: (HOMMA e cols., 2011; Pediatrician's guide, 2008; Ploktins & Mortiner, 1994)

No Brasil, apenas no início do século XX foi criado o Instituto Soroterápico Federal (25 de maio de 1900) com a finalidade produzir soros e vacinas contra a peste bubônica. Em 1902, Oswaldo Cruz, bacteriologista, assumiu a direção geral do Instituto. O Instituto foi responsável pela erradicação da peste bubônica em 1904 e da febre amarela em 1907 na cidade do Rio de Janeiro e com os passar dos anos foi responsável por proporcionar produtos e serviços de saúde em prol da saúde da população brasileira (FIOCRUZ, 2014).

Atualmente o instituto é chamado de Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), figura 2, e tem como missão produzir, disseminar, compartilhar e fortalecer o Sistema único de Saúde (SUS), atuando na promoção da saúde e da qualidade de vida da população do Brasil com a finalidade de diminuir as desigualdades sociais, promovendo a inovação nacional (FIOCRUZ, 2014).



Figura 2: Pavilhão Mourisco. Fonte: <http://www.coc.fiocruz.br/patrimonio>. Acesso em 10/01/2014

Na FIOCRUZ, em 1976 foi criado o Laboratório de Tecnologia em Produtos Biológicos com a finalidade produzir vacinas oriundas da demanda do Ministério da Saúde para a erradicação de doenças. Atualmente é chamado de Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio- Manguinhos), tendo o seu parque industrial situado no Centro Tecnológico de Vacinas (figura 3).



Figura 3: Imagem do Centro Tecnológico de Vacinas. Fonte: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/quem-somos>. Acesso em 11 jan. 2014

Atualmente, Bio-Manguinhos é responsável pela produção vacinas bacterianas e virais, como mostrado na tabela 1 (BIO-MANGUINHOS, 2014):

Tabela 1: Portfólio de vacinas de Biomanguinhos

VACINAS BACTERIANAS		VACINAS VIRAIS	
Vacinas	Doenças prevenidas	Vacinas	Doenças prevenidas
DTP* e <i>Haemophilus influenzae b</i> (Hib)	difteria, tétano, coqueluche e infecções graves pelo <i>Haemophilus influenzae tipo b</i>	Febre amarela	Febre amarela
<i>Haemophilus influenzae tipo b</i> (Hib)	meningite por Hib e pneumonia	Poliomielite Inativada	Poliomielite
Meningite A e C	meningite contra doenças invasivas e otite	<u>VPO (Sabin I, II, e III)</u>	Poliomielite
Pneumocócica 10-valente	média aguda causadas pelo <i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipos: 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F	Tetraivalente Viral	varicela, sarampo, caxumba e rubéola
--	--	Tríplice Viral	sarampo, caxumba e rubéola

* tríplice bacteriana

A disponibilização das vacinas para população pelo Ministério da Saúde (MS) contribuiu para a erradicação ou controle de diversas doenças, aumentando a expectativa e qualidade de vida da população. Os dados revelam (quadro 2) que a intensificação das campanhas de vacinação nas décadas de 80 e 90 levou a uma considerável diminuição do número de casos registrados de diversas doenças como difteria, tétano e poliomielite. O exemplo mais notável é o da poliomielite considerada erradicada no Brasil em 1994, onde a última notificação da doença foi em 1989 (CAMPOS, 2003).

Biomanguinhos, também é responsável pela produção de biofármacos (Alfaeopetina, Alfainterferona 2b, Alfaaliglicerase) e reativos para diagnóstico (testes moleculares, testes rápidos, ensaios parasitológicos, ensaios sorológicos) para o MS com a finalidade de atender as demandas da saúde pública, possibilitando a população brasileira o acesso gratuito a produtos imunobiológicos de alta tecnologia (BIOMANGUINHOS, 2014).

É importante ressaltar que a imunidade adquirida de um grupo de pessoas ou de uma população é consequência de um programa de vacinação consistente e isto é claramente visulazido no quadro 2, no qual o número de casos de doenças foram diminuindo ao longo dos anos. Com a diminuição do número de indivíduos suscetíveis, o reservatório natural de indivíduos contaminados reduz, diminuindo as chances de transmissão da doença. No Brasil este conceito foi assimilado em função do êxito das campanhas de vacinação contra a varíola nos anos 60, época que foi comprovado que a vacinação em massa na população foi fundamental para a erradicação da doença, sendo o último caso notificado em 1971 (MS, 2014).

Quadro 2: Número de casos de doenças imunopreveníveis no Brasil de 1980 a 2012^a.

Número de casos registrados/ ano											
	1980	1990	2000	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Difteria	4646	640	46	27	9	0	85	4	32	5	0
Sarampo	99263	61435	36	6	57	0	0	0	68	43	2
Coqueluche	45752	15329	764	1328	797	596	1275	1037	477	2257	5400
Poliomielite	1342	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rubéola	-	-	8781	233	1631	8739	2201	0	0	0	0
Tétano (neonatal)	0	298	34	108	8	5	6	3	6	6	2
Tétano (total)	3098	1547	246	420	431	281	333	278	308	333	314
Febre amarela	27	5	85	46	-	-	46	46	2	0	0

^a Adaptado OMS, 2013, DOMINGUES & TEIXEIRA, 2013.

Neste contexto em 1973, por determinação do MS, foi criado o Programa Nacional de Imunização (PNI), que passou a coordenar as atividades de imunizações do país, consolidando uma estratégia nacional com muitos avanços significativos no controle da saúde (MS, 2014; PINTO e cols., 2011).

O objetivo principal do PNI é disponibilizar vacinas com qualidade a todas as crianças nascidas anualmente no Brasil, objetivando uma cobertura vacinal de 100% de forma homogênea em todo o país. Atualmente o PNI tem como meta erradicar o sarampo e o tétano neonatal. Além de controlar outras doenças imunopreveníveis como a coqueluche, tétano acidental, formas graves de tuberculose, hepatite B, meningites,

difteria, rubéola, caxumba, febre amarela, rotavírus, H₁N₁. É importante ressaltar que também é preconizado pelo PNI a manutenção da erradicação da poliomielite (MS, 2014; PINTO e cols., 2011).

O surgimento de novas doenças devido as condições sanitárias precárias em várias partes do Brasil e do mundo, e a manutenção do controle das doenças existentes, faz com que o PNI necessite sempre de avaliações periódicas para redefinir seus alvos, com a intenção de agir de forma concreta e eficaz no benefício da saúde dos brasileiros. Conseqüentemente, o MS solicita aos laboratórios públicos e privados a disponibilização de medicamentos, vacinas, biofármacos e kits para diagnóstico para suprir as necessidades do país (BIO-MANGUINHOS, 2014; MS, 2014).

Bio-Manguinhos é o principal fornecedor de vacinas do Ministério da Saúde e anualmente a sua produção é programada pelo PNI mediante a previsão anual da taxa de natalidade brasileira do respectivo ano e a situação epidemiológica do país. Em 2013, cerca de 100 milhões de doses foram disponibilizadas ao PNI e nos últimos cinco anos (2009 a 2013) foram fornecidas aproximadamente 544 milhões de doses. Além de Bio-Manguinhos, outros órgãos realizam pesquisas e fabricam imunobiológicos, como o Instituto Butantan, que produz vacinas e soros (BIO-MANGUINHOS, 2014).

Além do mercado nacional, Bio-Manguinhos em decorrência da pré-qualificação da vacina de febre amarela pela OMS em 2001, detém o direito de fornecer o produto as Agências das Nações Unidas, porém o fornecimento é priorizado ao Ministério da Saúde. A vacina de febre amarela produzida por Bio-Manguinhos é exportada para mais de 70 países (Figura 5), sendo Bio-Manguinhos o maior exportador desta vacina para as Américas Latina e Central, e um dos maiores do mundo, contribuindo na melhoria das condições da saúde no planeta (BIO-MANGUINHOS, 2014).

Vacinas febre amarela e meningocócica AC / 2001 – 2012

2001-2013: 153 milhões de doses



Figura 4: Mapa de exportação de vacina de febre amarela produzida por Bio-Manguinhos. Fonte: http://www.bio.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=60&Itemid=355. Acesso: 06/03/2014

1.2.1 – Vacina Tríplice Viral

A vacina utilizada no estudo em questão é a vacina tríplice viral (Figura 4) e o vírus alvo é o sarampo.

O sarampo é uma doença infecciosa, viral, transmissível e altamente contagiosa, geralmente ocorrida na infância. A infecção causada por um vírus, causa uma vasculite generalizada, havendo várias manifestações clínicas, como perdas de eletrólitos, gerando o quadro espoliante característico da doença (MS, 2009; BORGES, 2007).

O vírus do sarampo é um *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae*. A infecção aguda pelo vírus do sarampo começa na parte superior pelo trato respiratório e o vírus se propaga por viremia secundária à outros órgãos e tecidos, causando vários sintomas clínicos (FUJINO *et al*, 2007).

A doença gera normalmente complicações devido ao dano causado no epitélio respiratório, causando infecções secundárias geradas por bactérias oportunistas, como pneumonia, laringotraqueobronquite e otite média, geralmente em crianças com menos de dois anos de idade. Em crianças desnutridas a infecção aguda é grave e o vírus é descrito como o possível agente etiológico da inflamação do intestino. Pode ocorrer também em alguns pacientes, principalmente imunocomprometidos, após semanas ou

meses pós-infecção pneumonia por células gigantes, devido a replicação viral, havendo graves consequências. A encefalite e a pan-encefalite esclerosante subaguda também podem ser uma complicação tardia (SANTOS *et al*, 2008; FUJINO *et al*, 2007).

O sarampo ainda é um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Devido a este fato a WHO tem como estratégia a vacinação recomendada pelo Programa Ampliado de Imunização (PAI), porém em muitos países em desenvolvimento o índice de vacinação da população para minimizar e radicar a doença não é alcançado (MARTINS, 2002). No Brasil, a vacina é disponibilizada para população através do PNI e é oriunda do processo de transferência de tecnologia entre Bio-Manguinhos e a GlaxoSmithkline, ilustrada na figura 4.

A vacina tríplice viral consiste essencialmente da combinação dos três componentes ativos (bulks monovalentes de sarampo, rubéola e caxumba) e estabilizadores (BIO-MANGUINHOS, 2014).

A vacina de sarampo, caxumba e rubéola atende os requisitos da WHO para a fabricação de substâncias biológicas. Os ingredientes ativos da vacina trivalente são o vírus vivos atenuados de sarampo (cepa Schwarz), da rubéola (cepa Wistar RA27/3) e da caxumba (cepa RIT 4385 derivada da cepa Jerl-Lynn). Os bulks (concentrados) monovalentes de rubéola, sarampo e caxumba são misturados juntamente com volumes apropriados de meios de diluição e estabilizadores. A vacina trivalente é, então, envasada em recipientes e liofilizada. Os substratos de células usados são os fibroblastos de embriões de galinha (CEF) para a multiplicação do vírus do sarampo e da caxumba e células diploides humanas MRC5 para o vírus da rubéola (BIO-MANGUINHOS, 2014).

A vacina trivalente é uma vacina com vírus atenuado que são produzidos através de várias passagens em um sistema hospedeiro, que resultam em inúmeras mutações. Sendo assim, o vírus se torna menos patogênico à célula humana, mas capaz de produzir uma resposta imunológica eficiente (SANTOS *et al*, 2008).



Figura 5: Vacina tríplice viral produzida por Bio-Manguinhos.
Fonte: http://www.bio.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=59&Itemid=72. Acesso em 02/01/2014.

1.3 – Transferência de Tecnologia

O Instituto também utiliza como estratégia para o aumento do seu portfólio de produtos a realização de parcerias com instituições públicas e privadas através de acordos de transferência de tecnologia e de desenvolvimento tecnológico. Dentre os principais benefícios destas parcerias são a internalização do conhecimento para o desenvolvimento de novas tecnologias de alto valor agregado, a redução de preço, a qualificação dos colaboradores da unidade com foco na área regulatória e na área de qualidade (BIOMANGUINHOS, 2014).

A Transferência de Tecnologia pode ser conceituada de forma simplificada e resumida como à exportação por parte de um detentor de tecnologia que são geralmente representados pelos países desenvolvidos, e à importação por um receptor que necessita de um desenvolvimento tecnológico, que são geralmente representados pelos países em desenvolvimento (URDANETA, 1992).

É um procedimento sistemático que deve ser seguido pelas partes interessadas, a fim de repassar os conhecimentos e experiências adquiradas durante o desenvolvimento, produção e comercialização do produto a uma empresa ou instituição de maneira satisfatória. Esse processo também deve ser aceito pelos órgãos reguladores aplicáveis (WHO, 2011).

Hoje, o desenvolvimento da capacidade tecnológica dos países desenvolvidos podem ser sintetizadas em quatro etapas: criação, adaptação, absorção e comércio. Nestes países, os empresários substituem a exportação de seus produtos pela instalação de linhas de produção nos países em desenvolvimento, com o objetivo de amadurecer e alimentar suas economias e proporcionar o crescimento do sistema como um todo (OHAYON, P & VIEIRA, 2006).

Desta forma, a Transferência de Tecnologia faz parte do processo de desenvolvimento da empresa. Já nos países em desenvolvimento, o processo Transferência de Tecnologia acontece de maneira contrária, ou seja: comércio, absorção, adaptação e criação. Pois, países como Brasil em termos de estágio tecnológico encontra-se no estágio III e IV, com capacidade para produção de especialidades farmacêuticas e *marketing* e comercialização das especialidades farmacêuticas, respectivamente (Vieira, 2006). Desta forma, nestes países o processo se inicia com a seleção do fornecedor e a negociação da transferência da tecnologia do seus detentores (Figura 6). A partir deste momento inicia-se o processo de fabricação, que absorverá o conhecimento tecnológico, adaptando-o dentro do possível às suas condições, reformulando a função produção e procurando explorar o conhecimento adquirido para outras situações ou etapas do processo produtivo. A etapa de adaptação é uma fase chave ,considerada "quase criação", estando a um passo da etapa criativa, inovando em produtos e processos (OHAYON, P & VIEIRA, 2006; TAKAHASHI, 2005).



Figura 6: Processo de desenvolvimento da capacidade tecnológica nos países em desenvolvimento. Fonte: TAKAHASHI, 2005

A Transferência de Tecnologia também pode ser realizada de outras formas: pela troca de conhecimentos entre as pessoas, pela participação de congressos e palestras, pela literatura, por licenciamento, pela compra direta de bens, co-produção, investimento direto e consórcios tecnológicos. Porém é primordial um desenvolvimento de um planejamento estratégico para a definição robusta de cada etapa da transferência de tecnologia, objetivando que todas as informações adquiridas sejam bem aproveitadas e melhoradas continuamente para gerar resultados esperados (PICININ e cols., 2011).

O sucesso de uma transferência de tecnologia pode ser mensurado através de alguns critérios, como por exemplo: o desempenho alcançado em nível econômico, o desenvolvimento de produto, produção e mercadológico, nível de satisfação fornecida com a tecnologia transferida e o nível de domínio tecnológico absorvido (TAKAHASHI & SACOMANO, 2002).

No caso de Bio-Manguinhos, a primeira Transferência de Tecnologia ocorreu após uma epidemia de meningite meningocócica nos anos 70, através de uma parceria com o Instituto Mérieux. O acordo incluiu a doação de cerca de trezentos equipamentos, materiais, treinamento de técnicos brasileiros na França e assistência técnica gratuita. A instalação e a operação da produção ficaram sob a responsabilidade dos técnicos enviados pela Mérieux, durante o primeiro do contrato. A FIOCRUZ ficou encarregada de criar um fundo para o desenvolvimento da produção de imunizantes para financiar pesquisas em imunologia, as despesas de implementação da unidade piloto, o custeio de estágios na França e os fretes do material doado oriundos da Inglaterra, França e Estados Unidos. Assim, em 1976 foi inaugurada a Unidade Piloto de Produção de Vacinas Bacteriana responsável pela fabricação da vacina contra meningite AC (AZEVEDO e cols, 2007).

A Transferência de Tecnologia para Bio-Manguinhos continua sendo uma estratégia muito significativa para o suprimento de vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico ao SUS. O processo é realizado conforme as demandas do MS e é realizado através de contratos onde a empresa detentora do produto transfere a tecnologia com todas as informações necessárias para uma correta assimilação. Estas informações de maneira geral são: características do produto, os processos de fabricação de forma detalhada, os testes do controle da qualidade, os ensaios clínicos realizados e as validações analíticas e bioanalíticas das metodologias.

Para regulamentar esta atividade a Agência de Vigilância Sanitária, ANVISA, dispõe da RDC N° 50 de 2012, sobre os procedimentos para registro de produtos em

processo de desenvolvimento ou transferência de tecnologia de interesse do SUS. Segundo a resolução:

“Parcerias de Desenvolvimento Produtivo - são parcerias realizadas entre instituições públicas e outras de mesma natureza ou ainda instituições públicas e empresas privadas com o objetivo de permitir o acesso a tecnologias prioritárias e a redução da vulnerabilidade do Sistema Único de Saúde (SUS), mediante o comprometimento de internalização da produção ou o desenvolvimento novas tecnologias estratégicas”.

“Produtos em Processo de Desenvolvimento Produtivo - são medicamentos ou produtos para saúde que sejam objeto de processos de desenvolvimento, inovação ou transferência de tecnologia, contemplados em Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo avalizadas pelo Ministério da Saúde”.

A Transferência de Tecnologia proporciona à Bio-Manguinhos produzir vacinas preconizadas no Programa Nacional de Imunização (PNI) com o objetivo de suprir as demandas epidemiológicas do país, mas também acrescenta desenvolvimento tecnológico para instituição e qualifica a mão-de obra, caracterizando um processo inovador de extrema relevância (BARBOSA e cols., 2009).

Durante a Transferência de Tecnologia, o Departamento de Controle de Qualidade é muito importante para garantir a qualidade do produto e a segurança dos usuários. Ele é responsável pelas atividades referentes à amostragem, às especificações, aos ensaios e a liberação do produto (ANVISA, 2010). Para os produtos estéreis como as vacinas, os ensaios físico-químicos compreendem a determinação de pH, condutividade, umidade, análises qualitativas e quantitativas de matérias-primas, produtos intermediário e final. Já os ensaios microbiológicos analisam a esterilidade, endotoxinas, potência, identidade e toxicidade inespecífica.

Em paralelo as atividades do Controle da Qualidade, o produto também necessita ser submetido a pesquisa clínica para a confirmação terapêutica, inocuidade e a segurança do produto (ANVISA, 2008; OPAS, 2005).

1.4 – Pesquisa Clínica

A pesquisa clínica ou estudo clínico consiste em qualquer investigação em seres humanos, envolvendo intervenção terapêutica e diagnóstica com produtos registrados ou passíveis de registro, com objetivo de descobrir ou verificar os efeitos farmacodinâmicos, farmacológicos, farmacocinéticos, clínicos e /ou outros efeitos do produto em investigação, verificando sua segurança e eficácia (ANVISA, 2008; OPAS, 2005).

Durante o estudo, a farmacologia do medicamento é analisada, como por exemplo, os efeitos bioquímicos, o mecanismo de ação, a absorção, distribuição, biotransformação, excreção e o uso terapêutico, havendo uma sinergia entre a ciência e a pesquisa clínica, contribuindo para a introdução de novos medicamentos ou para a melhoria dos já existentes (ARBIT e cols., 2006; OPAS, 2005; FRIEDMAN e cols.,1998).

A pesquisa clínica é fundamentada nos estudos realizados em seres humanos (OLIVEIRA, 2006; OPAS, 2005) e consiste em 4 fases bem definidas:

- Fase I: Uso do medicamento pela primeira vez em seres humanos, onde são realizados testes de segurança, interação com alimentos, com outros fármacos e com o álcool. É realizada em um número restrito de adultos saudáveis, cerca de 20 a 100 indivíduos;
- Fase II: Reavaliar a segurança e a eficácia do medicamento, a bioequivalência e a biodisponibilidade. É realizada em uma população de cerca de 100 a 300 indivíduos, portadores da doença, ou condição para o qual o medicamento está sendo estudado. No caso das vacinas é definido o esquema mais apropriado para a aplicação, onde os testes são chamados de Estudos de Imunogenicidade Exploratória e são realizados em crianças;
- Fase III: Realizada em larga escala, em estudo multicêntrico, com diferentes populações de pacientes para demonstrar eficácia, segurança, conhecimento do produto em doenças de expansão e estabelecimento do perfil terapêutico. No caso das vacinas é verificado se a vacina apresenta característica imunogênica. Esta fase é realizada em crianças;

- Fase IV: Inicia-se pós-comercialização, conhecida como farmacovigilância. Constitui-se no acompanhamento do uso do medicamento em milhares de pessoas, com a finalidade de adquirir mais informações sobre a segurança e eficácia, dando ênfase nos efeitos colaterais desconhecidos anteriormente. No caso das vacinas são avaliados os efeitos e as reações inesperadas nos usuários da nova vacina.

Estes estudos são guiados através de normas internacionais e nacionais, sendo que no Brasil a ANVISA regulamenta o assunto através da Resolução RDC N.º 39 de 2008. Essas normas asseguram a robustez científica do estudo quanto à ética. Os dados encontrados devem ser seguramente mantidos para que possam ser verificados, independentemente do lugar em que o estudo seja desenvolvido (ANVISA, 2008; OPAS, 2005).

Devido a este fato, as vacinas produzidas através de transferência de tecnologia necessitam ser submetidos apenas a confirmação terapêutica (fase III), porém a empresa detentora do medicamento deverá apresentar a documentação completa da pesquisa clínica e o registro na base de dados na pesquisas clínicas International Clinical Trials Registration Platform / World Health Organization (ICTRP/WHO) ou outras reconhecidas pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (ANVISA, 2008).

Durante a execução da pesquisa clínica são necessárias atividades que permitam garantir a interpretação correta dos dados, com documentos registrados conforme as Boas Práticas Clínicas (BPC) e as exigências sanitárias vigentes. Neste aspecto, segundo a Garantia da Qualidade, é necessário verificar os requisitos de qualidade durante a fase III da pesquisa clínica, utilizando metodologias bioanalíticas que comprovem a qualidade e a imunogenicidade da vacina (ANVISA, 2010; ANVISA, 2008; EMEA, 2002)

1.5 – Métodos bioanalíticos (bioensaios)

Bioensaios são ensaios analíticos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas como: soro, sangue e plasma. No caso das vacinas, os bioensaios são utilizados para analisar amostras biológicas oriundas da pesquisa clínica, para a verificação da imunogenicidade e para os demais testes de desempenho. Os lotes de vacinas utilizados na pesquisa clínica são utilizados também para os testes de estabilidade e para a comprovação da consistência da fabricação (ANVISA, 2012; EMEA, 2011; FDA, 2001; USP, 2010).

Os bioensaios apresentam uma grande variabilidade nos seus resultados devido à natureza das matrizes e particularidade do sistema imunológico, onde há variações de sensibilidade individual. Também são incluídas como fontes de interferência, a amostragem, o preparo da amostra, ou seja, fatores operacionais, sendo essas variações entendidas e aceitáveis pelos órgãos reguladores (LIMA, 2011; USP, 2010; FDA, 2001).

Segundo a WHO (1997) os bioensaios apresentam três categorias:

- Ensaios de ligação: envolvem a ligação de anticorpos e antígenos, de forma específica. Esta especificidade é dada através da afinidade entre anticorpo e epítipo (região do antígeno que ocorre a ligação com o anticorpo), da valência do antígeno e anticorpo e também pelo arranjo estrutural da interação. Desta forma o anticorpo é precisamente específico para um antígeno (MARTINS, 2005). Vários ensaios imunobiológicos podem ser exemplificados, como:

- Teste de inibição da hemaglutinação (IH): No teste IH, o vírus com capacidade de hemaglutinante para hemácias de ave – é misturado ao soro do paciente. A capacidade de hemaglutinação do vírus é bloqueada pela reação do vírus com anticorpo específico, portanto se o soro do paciente possuir anticorpos haverá a formação do complexo antígeno-anticorpo e quando as hemácias forem introduzidas não ocorrerá a hemaglutinação (Figura 7), o que confirma a presença dos anticorpos específicos. No caso da ausência de anticorpos, não ocorrerá a formação

do complexo antígeno-anticorpo e conseqüentemente haverá hemaglutinação induzida pelo vírus, confirmando teste negativo para a presença de anticorpos (SANTOS e cols., 2008; FUJINO, 2007; NIEDRIG e cols.,1999).

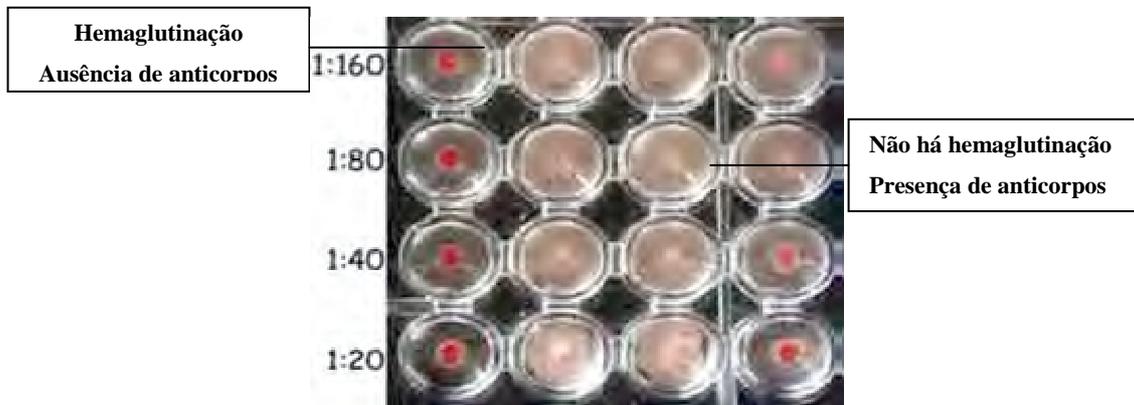


Figura 7 : Imagem ilustrativa do teste de inibição da hemaglutinação. Fonte: Manual Virologia Prática, 2008.

- Teste de imunofluorescência é utilizada anticorpos marcados (conjugados) com corantes fluorescentes para revelar a formação de imunocomplexos vírus-anticorpo (Figura 8). O teste pode ser imunofluorescência direta ou indireta (SIMÕES, 2012; NIEDRIG e cols., 2008; SANTOS e cols., 2008). A detecção de anticorpos é realizada com o soro do paciente adicionado a células infectadas fixadas em uma lâmina de microscópio. A lâmina é incubada e posteriormente lavada para a remoção dos anticorpos não ligados e imediatamente um anticorpo anti-imunoglobulina conjugado é adicionado. A lâmina é incubada e lavada novamente e observa-se ao microscópio de fluorescência. Havendo anticorpos para o vírus alvo, o conjugado se ligará ao imunocomplexo formado e a fluorescência será verificada (teste positivo), conforme a figura 8. Não havendo anticorpos específicos para o vírus não haverá fluorescência, sendo o teste considerado negativo (SIMÕES, 2012; NIEDRIG e cols., 2008; SANTOS e cols., 2008).

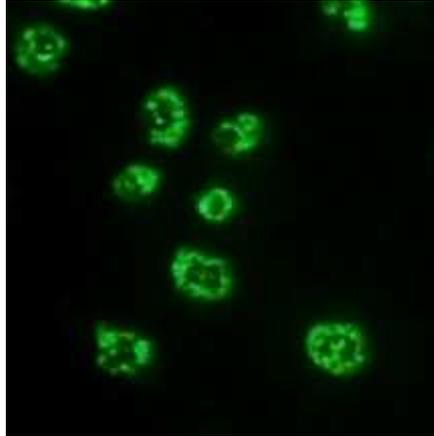


Figura 8 – Imagem ilustrativa do teste de imunofluorescência. Fonte: <http://www.alka.com.br/site/produto-detalle.asp?cod=892>. Acesso: 06/06/2014.

- O teste de ELISA (EIE) é uma reação imunoenzimática para identificação de antígenos ou a identificação de anticorpos. Para a detecção de anticorpos, o antígeno viral é fixado ao suporte sólido e o soro do paciente é adicionado. Em seguida, ocorre a lavagem do sistema para a retirada do material que não reagiu e o conjugado é adicionado (anticorpo anti-imunoglobina humana conjugado com a enzima é adicionado). O material é incubado e lavado e o substrato é adicionado para que a enzima atue sobre ele. Se o soro possui anticorpos para o vírus, o conjugado se unirá aos imunocomplexos formados e haverá mudança de cor devido à atuação da enzima sobre o substrato, sendo o resultado considerado positivo (figura 9). Se o soro não possui, não haverá ligação entre conjugado e imunocomplexo, não haverá mudança de coloração, sendo o teste considerado negativo. A conclusão do teste pode ser qualitativa (observação) ou quantitativa (através de leitura em espectrofotômetro) da comparação da densidade ótica da amostra e padrão. (SIMÕES, 2012; NIEDRIG e cols., 2008; SANTOS e cols., 2008).



Figura 9 – Imagem ilustrativa do teste ELISA. Fonte: <http://www.patologias.net/2010/05/teste-elisa-2/>. Acesso em 06/03/2014.

- **Ensaio em animais:** São utilizados cobaias (figura 10), como camundongos, coelhos, macacos, entre outros, para a realização de ensaios como testes de pirogênio, segurança geral (toxicologia) e potência.



Figura 10: Imagem ilustrativa do ensaio in vivo. Fonte: <https://www.google.com.br/search?hl=ptPT&site=imghp&tbn=isch&source=hp&biw=1440&bih=806&q=ensaio+in+vivo>. Acesso: 24/01/2014

- O teste de pirogênio baseia-se na medida do aumento da temperatura corporal de coelhos, após injeção intravenosa de solução estéril em análise. Os pirogênios são substâncias que quando injetadas em humanos e animais causam elevação da temperatura corporal, podendo ser exógenos (que se originam fora do corpo de origem bacteriana, de fungos, vírus e não-microbiana) ou endógenos (que são produzidos internamente pelo hospedeiro em resposta ao pirogênio exógeno, considerado o mediador primário da febre). No caso de produção de medicamentos injetáveis é proibida a presença de pirogênios (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; BRUM, 2009).

- O teste de segurança ou toxicidade baseia-se na reação da reatividade biológica inesperada e não aceitável em um medicamento. É utilizado para avaliar a segurança de produtos biológicos e derivados de tecnologia. São utilizados camundongos saudáveis, de ambos os sexos, o teste consiste em administrar o produto em avaliação nos animais conforme indicado no teste. O teste é considerado satisfatório se o número de camundongos mortos não for maior que 10% do total de animais submetidos ao teste e nenhum apresentar sintomas anormais de toxicidade (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).
- O teste de potência *in vivo* é empregado para quantificar a atividade do produto biológico, ou seja, é a capacidade do produto, administrado em uma dose determinada a estimular uma resposta específica. A técnica é utilizada para verificar a soroneutralização em camundongos (SILVA e cols., 2013; LIMA e cols., 2011).

- **Ensaio em células:** através da ligação antígeno-anticorpo, o sistema imunológico produz uma resposta em células específicas, como a lise celular e a fusão celular, onde são mensurados a potência e a imunogenicidade proporcionada pela vacina (LIMA, 2011; FUCHES,2010; FDA, 2001):

O teste de neutralização é o mais utilizado para a comprovação da imunogenicidade das vacinas virais, sendo o método de referência ou método ouro, utilizado para a determinação do nível de anticorpos neutralizantes presentes em uma amostra de soro, onde é determinado a capacidade de diluições do soro de um determinado indivíduo em impedir a formação de placas de lise em células suscetíveis. Baseia-se na reação do vírus infeccioso com o anticorpo específico formando o complexo antígeno-anticorpo e quando o vírus não é neutralizado há a capacidade de infectar células permissivas, verificado pela lise celular. Basicamente o teste é realizado em duas etapas, na primeira etapa, o anticorpo e o vírus infeccioso são misturados e levados para incubação, para que ocorra a interação antígeno-anticorpo. Na outra etapa, alíquotas do antígeno-anticorpo são inoculados em cultura de célula. Após incubação e coloração, a cultura pode ser examinada tanto em um transiluminador, quanto em equipamento específico, como por exemplo o *BioSpot*, para a verificação das placas de lise. Havendo anticorpos, ocorre a ligação na primeira etapa, e o vírus é neutralizado e

não irá infectar a cultura de célula, não havendo anticorpos, não haverá ligação antígeno-anticorpo e o vírus continuará infeccioso havendo ataque a cultura de células (figura 11) formando placas de lise (SIMÕES, 2012; SANTOS cols., 2008).

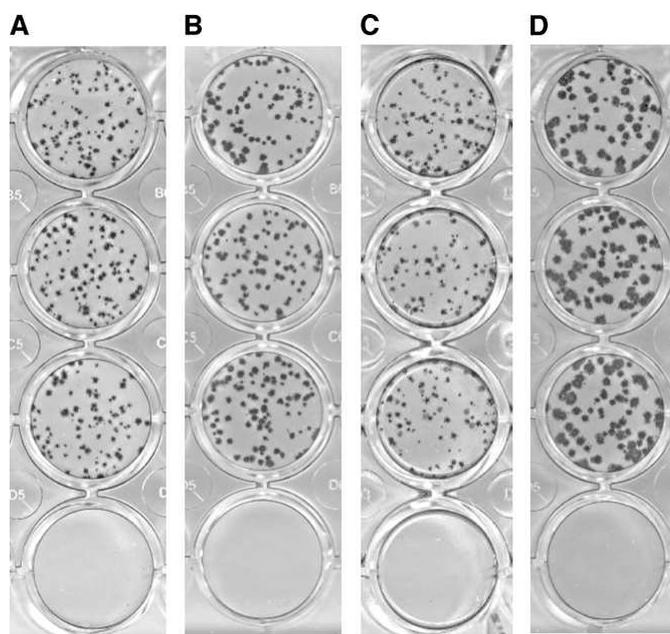


Figura 11 – Imagem ilustrativa do teste PRNT em placa de 24 poços. Fonte: TIMIRYASOVA e cols., 2013.

Para a aplicação dessas metodologias nas pesquisas clínicas de vacinas é necessário e imprescindível que as mesmas sejam submetidas ao processo de validação bioanalítica para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos e a robustez do estudo(ANVISA, 2010).

1.6 – Processo de Validação

A validação é um ato documentado que consiste em demonstrar a confiabilidade e a rastreabilidade dos resultados expressos em uma metodologia visando garantir a qualidade do produto e a segurança do paciente (ANVISA 2003; ANVISA 2010; ANVISA 2012).

O processo de validação é exigido pela legislação vigente para registrar um medicamento. No caso de validação de metodologia é necessário demonstrar que o método é estável, apropriado para a finalidade pretendida e tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida (ANVISA 2012; EMEA, 2012; ANVISA 2010; INMETRO, 2010; ANVISA, 2003; EMEA, 1995).

Nas metodologias bioanalíticas desenvolvidas nos laboratório do setor de desenvolvimento da própria empresa, a validação deve ser um processo contínuo e deve ser iniciada no planejamento da estratégia analítica até o desenvolvimento completo. Neste contexto, a validação deve analisar todos os parâmetros estabelecidos, com exceção da reprodutibilidade, que é a concordância entre os resultados gerados entre laboratórios distintos. No caso de metodologias já existentes e não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, é necessário realizar todos os parâmetros de validação de bioensaios referente a finalidade da metodologia (quadro 3) (WHO, 1997):

Quadro 3: Parâmetros de validação segundo a finalidade da metodologia^a.

Parâmetros de validação segundo a finalidade da metodologia					
Parâmetro	Identidade	Impurezas		Potência	Composição
		Quantidade	Limites		
Precisão		X		X	X
Exatidão		X		X	X
Linearidade		X		X	X
Especificidade	X	X	X	X	X
Limite de detecção	X				
Limite de quantificação		X	X		
Robustez	X	X	X	X	X

^aFonte: WHO: *guide to good manufacturing practice (GMP) requirements – Part 2: Validation*. WHO, 1997a.

No caso de transferência de metodologias, dentro da transferência tecnológica, entre matriz e subsidiárias, a metodologia deverá ser validada parcialmente, desde que a validação original com todos os parâmetros de validação seja anexada, sendo necessária a realização dos testes de linearidade, especificidade e precisão (ANVISA, 2003).

A metodologia deverá ser revalidada em casos de alterações significativas que possam afetar a confiabilidade do método, como mudanças na síntese da substância ativa, mudanças na composição do produto acabado, alterações da matriz biológica e mudanças do procedimento analítico. Neste caso, avaliações da precisão, exatidão e

limite de quantificação são considerados testes mínimos necessários em uma revalidação (ANVISA, 2003).

1.7 – Validação de métodos bioanalíticos (bioensaios)

Com o crescimento da pesquisa, desenvolvimento e produção de produtos imunobiológicos durante os últimos anos, como as vacinas, houve a necessidade de controlar a qualidade e avaliar a resposta imunobiológica desses produtos. Para isso, as metodologias bioanalíticas aplicadas para esta finalidade devem ser validadas para evidenciar que o método é adequado e robusto, garantindo assim a confiabilidade dos resultados encontrados (ANVISA, 2012; FDA, 2001; FUCHES, 2010; WHO, 1997).

Atualmente os documentos oficiais para validação de métodos bioanalíticos são:

- A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements Part 2: Validation, 1997
- Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, FDA, 2001
- The United States Pharmacopeial – Biological Assay Validation, USP, 2010.
- European Medicines Agency - Guidance on Bioanalytical Methods Validation, EMEA, 2011
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Guia de validação de métodos bioanalíticos

Os guias são documentos que sugerem uma linha de trabalho a ser seguida e são abertas a discussões e interpretações, podendo ser analisadas e adaptadas conforme o método a ser validado. Entretanto, as resoluções são documentos com poder de lei e devem ser seguidas a risca obrigatoriamente (RIBANI cols., 2004).

Os compêndios oficiais, como as farmacopeias, apresentam normas e especificações que devem ser seguidas pelos produtores de medicamentos. No Brasil, a quinta edição da Farmacopéia Brasileira (FB) deve ser utilizada, mas na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais, monografias oficiais como as farmacopéias, em sua última edição, na forma disposta em

normas específicas pode ser utilizada. No caso do validação de bioensaios, a FB não contempla este assunto, sendo necessário a utilização de outros compêndios oficiais (FB, 2010).

Um fato relevante nestes documentos, é que a FDA e a ANVISA apresentam um roteiro de validação priorizando os métodos cromatográficos. Enquanto a USP e a WHO seguem um roteiro de validação de bioensaios de maneira mais ampla e essencialmente com caráter biológico (CASSIANO e cols., 2009).

Além disso, estes documentos apresentam interpretações distintas em relação aos parâmetros de validação de bioensaios, como demonstrado no quadro 4:

Quadro 4: Parâmetros de validação para bioensaios^a

	Parâmetros de Validação de Bioensaios			
WHO, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Precisão	Precisão	Precisão	Precisão	Precisão
Exatidão	Exatidão	Exatidão	Exatidão	Exatidão
Seletividade	Seletividade	Especificidade	Seletividade	Seletividade
Intervalo	Recuperação	Intervalo	Efeito Residual	Efeito residual
Linearidade	Curva de calibração		Curva de Calibração	Curva de calibração
Limite de detecção	Estabilidade		Estabilidade	Estabilidade
Limite de quantificação			Efeito Matriz	Efeito matriz
Robustez			Limite inferior de quantificação	

^aFonte: WHO, 1997; FDA, 2001; USP 2010, ANVISA, 2012.

Os conceitos dos parâmetros da validação dos bioensaios são:

- Precisão: proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte matriz;
- Exatidão: concordância entre os resultado de um ensaio e um valor de referência;
- Seletividade/ especificidade: capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e PI na presença de outros componentes da amostra;

- Efeito residual: efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente;
- Curva de calibração: relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito;
- Estabilidade: demonstração da estabilidade do analito na matriz biológica nas condições de armazenamento por períodos determinados e após ciclos de congelamento e descongelamento;
- Robustez: medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros bionalíticos;
- Efeito matriz: efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica;
- Limite de detecção: menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob condições experimentais estabelecidas;
- Limite de quantificação: menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas;
- Recuperação: proporção da quantidade de interesse, presente ou adicionada (spike) na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.

Assim sendo, em função do exposto acima, no quadro 4, é possível compreender porque há tanta discussão e dúvidas no hora de desenvolver e validar os bioensaios, pois os documentos apresentam pontos e abordagens distintas.

2– JUSTIFICATIVA

Os bioensaios são utilizados na indústria de imunobiológicos em testes de controle da qualidade e no estudo clínico de produtos em desenvolvimento ou de transferência de tecnologia para avaliação da resposta imunobiológica (imunogenicidade) esperada.

Estes ensaios apresentam usualmente um grau de variabilidade alto e necessitam de regulamentações pertinentes para uma validação de metodologia robusta para garantir a confiabilidade dos resultados. Porém, os documentos disponíveis apresentam direcionamentos diferentes (quadro 4) e não específicos para estudos de pesquisa clínica de imunobiológicos.

No caso de Biomanguinhos, as vacinas oriundas de transferência de tecnologia são obrigatoriamente submetidas a pesquisa clínica fase III e as vacinas desenvolvidas na unidades são necessárias as fases I, II e III, onde todos os bioensaios realizados necessitam estar validados para assegurar a confiabilidade dos dados encontrados no estudo, segundo a RDC nº39 de 2009 da ANVISA que dispõe sobre o regulamento para a realização de pesquisa clínica e também para a nacionalização e registro do produto, segundo a RDC nº 55 de 2010 da ANVISA que dispõe sobre registro de produtos biológicos.

A RDC 27 de 2012 da ANVISA, descreve parâmetros específicos para métodos que utilizam amostras biológicas (soro, plasma e sangue), porém a mesma não faz nenhuma distinção entre os bioensaios, acarretando uma deficiência na execução da validação bioanalítica.

Portanto este trabalho é muito importante devido a necessidade de uma legislação de validação de bioensaios direcionada a pesquisa clínica para imunobiológicos, que poderá proporcionar uma grande melhoria na aplicabilidade e pertinência deste assunto.

3 – OBJETIVO

3.1 – Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a aplicação da RDC N°27, de 17/05/2012 da ANVISA na validação de métodos bioanalíticos aplicados em pesquisa clínica para imunobiológicos, particularmente em vacinas.

3.2 – Objetivos específicos

- Avaliar a aplicação da RDC 27 de 2012 da ANVISA na validação do teste de neutralização por redução de placa de lise para sarampo em placas de 96 poços (*micro-PRNT*);
- Avaliar na literatura científica metodologias utilizadas para a validação de métodos imunobiológicos;
- Avaliar a viabilidade técnica de aplicação destes modelos na indústria de imunobiológicos – Biomanguinhos;
- Avaliar um estudo de caso na aplicação da validação bioanalítica conforme a RDC 27 da ANVISA no teste de neutralização por redução por redução de placa de lise para sarampo em placas de 96 poços (*MICRO-PRNT*);
- Propor diretrizes de validação de bioensaios para pesquisa clínica em imunobiológicos, particularmente em vacinas.

4 – METODOLOGIA

Neste trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico utilizando compêndios oficiais, legislações vigentes e artigos científicos nos quais o teste de *micro*-PRNT é utilizado. Para este objetivo foi utilizado palavras chaves como validação, validação de bioensaios, pesquisa clínica, vacinas, PRNT, dentre outras nas bases de dados Medline e SciFinder, que apresentam as publicações científicas mundiais indexadas pelo Chemical Abstracts sem restrição de tempo, mas priorizando os trabalhos publicadas da última década.

Ainda neste contexto, foi realizada uma comparação entre os guias, compêndios oficiais e legislação vigente sobre a validação de métodos bioanalíticos (bioensaios) para obtenção de conceitos principais e robustos sobre o assunto para o desenvolvimento da dissertação.

O estudo de caso foi realizado no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), pertencente a Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) de Bio-Manguinhos e a avaliação dos dados e os cálculos estatísticos foram realizados pela Seção de Validação Analítica (SEVAN) pertencente ao Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV)/ Departamento de Garantia da Qualidade (DEGAQ).

4.1 - ESTUDO DE CASO: Validação do teste de neutralização por redução de placa de lise para sarampo em placas de 96 poços (*MICRO*-PRNT)

4.1.1- Princípio da metodologia

No teste de neutralização por redução de placa de lise, *MICRO*-PRNT do estudo em questão, as amostras teste foram submetidas à diluição seriada em uma placa de 96 poços, utilizando uma coluna para cada amostra. Foram reservadas 2 colunas: uma para o soro padrão (controle positivo) e a outra para o controle viral. Posteriormente, 50µL suspensão de vírus, preparada no momento do uso e diluída de maneira que se tenha uma média de 30 placas de lise / poço (determinada previamente por titulação viral), foi adicionada em cada poço da placa e esta foi incubada por 2 horas na estufa (37°C e 5% CO₂) para que ocorresse a neutralização. Após esse período, foi acrescentado 50 µL suspensão de células Vero com 1.600.000 células/mL, preparada no momento do uso, e as placas foram incubadas novamente por 3 horas na estufa (37°C e 5% CO₂) para que

ocorra a adsorção e a formação da monocamada celular. Após essa incubação, o sobrenadante foi descartado e foi 100 μ L adicionado o meio semi-sólido de carboximetilcelulose 1,5% (CMC). Após 6 dias de incubação a 37°C e 5% CO₂, os vírus remanescentes, isto é, aqueles que não foram neutralizados, formaram placas de lise na monocamada celular (figura 12). Esta foi fixada com formaldeído 10% por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagem com água corrente, a placa foi corada com 100 μ L de cristal violeta por 30 minutos. As mesmas foram lavadas e secas à 37°C. As placas de lise tanto da coluna de vírus como das amostras e soro padrão foram contadas e comparadas. O título de anticorpos neutralizantes foi definido como a recíproca da última diluição do soro que reduz o número de placas de lise em 50% em relação ao número de placas de lise obtidas no controle viral. A determinação dos títulos foi calculada por regressão linear e o resultado dado em log₁₀ mUI/mL.

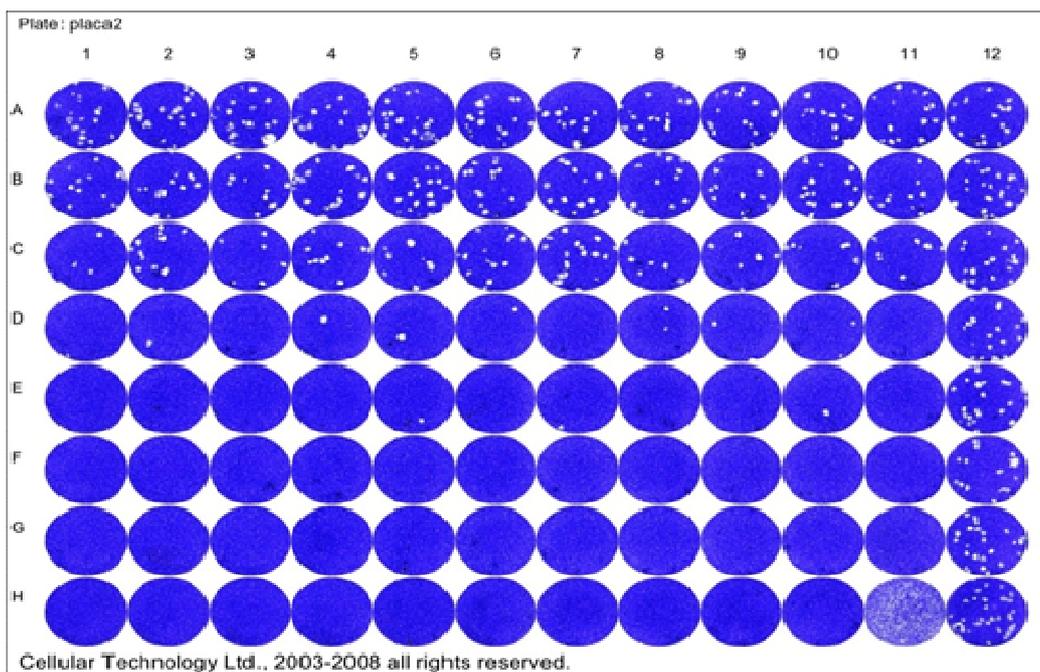


Figura 12 – Imagem ilustrativa do teste de micro-PRNT em placa de 96 poços para sarampo. Fonte: SIMÕES e cols., 2012.

4.1.2 – Material e métodos

Soro de referência (padrão positivo *in house*) :

O soro 60/12 foi selecionado entre as amostras de soros doados pela Seção de Caracterização Sorológica, SECAS/BIO-MANGUINHOS, por apresentar alto título de anticorpos e foi padronizado frente ao soro de referência internacional NIBSC para ser utilizado como controle positivo dos ensaios de PRNT para sarampo e atribuir o valor em milionidades internacionais dos soros dosados.

Vírus de referência:

O vírus utilizado de sarampo para o ensaio foi o da cepa Schwarz lote Vero 3^a passagem (P3), produzido em 25/01/11.

Soro negativo:

Como controle negativo foi utilizado o soro A15 proveniente de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) usado como controle negativo no Laboratório de Neurovirulência, LANEU/ BIO-MANGUINHOS.

Soros Amostrais

Os soros amostrais (55/12, 54/12, 56/12 e 02/12) utilizados no ensaio foram provenientes da hemorrede nacional, através do convênio 1429 da Coordenação Nacional de Política de Sangue e Hemoderivados.

Procedimento de Validação:

Para realização deste estudo 4 (quatro) parâmetros de validação preconizados pela RDC 27 foram realizados: curva de calibração, exatidão, precisão e seletividade. Também foi definido o limite inferior de quantificação, devido a importância da sensibilidade da metodologia, por ser um método quantitativo.

As amostras utilizadas nos parâmetros de validação são definidas segundo a RDC 27 da ANVISA de 2012:

- Amostra de controle de qualidade (amostra de CQ): amostra de matriz adicionada do analito em concentração específica, usada para validar e monitorar o desempenho de um método bioanalítico;

- Amostra de controle de qualidade de alta concentração (amostra de CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75 (setenta e cinco) e 85% (oitenta e cinco por cento) da maior concentração da curva de calibração;
- Amostra de controle de qualidade de baixa concentração (amostra de CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração até 3 (três) vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ);
- Amostra de controle de qualidade de diluição (amostra de CQD): amostra de matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (LSQ), analisada por meio de procedimento e proporção de diluição pré-definidos e especificados pelo laboratório bioanalítico;
- Amostra de controle de qualidade de média concentração (amostra de CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação;
- Limite inferior de quantificação (LIQ): menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;
- Limite superior de quantificação (LSQ): maior concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;

A curva de calibração foi o primeiro ensaio a ser realizado, através de uma diluição seriada (fator 2 de diluição) do padrão positivo *in house* 60/12, obtendo as diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:512, 1:1024, 1: 2048 e 1:4096, onde cada diluição foi testada em sextuplicata, realizado por um único operador em 3 (três) dias consecutivos. A partir deste ensaio foram definidos as 5 (cinco) concentrações de anticorpos: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, necessárias para a validação do teste.

Os padrões de calibração estão aprovados quando atenderem aos seguintes critérios:

Desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ e desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

A curva de calibração deve atender aos seguintes critérios para ser aprovada:

No mínimo 75% (setenta e cinco por cento) dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores e no mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores.

Para o parâmetro de exatidão o padrão *in house* 60/12 foi submetido ao teste de MICRO-PRNT, onde houve a concordância entre o resultado encontrado e o valor nominal do padrão.

O parâmetro de precisão foi realizado em 5 (cinco) réplicas de cada uma das concentrações/ identificação dos soros amostrais: LIQ: 55/12 diluída dez vezes, CQB: 55/12, CQM: 54/12, CQA: 56/12 e CQD: 02/12 e foram avaliadas em um mesmo ensaio e em ensaios distintos, precisão intra e inter corrida, respectivamente.

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento).

O parâmetro seletividade foi realizado com as seguintes amostras: controle positivo sarampo (padrão *in house* 60/12), controle negativo sarampo (A15), amostra positiva caxumba (SIH142 - amostra humana obtida no estudo “soro *in house*”), controle negativo caxumba (AA61), onde todas as amostras foram aplicadas em triplicata e as três colunas da placa de 96 poços foram mantidas com o controle do vírus.

O limite de quantificação foi definido através da menor diluição do soro (1:5) que permita a quantificação de anticorpos neutralizantes de amostras pouco concentradas.

4.1.3 – Cálculos

Título de Anticorpos:

Primeiramente calcula-se o *end-point* do teste, que é o ponto onde há uma redução de 50% do número das placas de lise em relação ao número de placas de lise

obtidos no controle de vírus. Assim, o título de anticorpos neutralizantes será definido como a recíproca da última diluição do soro que reduz o número de placas de lise em 50%. O *endpoint* de 50% do teste será determinado dividindo-se por dois a média aritmética do número de placas de lise obtidas no controle do vírus.

Para calcular a diluição em que se encontra o soro teste foi realizada uma regressão linear com as placas de lise dos orifícios correspondentes a uma diluição imediatamente superior e imediatamente inferior ao *end point* do teste.

O cálculo da correspondência da diluição obtida com o resultado em mUI/mL foi obtido com o soro padrão. O valor de anticorpos do soro padrão, que é calibrado com um soro internacional da NIBSC e usado atualmente, tem o valor de 3140 mUI/mL.

Para os resultados expressos em log foram calculados através de planilha Excell.

Análises Estatísticas:

A curva de calibração e da precisão foram avaliados através dos coeficientes de variação dos resultados obtidos.

O coeficiente de variação (CV) é uma forma simples de avaliar a dispersão de uma variável (BASTOS & DUQUIA, 2007) e é utilizado para um conjunto de dados amostrais populacionais não-negativos, expresso como um percentual, correspondendo o desvio padrão relativo à média e é definido com a seguinte expressão (TRIOLA, 2011):

$$Cv = 100 \cdot \frac{s}{\bar{X}}$$

Onde,

$C_v \rightarrow$ é o coeficiente de variação

$s \rightarrow$ é o desvio padrão

$\bar{X} \rightarrow$ é a média dos dados

O coeficiente de variação é dado em %, por isso a fórmula é multiplicada por 100. Quanto menor o CV mais homogêneo é o conjunto de dados (TOLEDO & OVALLE, 1995).

A exatidão foi calculada segundo a fórmula a seguir:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Valor encontrado}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo da validação de métodos, dentro de um Sistema de Gestão de Qualidade, é o alto grau de segurança e a credibilidade dos resultados obtidos, sendo um requisito obrigatório para o registro de produtos e nas inspeções anuais da ANVISA, (2010).

Esta validação deve demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida e pode ser dividida em validação de métodos analíticos e validação de métodos bioanalíticos (bioensaios). Os métodos analíticos são utilizados na determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (ANVISA, 2003) e a validação de bioensaios são utilizados para a verificação de ensaios como inocuidade, imunogenicidade e toxicidade em matrizes biológicas empregados em estudos de registros e pós-registros no Brasil (ANVISA, 2012; OPAS, 2005).

No caso de Bio-Manguinhos, a validação analítica aplica-se as metodologias físico-químicas aplicadas em matérias-primas, produtos intermediários, produto acabado e testes de estabilidade, onde são verificados a pureza, a conformidade, entre outras características que retratam a qualidade preconizada do produto. Já a validação de bioensaios aplica-se a pesquisa clínica de produtos oriundos de desenvolvimento tecnológico e ou transferência de tecnologia, onde os resultados encontrados no estudo necessitam ser robustos e confiáveis para permitir a comprovação da eficácia, inocuidade e segurança do produto (OPAS, 2005).

Os bioensaios e suas respectivas validações utilizados nas pesquisas clínicas, dissertados neste estudo, utilizam como referências os documentos oficiais da OMS, FDA, USP, EMEA e ANVISA conforme o quadro 4 (página 39), porém a RDC 27 de 2012 da ANVISA a legislação mandatória do Brasil referente a este assunto.

A descrição dos parâmetros de validação desses documentos, estão citados nos anexos I a XI, onde é possível observar as variáveis, igualdades e especificações.

Após uma análise rigorosa, seguem abaixo as principais características de cada documento:

**OMS - Guia de Boas Práticas de Fabricação (BPF) Parte 2: Validação, 1997
(WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements Part 2:
Validation, 1997)**

O guia apresenta abordagens muito importantes, que não são citados em outros documentos referentes a este tipo de validação, como:

Os bioensaios são classificados em 3 (três) grandes categorias: ensaios de ligação, em células e em animais. Estas categorias são caracterizadas e diferenciadas, pelas aplicações, dificuldades, pelos parâmetros de validação conforme o quadro 3 (página 35) e pelos critérios de aceitação. Assim em cada teste são considerados as possíveis causas de variações, direcionando o estudo de validação de maneira específica, selecionando os parâmetros pertinentes para confirmar que o produto está de acordo com o uso pretendido.

Os critérios de aceitação dos bioensaios são os que mais apresentam variações: ensaios de ligação CV de 5 a 20% e ensaios em células e em animais o CV pode ser até 50%, já os outros documentos não levam em consideração as variações inerentes aos bioensaios e apresentam critérios de aceitação apropriados para métodos físico-químicos ou microbiológicos, podendo acarretar dificuldades na avaliação dos resultados do estudo da validação.

Contudo, o guia apresenta um desenho de validação não apropriado, como o preparo de um grande quantitativo de amostras testes e amostra padrão, muitas diluições para obtenção de muitas concentrações, faltando uma abordagem com foco mais biológico. A realidade desses ensaios não apresenta uma grande disponibilidade de material e até mesmo em alguns casos, não há material de referência disponível, acarretando dificuldades de obtenção e alto custo.

FDA - Guia para Indústria – Validação de Métodos Bioanalíticos, 2001 (Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, FDA, 2001).

O guia recomenda que desenvolvimento do método bioanalítico ocorra simultaneamente com a sua respectiva validação, especificando os seguintes ensaios:

I - Desenvolvimento de bioensaios: ensaio físico-químico em matriz biológica:

O documento descreve que os bioensaios devem ser seletivos e sensíveis para a avaliação quantitativa de fármacos e seus metabólitos, para a realização da pesquisa pré-clínica ou clínica, orientando a validação de bioensaios utilizados em farmacologia, biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética aplicando-se geralmente em procedimentos que utilizam cromatografia e espectrometria de massa para a determinação quantitativa de drogas e ou metabólitos em matrizes biológicas, como sangue, plasma, soro ou urina. Também é aplicado em ensaios imunológicos e em outras matrizes biológicas como tecidos e amostra de pele.

II - Desenvolvimento de bioensaios: ensaios microbiológicos e ensaios de ligação:

O guia cita que esses tipos possuem características únicas, como presença de uma alta variabilidade e possíveis interferências ligadas à reatividade cruzada de metabólitos, medicamentos concomitantes, entre outros.

Quando possível estes ensaios devem ser comparados com um método validado de referência, como métodos cromatografia, espectrofotometria ou espectrometria de massa, utilizando as mesmas amostras para comparar os testes de precisão. Um bom exemplo é a realização do imunogenicidade de uma determinada vacina através do teste de neutralização e do teste de ELISA paralelamente. Assim, o ensaio alvo é comparado com uma metodologia instrumental, que na maioria dos casos, apresenta uma sensibilidade maior.

Os pontos relevantes neste guia são o detalhamento dos parâmetros de validação e seus respectivos critérios de aceitação para os bioensaios com característica química, microbiológica e ensaios de ligação, com prioridade as metodologias instrumentais como, por exemplo, a cromatografia.

Os pontos negativos do guia são a prioridade nas metodologias instrumentais, o que acarreta um desenho da validação muito direcionado a questão química e não contemplando de maneira mais específica para os demais bioensaios com característica mais biológica, como os ensaios de neutralização, de inibição da hemaglutinação, imunofluorescência, entre outros. Os bioensaios não são classificados segundo a sua aplicabilidade, ou seja, se é qualitativo ou quantitativo, conforme o guia da OMS, necessitando que o analista faça uma análise prévia para selecionar os parâmetros de validação de forma pertinente. Os critérios de aceitação também não são pertinentes

para ensaios *in vivo* e ensaios de ligação (CV \pm 20%), que é um valor baixo e não representa a realidade desses tipos de ensaios. Conforme citado anteriormente, esses ensaios apresentam variações devido a interferências biológicas, imunológicas e operacionais. O quantitativo para a realização dos testes, representados nos anexos I a XI, também é muito alto, como quantidade de amostras e replicatas da curva de calibração, o que acarreta um problema devido a pouca quantidade das amostras disponibilizadas para a pesquisa clínica.

O guia encontra-se em revisão desde setembro de 2013, estando disponível para consulta pública, com objetivo de verificar os avanços da ciência e tecnologia relacionados à validação de bioensaios. Os pontos de discussão mais relevantes são o aumento do critério de aceitação para os parâmetros da validação: CV de até 20% para a CV até 25% para o LIQ e CV de até 15% para CV de até 20% para as demais concentrações, a inclusão no guia dos compostos endógenos, dos biomarcadores, de kits para diagnóstico e informações mais detalhadas sobre métodos cromatográficos.

USP - Validação de Ensaios Biológicos, 2010 (The United States Pharmacopeial – Biological Assay Validation, USP, 2010)

Este compêndio oficial define bioensaios como métodos para determinar a potência da droga de matriz biológica e que podem ser utilizados para mensurar uma resposta bioquímica ou fisiológica no nível celular, as taxas de reação enzimática ou respostas biológicas induzidas por interações imunobiológicas e também contribuem para o desenvolvimento de novos medicamentos de origem biológica.

O documento deixa claro que a validação de bioensaios deve ser diferenciada da validação analítica, por apresentar uma maior variabilidade que os métodos químicos devido aos fatores operacionais e biológicos.

Enfatiza abordagens de validação que fornecem flexibilidade para adoção de novos bioensaios e que a avaliação do desempenho do bioensaio é um processo contínuo, mas a validação da metodologia deve ser realizada após o desenvolvimento do método.

A validação de bioensaios tem como referência o teste de potência, sendo este teste baseado na comparação das respostas de uma amostra e um padrão de referência, onde o padrão é atribuído o valor 1 ou 100%, e a potência é calculada por comparação.

Este compêndio oficial apresenta como ponto forte a descrição de uma validação bem delineada para os ensaios de potência. Os parâmetros de validação são direcionados de forma coerente e de fácil aplicabilidade, facilitando uma boa interpretação dos dados resultantes e uma conclusão bem delineada.

Em relação aos pontos fracos, o documento descreve apenas o teste de potência como bioensaios e na realidade existem outros tipos, como ensaios de ligação e ensaios *in vivo*, tornando-se limitado e sendo de difícil aplicação para os demais tipos de bioensaios. Também não apresenta o quantitativo dos parâmetros de validação, com exceção do teste de precisão e os critérios de aceitação não são relatados.

EMEA. Agência Europeia de Medicamentos – Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos, 2012. (European Medicines Agency – Guideline on bioanalytical method validation, 2012).

Este guia define elementos necessários para a validação de bioensaios com característica quantitativa, ou seja, mensura a concentração de uma determinada droga em uma dada matriz biológica, sendo utilizadas para determinações de parâmetros nos estudos farmacocinéticos e toxicológicos. Assim, a determinação das concentrações das drogas em matrizes biológicas (soro, plasma, sangue, urina e saliva) é importante para o desenvolvimento de um medicamento.

O capítulo sobre os ensaios de ligação pode ser considerado como ponto forte do guia, pois apresenta uma abordagem separada e detalhada sobre este assunto. É relatado que o ensaio é empregado especialmente em macromoléculas e apresentam muitos desafios devido às características inerentes e estruturas complexas dessas moléculas. Assim é necessária uma atenção especial em todas as etapas do ensaio, como por exemplo, o processo de extração do analito na matriz biológica.

Também descreve os desafios relacionados aos padrões de referência destes ensaios. As macromoléculas apresentam características heterogêneas e sua potência e imunoreatividade podem variar, sendo necessária uma caracterização bem detalhada e robusta do padrão. É recomendado que o lote do padrão de referência usado para a preparação de padrões de calibração e as amostras de CQ seja o mesmo que o utilizado para a dosagem nos estudos clínicos e não clínicos. No caso de mudança de lote, uma caracterização analítica e uma avaliação bioanalítica devem ser realizadas antes da utilização para assegurar que as características de desempenho do método não sejam alteradas.

O paralelismo como ferramenta para detectar o efeito matriz e o uso de kits comerciais como suporte de testes farmacocinéticos pode ser utilizado, segundo o guia. Esta informação é muito aplicada nos ensaios utilizados em pesquisa clínica.

Os critérios de aceitação apresentados neste guia juntamente com o guia da OMS de 1997, são os que mais chegam próximo a realidade de um ensaio de ligação, pois citam as possíveis causas de interferências e aceitam que estas interferências não comprometem a confiabilidade dos resultados encontrados.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Guia de validação de métodos bioanalíticos

No Brasil, a ANVISA regulamenta a validação de métodos bioanalíticos através da RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17/05/2012, onde são descritos os requisitos mínimos para serem empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil.

Diante da exigência da implementação desta resolução pela ANVISA para validação de bioensaios esta legislação foi avaliada de maneira mais detalhada e criteriosa para uma posterior conclusão sobre a sua aplicabilidade na pesquisa clínica para a avaliação de imunogenicidade de vacinas.

Primeiramente, os métodos cromatográficos citados como preferenciais são cromatografia gasosa (CG), cromatografia de papel (CP), cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PERES, 2002). Estas técnicas têm como finalidade separar os componentes, identificá-los e purificá-los.

Em termos de validação de bioensaios a resolução é aplicada na CG e a CLAE.

A CG tem como característica um alto poder de resolução, contemplando analisar inúmeras substâncias em uma mesma amostra, com alta sensibilidade permitindo analisar concentrações muito pequenas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método utilizado para separação de espécies iônicas ou macromoléculas e compostos termo lábeis. Atualmente a cromatografia apresenta um alto grau de sofisticação, podendo ser aplicado em diversas áreas e quando aplicável, quase sempre é caracterizado como um ensaio referencial.

Entretanto, esta RDC apresenta uma abordagem pouco direcionada aos demais tipos de bioensaios, como os imunoensaios, que envolvem a ligação de anticorpos e antígenos, de forma específica e com grande sensibilidade, denominados de ensaios de ligação.

O roteiro dos testes de validação é rígido e não específico. Os parâmetros efeito residual e efeito matriz são parâmetros pertinentes a ensaios cromatográficos e não são passíveis de execução nos ensaios de ligação. Diante deste fato, deve ser realizada uma justificativa técnica para a ANVISA descrevendo os motivos da não execução dos testes em cada relatório de validação gerado, acarretando justificativas repetitivas que não são necessárias no contexto do estudo.

As principais deficiências desta legislação para os ensaios de ligação, essencialmente utilizados nos testes para a comprovação da imunogenicidade de vacinas serão discutidas no estudo de caso a seguir:

Validação do teste de neutralização por redução de placa de lise para sarampo em placas de 96 poços (MICRO-PRNT)

Como descrito no item 1.5 (página 35) o teste de neutralização consiste basicamente em uma reação na qual é formado o complexo antígeno-anticorpo sendo necessário determinar a concentração para que ocorra a reação de neutralização.

Portanto, para validar o método é necessário determinar as concentrações LIQ, LSQ, CQA, CQB, CQM e CQD, preconizadas na RDC nº 27 da ANVISA. Porém, devido a falta de uma padronização nesta resolução, os resultados da validação foram expressos em três formas distintas mUI/mL, \log_2 mUI/mL e \log_{10} mUI/mL .

Segundo dados científicos, os bioensaios são normalmente expressos em escala logarítmica, onde os resultados são transformados em log e esta transformação é comumente utilizada para facilitar a interpretação dos dados. Esta operação pode ser utilizada em dados que não apresentam um comportamento linear, que ocorre geralmente neste tipo de metodologia, proporcionando a uniformização dos dados (USP, 2010).

Em muitos bioensaios, uma transformação adequada dos resultados gera dados que apresentam uma variação constante e perto da distribuição normal dos resíduos. Do ponto de vista estatístico qualquer transformação que corrija as variações intrínsecas da metodologia, permitindo a conformidade dos resultados é aceitável (USP, 2010).

Dados da literatura, como TIMIRYASOVA e cols. (2013) e COHEN e cols. (2007), expressaram os resultados do teste de neutralização por de placa de lise para avaliação da imunogenicidade para o vírus da dengue e para o vírus sarampo em escala

logarítmica. Percebe-se que há uma padronização neste aspecto devido o comportamento não linear dos dados gerados.

Assim, neste estudo de caso os resultados foram expressos em log mUI/mL para a obtenção de um resultado constante ao longo da curva de calibração para evitar a variabilidade que poderia acarretar uma interpretação errônea sobre a sensibilidade da metodologia.

Porém, é importante ressaltar que somente a USP (2010) apresenta esta informação. Os demais órgãos citam apenas o critério de aceitação expresso em CV% e não há nenhuma citação sobre as transformações dos resultados, acarretando uma dificuldade na finalização da validação, já que muitas vezes devido a variabilidade intrínseca da metodologia, não é possível respeitar o critério de aceitação.

O primeiro ensaio realizado foi a curva de calibração que conceitualmente tem por objetivo representar a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Porém nesta metodologia em questão não há utilização de instrumento e o que avaliamos é a capacidade do ensaio de detectar concentrações distintas de um analito e definirmos até que faixa o analito pode ser diluído.

A curva de calibração foi construída através de uma diluição seriada (fator 2 de diluição) do padrão positivo *in house* 60/12, este padrão possui uma concentração conhecida de 3981 mUI, obtendo as diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:512, 1:1024, 1: 2048 e 1:4096, onde cada diluição foi testada em sextuplicata.

A análise dos dados revelou que até a diluição 1:32 do soro padrão para sarampo, o vírus é totalmente neutralizado representando uma quantidade de anticorpos capazes de neutralizar as partículas virais. A partir da diluição 1:64, começaram a observar lise nas células, representando que a quantidade de anticorpos já eram insuficientes para neutralizar os 50% dos vírus presentes (Tabela 2, pagina 59).

A presença de células infectadas com o vírus sarampo é indicado pela formação de placas de lise devido a não formação do complexo antígeno-anticorpo, ou seja, não ocorre a neutralização para todos as partículas virais presentes no ensaio. Desta forma o vírus continua infeccioso, havendo ataque a cultura de células (SANTOS *et al*, 2008; SIMÕES, 2012).

As diluições empregadas nos ensaios de PRNT vão de 1/5 até 1/640 e foram representadas na faixa da curva onde as diluições do soro ainda apresentam variação no número de placas. A partir da diluição 1:1024 observamos que o ensaio de neutralização revela um platô, ou seja com o aumento da diluição não há mais anticorpo suficiente

para neutralizar as partículas virais presentes na placa, conforme demonstrado nas figuras 13, 14 e 15:

Amostra: soro de referência (padrão *in house* 60/12)

Curva: 1 **Data:**04/09/2013 **Analista 1**

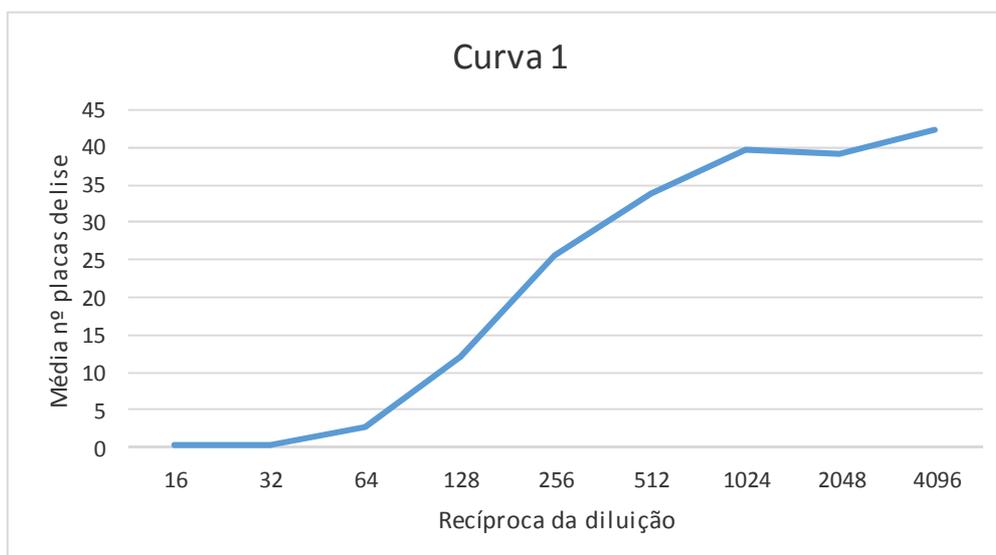


Figura 13: Gráfico da curva de calibração 1

Tabela 2: Resultados do parâmetro curva de calibração 1

Diluições 60/12 (1:x) Recíproca da diluição	Médias Placas de Lise
1	0
2	0
4	0
8	0
16	0,3
32	0,3
64	2,7
128	11,9
256	25,5
512	33,8
1024	39,6
2048	39,1
4096	42,3

Título = 1:182,5 ou 2732mUI/ml

Curva: 2 **Data: 05/09/2013** **Analista 1**

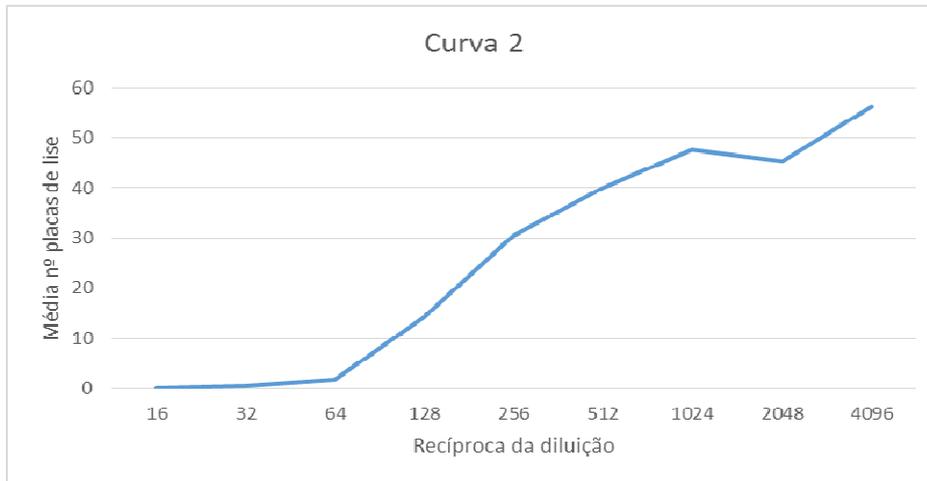


Figura 14: Gráfico da curva de calibração 2

Tabela 3: Resultados do parâmetro curva de calibração 2

Diluições 60/12 (1:x) Recíproca da diluição	Médias Placas de Lise
1	0
2	0
4	0
8	0
16	0
32	0,5
64	1,7
128	14,2
256	30,6
512	40
1024	47,5
2048	45,3
4096	56,3

Título = 1:173,3 ou 3218mUI/ml

Curva: 3 **Data: 10/09/2013** **Analista 1**

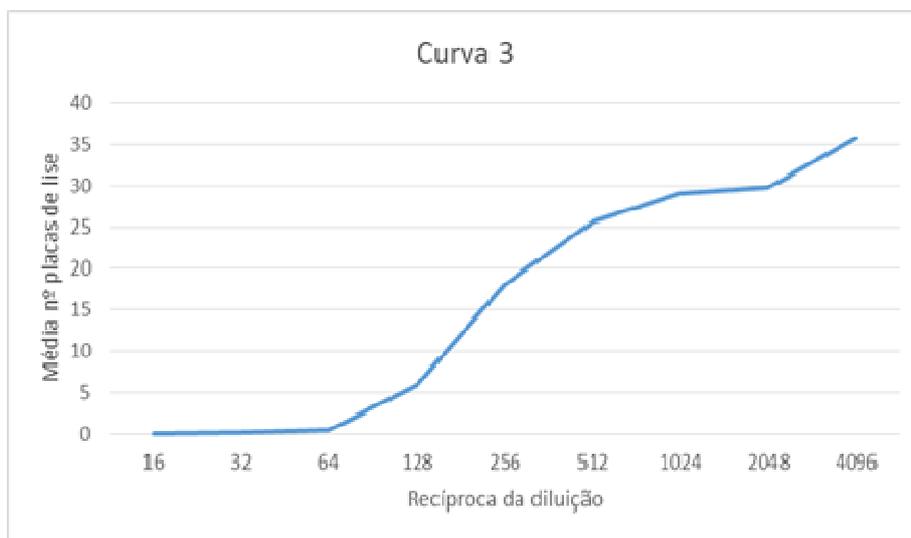


Figura 15: Gráfico da curva de calibração 3

Tabela 4: Resultados do parâmetro curva de calibração 3

Diluições 60/12 (1:x) Recíproca da diluição	Médias Placas de Lise
1	0
2	0
4	0
8	0
16	0
32	0,2
64	0,5
128	5,9
256	18,1
512	25,7
1024	29,1
2048	29,8
4096	35,8

Título = 1:238,2 ou 3237mUI/ml

O ponto de corte para o sarampo foi previamente definido através de um ensaio clínico feito em crianças imunizadas com a tríplice viral, onde 200 amostras foram analisadas antes e após a vacinação. Após a análise do gráfico de dispersão das amostras o ponto de corte foi definido em 1:25 (recíproca da diluição) ou 200 mUI/mL. O valor de corte representa a classificação de soropositividade ou soronegatividade de um soro, conforme representado na figura 14.

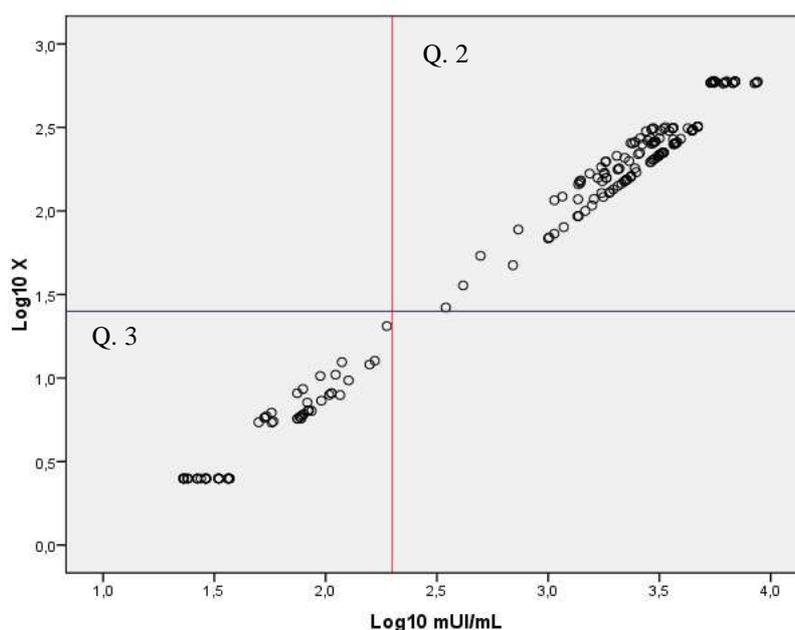


Figura 16: Gráfico de dispersão correspondente aos resultados (expressos em Log_{10} mUI/mL e Log_{10} da recíproca da diluição) obtidos dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT sarampo.

A análise da figura 14 revela que há uma separação bem definida de duas populações de soros. No segundo quadrante (Q.2) encontra-se o grupo que foi vacinado e no terceiro quadrante (Q.3) o grupo não vacinado ou não respondedor. Não observamos populações intermediárias, apenas os negativos e os que respondem apresentam títulos muito próximos. Desta forma, o ensaio da curva de calibração poderia ser realizado com um intervalo mais pertinente a metodologia, não sendo necessário testar todas as concentrações estipuladas na RDC 27. Com isso, a validação ficaria mais direcionada as concentrações que representam impacto na interpretação e conclusão do estudo.

Uma proposta seria uma curva de calibração contemplando principalmente amostras que represente o LIQ que no caso do PRNT seria a diluição de 1:5, ou seja a menor diluição do soro, CQM a diluição 1/30 (um soro que represente faixa acima do valor de corte) e CQA (um soro que represente uma diluição entre 1/30 e e 1/640).

Essas concentrações representam as características de imunogenicidade que a vacina contra sarampo apresenta, ou seja, a habilidade da vacina em induzir uma resposta imunológica, estimulando a produção de anticorpos específicos contra o vírus.

Considerando que o soro padrão é um soro sabidamente de concentração alta concluímos que a faixa hoje empregada nos testes é suficiente para detectarmos amostras que variam de baixa a alta concentração de anticorpos, revelando a alta sensibilidade do teste e a diluição aplicada na rotina das análises é adequada.

Segundo a RDC no 27 da ANVISA, o parâmetro da curva de calibração deve analisar os pontos da curva envolvidas na metodologia e demonstrar que os mesmos apresentam resultados precisos e exatos. Este parâmetro é avaliado através do seguinte critério de aceitação: $CV \leq 20\%$ em relação à concentração nominal para os padrões de LIQ; e desvio $\leq 15\%$ para as demais concentrações.

O título do PRNT é definido como a recíproca da última diluição do soro que reduz o número de placas de lise em 50%. A curva de calibração é uma medida que avalia a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, e por isso não reflete a realidade do teste de neutralização, pois este é realizado a partir da diluição seriada de um soro amostral, na própria microplaca de 96 poços, seguida da adição de uma quantidade fixa e pré-estabelecida de vírus e quantificada visualmente. Portanto, os resultados gerados da curva de calibração são incapazes de apresentar a real performance do ensaio, partindo desta premissa, os resultados foram utilizados para determinar a melhor faixa da recíproca da diluição do teste com isso estimar as 5 concentrações das amostras preconizadas pela RDC nº 27 (LIQ, LQB, CQM, CQA e CQD), as quais serão avaliadas nos ensaios subsequentes de precisão.

Os valores em recíproca da diluição para o teste de precisão foram os seguintes:

Quadro 5 – Amostras utilizadas no teste de precisão

Concentrações	Classificação da amostra (soro)	Diluição
LIQ	55/12	1:5
CQB	55/12	1:15
CQM	54/12	1:100
CQA	56/12	1:300
CQD	02/12	1:640

As respectivas concentrações foram utilizadas para os ensaios de precisão. Estes soros foram previamente titulados por PRNT e os resultados avaliados em estudos anteriores. A escolha de cada soro se deu de forma a obedecer a faixa determinada na RDC 27 para os ensaios de precisão.

O valor da precisão de uma metodologia demonstra que as variações provenientes de analistas, equipamentos, ou seja, se todas as condições de análises não interferem no resultado final. Segundo a RDC no 27 da ANVISA, o parâmetro é analisado através do seguinte critério de aceitação: $CV \leq 20\%$ em relação à concentração nominal para os padrões de LIQ; e desvio $\leq 15\%$ para as demais concentrações.

Na tabela 3 representada abaixo, é possível verificar, que todas as concentrações analisadas encontraram-se dentro do critério de aceitação quando o resultado é transformado em log: LIQ não houve variação, CQB apresentou um $CV = 5,20\%$, CQM apresentou um $CV\%$ de $4,93\%$, CQA apresentou um $CV\%$ de $4,03\%$ e o CQD apresentou um CV de $0,90\%$. Com os resultados, a validação garante que o teste em estudo apresenta precisão intracorrída entre seus resultados.

Precisão intracorrida:

Analista 1

Tabela 5 : Resultados do parâmetro precisão intracorrida

PLACA 1 - Data:24/09/2013															
Concentração (mUI/mL)	LIQ	log₂(LIQ)	log(LIQ)	CQB	log₂(CQB)	log(CQB)	CQM	log₂(CQM)	log(CQM)	CQA	log₂(CQA)	log(CQA)	CQD	log₂(CQD)	log(CQD)
1	81	6,34	1,91	276,0	8,11	2,44	2.033	10,99	3,31	7.379	12,85	3,87	10.368	13,34	4,02
2	81	6,34	1,91	448,0	8,81	2,65	1.078	10,07	3,03	5.153	12,33	3,71	10.306	13,33	4,01
3	81	6,34	1,91	307,0	8,26	2,49	1.592	10,64	3,20	3.319	11,70	3,52	10.368	13,34	4,02
4	81	6,34	1,91	382,0	8,58	2,58	1.570	10,62	3,20	3.879	11,92	3,59	10.368	13,34	4,02
5	81	6,34	1,91	323,0	8,34	2,51	3.101	11,60	3,49	6.581	12,68	3,82	8.794	13,10	3,94
6	81	6,34	1,91	642,0	9,33	2,81	2.424	11,24	3,38	3.441	11,75	3,54	8.860	13,11	3,95
Desvio padrão	0	0,00	0,00	135,0	0,45	0,13	719,4	0,54	0,16	1713,8	0,49	0,15	788,4	0,12	0,04
Coef. Variação (%)	0	-	-	34,1	5,20	5,20	36,59	4,93	4,93	34,56	4,03	4,03	8,01	0,90	0,90
Média	81	6,34	1,91	396,0	8,57	2,58	1966	10,86	3,27	4959	12,21	3,67	9844	13,26	3,99

No caso da precisão intercorrida, a RDC nº 27 da ANVISA preconiza que o teste seja realizado por mais de uma analista em dias distintos. Esta análise foi realizada através do seguinte critério de aceitação: $CV \leq 20\%$ em relação à concentração nominal para os padrões de LIQ; e desvio $\leq 15\%$ para as demais concentrações.

Nas tabelas 4 e 5, estão apresentados os resultados, é possível verificar que todas as concentrações analisadas encontram-se dentro do critério de aceitação quando transformadas em log. Houve a demonstração que existe pouca influência do analista na metodologia, pois os resultados de ambas apresentaram um CV% bem abaixo do especificado.

Foi observado que existe pouca influência do analista na execução da metodologia, pois os resultados encontrados obtidos pelos dois operadores apresentaram um CV% inferior ao critério de aceitação.

Tabela 6: Resultados do parâmetro precisão intercorrida – analista 1

Amostras		LIQ			CQB			CQM			CQA			CQD		
		mUI/mL	Log ₂	Log ₁₀												
Ensaio 1 24/09/2013	Média	81	6,34	1,91	396	8,57	2,58	1966	10,86	3,27	4959	12,21	3,67	9844	13,26	3,99
	CV %	-	-	-	34,05	5,20	5,20	36,59	4,93	4,93	34,56	4,03	4,03	8,01	0,90	0,90
Ensaio 2 26/09/2013	Média	114	6,83	2,06	432	8,73	2,63	2120	11,03	3,32	4073	11,94	3,60	11924	13,50	4,06
	CV %	-	-	-	23,54	3,46	3,46	17,76	2,39	2,39	29,17	3,41	3,41	24,50	2,85	2,85
Ensaio 3 30/09/2013	Média	78	6,29	1,89	281	8,09	2,43	1260	10,21	3,07	2323	11,12	3,35	7940	12,92	3,89
	CV %	-	-	-	27,50	4,99	4,99	43,07	5,01	5,01	35,16	3,87	3,87	22,71	2,92	2,92
Resultados Finais	Média Final	91	6,48	1,95	369,67	8,46	2,55	1782	10,70	3,22	3785	11,76	3,54	9902	13,22	3,98
	Média CV %	-	-	-	28,36	4,55	4,55	32,47	4,11	4,11	32,96	3,77	3,77	18,41	2,22	2,22

Tabela 7: Resultados do parâmetro precisão intercorrida – analista 2

Amostras		LIQ			CQB			CQM			CQA			CQD		
		mUI/mL	Log ₂	Log ₁₀												
Ensaio 1 24/09/2013	Média	81	6,34	1,91	286	8,15	2,45	1679	10,69	3,22	2767	11,39	3,43	10359	13,34	4,02
	CV %	-	-	-	10,72	1,95	1,95	20,80	2,95	2,95	28,96	3,24	3,24	0,14	-	0,02
Ensaio 2 26/09/2013	Média	114	6,83	2,06	386	8,55	2,57	1863	10,81	3,25	3088	11,50	3,46	11738	13,50	4,06
	CV %	-	-	-	26,4	4,34	4,34	33,06	3,93	3,93	39,34	4,75	4,75	19,33	2,00	2,00
Ensaio 3 30/09/2013	Média	82	6,35	1,91	275	8,07	2,43	1470	10,44	3,14	1884	10,80	3,25	9683	13,24	3,99
	CV %	13,08	2,67	2,67	24,4	3,91	3,91	39,3	4,94	4,94	36,05	4,73	4,73	6,19	0,71	0,71
Resultados Finais	Média Final	92,33	6,50	1,96	316	8,26	2,48	1670	10,65	3,20	2580	11,23	3,38	1059	13,36	4,02
	Média CV%	4,36	0,89	0,89	20,51	3,4	3,4	31,05	3,94	3,94	34,78	4,24	4,24	8,55	0,90	0,90

Para análise da exatidão a RDC nº 27 da ANVISA solicita que seja realizada o cálculo de CV% para cada concentração estipulada na curva de calibração. Porém para este de caso, não foi possível já que o cálculo é realizado através da correção da diluição de cada concentração e comparada com o valor nominal do padrão *in house*. Para a realização, foi utilizada a RE 899 da ANVISA (2003) por reportar um cálculo de exatidão adequado para este metodologia.

Diante dos resultados apresentados nas tabelas 6, 7 e 8, a exatidão média foi de 102,3%, caracterizando o que o bioensaio quantifica os anticorpos neutralizantes para o vírus sarampo de maneira satisfatória. Neste caso, a variação permitida para o parâmetro de exatidão é de $\pm 15\%$, ou seja, 85 a 115%.

Tabela 8 – Resultados do parâmetro exatidão - ensaio 1

Amostra 60/12	Valor encontrado (mUI/mL)	Log ₂	Log	Valor esperado (mUI/mL)	Log ₂	Log	Exatidão	Exatidão em %
1	308	8,27	2,49	218,78	7,77	2,34	1,06	106
2	187,2	7,55	2,27	218,78	7,77	2,34	0,97	97
3	316,3	8,31	2,50	218,78	7,77	2,34	1,06	106
Média	266,7	8,04	2,42	218,78	7,77	2,34	1,03	103

Tabela 9: Resultados do parâmetro exatidão - ensaio 2

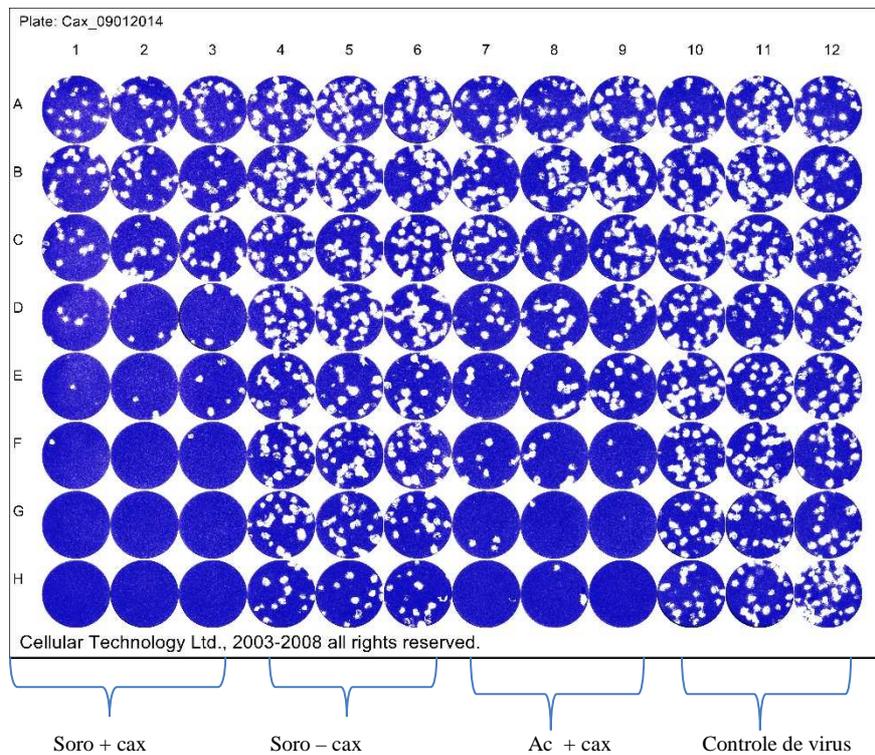
Amostra 60/12	Valor encontrado (mUI/mL)	Log ₂	Log	Valor esperado (mUI/mL)	Log ₂	Log	Exatidão	Exatidão em %
1	224	7,81	2,35	218,78	7,77	2,34	1,00	100
2	232	7,86	2,37	218,78	7,77	2,34	1,01	101
3	173,3	7,44	2,24	218,78	7,77	2,34	0,96	96
Média	214,4	7,70	2,32	218,78	7,77	2,34	0,99	99

Tabela 10: Resultados do parâmetro exatidão - ensaio 3

Amostra 60/12	Valor encontrado (mUI/mL)	Log ₂	Log	Valor esperado (mUI/mL)	Log ₂	Log	Exatidão	Exatidão em %
1	250,7	7,97	2,40	218,78	7,77	2,34	1,02	102
2	294,4	8,20	2,47	218,78	7,77	2,34	1,06	106
3	312	8,29	2,49	218,78	7,77	2,34	1,06	106
Média	292,5	8,15	2,45	218,78	7,77	2,34	1,05	105

Seletividade:

O ensaio de seletividade é de extrema importância principalmente no caso do PRNT para sarampo, uma vez que a imunização se dá através da vacina tríplice viral que é composta por três vírus (sarampo, caxumba e rubéola), logo amostras de soro de pacientes imunizados vão apresentar anticorpos para os três vírus. Para garantir que os anticorpos para caxumba não iriam neutralizar o vírus de sarampo usados no teste, realizamos um ensaio onde anticorpo comercial para caxumba. A análise dos dados demonstrou que o PRNT para sarampo foi seletivo para o anticorpo de sarampo e que não houve reação cruzada com o anticorpo de caxumba. Desta forma, pode-se garantir que o teste quantifica inequivocamente o anticorpo de interesse, confirmando os resultados da imunogenicidade produzida pelo vírus sarampo, conforme figuras 16 e 17.



(comercial)

Figura 17 – Placa de MICRO-PRNT caxumba para teste de sensibilidade

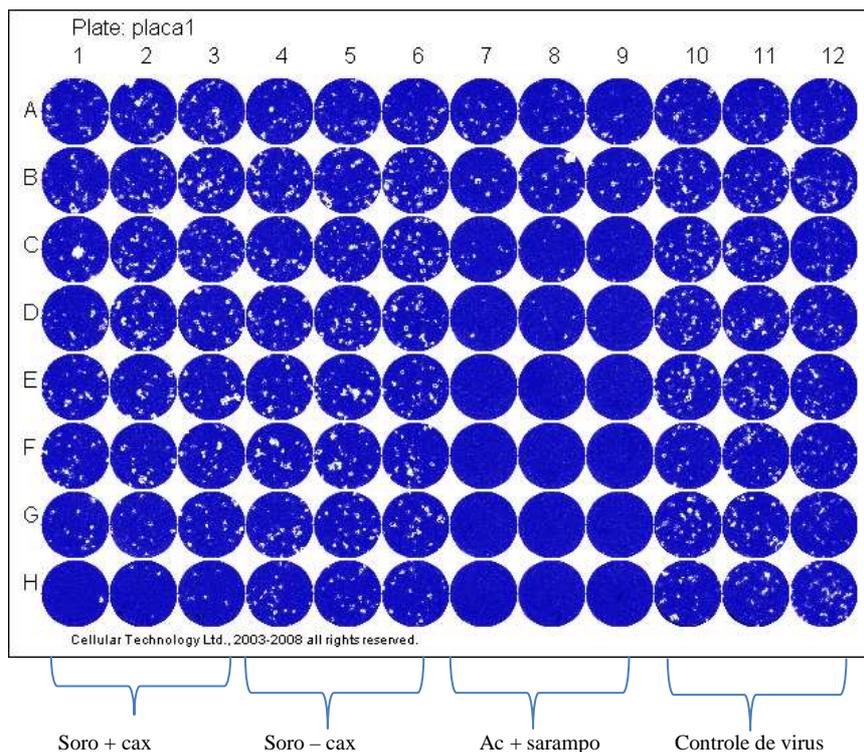


Figura 18 – Placa de MICRO-PRNT sarampo para teste de sensibilidade

Sensibilidade:

A sensibilidade do teste é representada pelo LIQ, que no caso do PRNT representa a menor diluição da amostra capaz de neutralizar o vírus desafio (TIMIRYASOVA e cols. 2013).

No estudo de caso, o LIQ foi determinado na diluição 1/5 que é a menor diluição de um soro com título de anticorpos neutralizantes baixo capaz de neutralizar o vírus, sendo a mesma adotada na rotina nas amostras da pesquisa clínica.

Outro ponto bastante relevante é que a sensibilidade do teste encontra-se abaixo do ponto de corte (1/25), demonstrando que as diluições realizadas no teste são adequadas para a realização do estudo clínico, garantindo a classificação de soropositividade ou negatividade de um determinado soro.

Após a avaliação dos resultados do estudo de caso, é possível visualizar que a validação foi desenhada de maneira específica para o ensaio de neutralização no intuito de demonstrar que o método atende ao uso pretendido, mas também para expor as deficiências das diretrizes de validação de bioensaios existentes, como a descrição dos parâmetros de validação, os critérios de aceitação, a falta de padronização dos

resultados, enfim a não consideração das particularidades dos ensaios biológicos, principalmente da RDC nº 27 da ANVISA que é mandatória no país.

O teste de neutralização por redução de placa de lise para sarampo em placas de 96 poços (*MICRO-PRNT*) é utilizado para a quantificação de anticorpos neutralizantes produzidos pelo indivíduo pós-vacinação, ou seja, a produção anticorpos é o alvo do estudo.

Porém, para a RDC nº 27 da ANVISA os bioensaios são métodos analíticos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas e analito é um composto químico específico a ser mensurado em uma matriz biológica. Desta forma, pode-se visualizar, que esta legislação não apresenta uma aplicabilidade específica a este tipo de estudo, já que anticorpos são glicoproteínas, onde alguns parâmetros e critérios de aceitação não são aplicáveis. Mas para que o método seja considerado validado, todos os parâmetros devem ser validados. Porém devido às características do teste de neutralização, os parâmetros efeito matriz e o efeito residual não são passíveis de realização, sendo necessário justificar a não realização desses ensaios nos relatórios de validação. Porém, a OMS, o FDA, a USP e o EMEA não citam esta obrigatoriedade e citam que os parâmetros devem ser analisados para a implementação dos mesmos.

Ainda em relação aos parâmetros de validação, o FDA e o EMEA apresentam em seus guias um capítulo sobre ensaios de ligação com um estudo mais direcionado, mas também de maneira muito ampla. Os ensaios de ligação são representados por diversos tipos de ensaio como, por exemplo, o EIE, IFI, HI e neutralização. Cada ensaio apresenta uma particularidade, uma sensibilidade, vantagens e desvantagens. Desta forma, são necessárias diretrizes mais segregadas e de aplicabilidade mais direta para que o desempenho da metodologia seja comprovado.

Outro assunto pouco discutido nos documentos, com exceção da USP (2010) é a transformação dos dados obtidos para escala logarítmica. Esse procedimento é de extrema relevância por proporcionar a uniformização dos dados, tornando a variação existente característica dos bioensaios, em valores com variância quase constante e quase normal. Porém, a RDC 27 da ANVISA, não cita em nenhum momento esta informação, dificultando muitas vezes o resultado da validação, pois sem esta transformação logarítmica, os resultados não ficam dentro do critério de aceitação.

Esta falta de uniformidade na representação dos resultados dificulta a correlação dos resultados entre laboratórios. Em 2012 foi realizado o primeiro estudo internacional

de avaliação externa da qualidade de métodos moleculares e sorológicos para Febre Amarela. O estudo foi conduzido através do envio de dois painéis de amostras a vários laboratórios do mundo, inclusive Bio-Manguinhos, para avaliação de níveis de anticorpos e quantidade de RNA viral do vírus de Febre Amarela (DOMINGO e cols, 2012).

O estudo revelou uma falta de padronização entre os laboratórios. Os testes são executados de maneiras distintas: com diluições diferentes, com etapas distintas dentro da mesma metodologia, forma variada de representar os dados, ou seja, todas essas variações dificultam uma comparação entre os resultados (DOMINGO e cols, 2012).

Apesar do estudo ter sido realizado com o vírus de febre amarela, o mesmo é aplicável também aos testes de soroneutralização para outros vírus, como o sarampo.

Esse estudo de caso e os dados da literatura revelam que os guias devem não só definir critérios de aceitação como também especificar a forma de representação de resultados, uma vez que esta representação pode definir se uma validação está ou não dentro dos critérios de aceitação da norma em vigência.

6 - CONCLUSÃO

A validação proposta neste estudo apresentou resultados satisfatórios onde todos os parâmetros estabelecidos foram validados.

Pode-se concluir com este estudo, que não há um documento (guia, compêndio ou legislação) específico para a validação de bioensaios direcionados aos testes de neutralização, utilizados na verificação de imunogenicidade proporcionada pós-vacinação.

No caso da RDC 27 da ANVISA, que é a legislação mandatória no Brasil, os parâmetros de validação apresentam características direcionadas aos bioensaios que utilizam ferramentas instrumentais, como os ensaios cromatográficos, havendo uma insuficiência de informações para a avaliação do desempenho da metodologia para os demais bioensaios.

A utilização das técnicas de PRNT e do micro-PRNT é de extrema relevância, pois são considerados de referência para resposta imune protetora após vacinação e seus resultados são fundamentais para a pesquisa clínica do produto. Desta forma, é necessário que a validação do bioensaio seja consistente e confiável.

Diante do acima exposto, a validação dos bioensaios realizada por Bio-Manguinhos não deve seguir apenas a RDC 27 da ANVISA, mas também utilizar como referências os outros guias citados neste estudo, para promover um estudo de validação mais direcionado e coerente que garantam a confirmação da aplicabilidade da metodologia.

Outra abordagem, seria sensibilizar a ANVISA para a necessidade de criar guias e ou legislações mais aplicáveis a realidade de bioensaios relacionados a imunobiológicos, que não envolvam instrumentos, considerando a características inerentes destes ensaios.

7- PERSPECTIVAS

O estudo em questão propõe a elaboração de um guia ou legislação que apresente uma diretriz de validação específico para bioensaios utilizados em pesquisa clínica que quantificam a produção de anticorpos pós-vacinação para a determinação de imunogenicidade e também demais bioensaios provenientes de analitos biológicos em amostras biológicas:

- Desenhos experimentais de validação adequados aos diversos tipos de bioensaios
- Critérios de aceitação que levem em consideração a variabilidade dos bioensaios;
- Padronização dos resultados, como a transformação em escala logarítmica.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK., LICHTMAN H., PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ed. Rio de Janeiro. Editora Elsevier, 2008.

AGUSTI, L.A.; DESCHAMPS, F. Sistema de Gestão da Qualidade nas micro e pequenas empresas. Visão, Caçador, v.2, n.1, p.86-99, 2013.

ARBIT, H.M.; PALLER, M.S.; **A program to provide regulatory support for investigator-initiated clinical research**. Acad Med., v. 81, n. 2, p. 146-153, 2006.

AUGUSTI, A.L.; DESCHAMPS, F. **Sistema de Gestão da Qualidade nas micro e pequenas empresas**. Visão, Caçador, v.2, n.1, p. 86-99, 2013.

AZEVEDO, N. **Inovação em Saúde: Dilemas e desafios de uma instituição pública**. 20.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2007. p. 53-82.

BARBOSA, A.P.R.; BOMTEMPO, J.V.; BAETAS, R.B.G. **Diferenças intrafirma das competências organizacionais: um estudo de caso**. Journal of Technol. Management & Innov., Santiago, v. 4, n.2, 2009.

BASTOS, J.L.D.; DUQUIA, R.P. **Medidas de dispersão: os valores estão próximos entre si ou variam muito?** Scientia Medica, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 40-44, 2007.

BENEDETTI, R.C.E. **Contribuição dos Sistemas da Qualidade: proposta de modelo de gestão da qualidade para Bio-Manguinhos/Fiocruz. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)**. 2008. 131 f. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. Manual. Sistema de Gestão da Qualidade de Bio-Manguinhos.: Documento Interno: 0008, rev.07, 2013.

BIO-MANGUINHOS /FIOCRUZ. Bio-Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológico. 2014. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/quem-somos>. Acesso em: 10 jan. 2014.

BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. Bio-Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológico. 2014. Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=59&Itemid=72. Acesso em: 02/01/2014.

BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. Bio-Manguinhos – Vacina Tríplice Viral. 2014. Disponível em

<http://www.bio.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=59&Itemid=72>. Acesso em: 02 jan. 2014.

BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. Bio-Manguinhos – Centro Tecnológico de Vacinas. 2014. Disponível em: < <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/quem-somos>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. Inovação. 2014. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/inovacao/estrategias>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. Mapa de Exportação de Vacina de Febre Amarela. 2014. Disponível em: < http://www.bio.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=60&Itemid=355>. Acesso em: 06 mar. 2014

BORGES, M.B.J. **Caracterização genômica e biológica do vírus do sarampo cepa vacinal CAM-70**. 2007. 150f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular , Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Eswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

BRASIL. Resolução – RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Resolução RDC nº 39, de 05 de junho de 2008. Dispõe sobre o regulamento para a realização de pesquisa clínica e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 jun. 2008.

BRASIL. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 19 abr. 2010.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 22 mai. 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 17 dez. 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº50, de 20 de setembro de 2011 – Transferência de Tecnologia. Dispõe sobre registro de produtos em processo de desenvolvimento ou de transferência de tecnologias objetos de parcerias de desenvolvimento produtivo público-público ou público privado de interesse do Sistema único de Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 22 set. 2011.

BRASÍLIA. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2009. 32p. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/ZOO/lepto_gve7ed_atual.pdf>. Acesso em 10 out. 2013.

BRASÍLIA. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Estratégia Nacional de Vacinação contra o vírus Influenza Pandêmico (H1N1)**. Brasília. 2010. 31 p. Disponível em : <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estrategia_nacional_vacinacao_influenza.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASÍLIA. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília, 2010. 442 p. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf>. Acesso em 22 out. 2013.

BRUM, R. C. S. **Padronização e validação da técnica do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) semi-quantitativa e quantitativa para o biofármaco Alfainterferona 2B humana recombinante**. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

CAMPOS, A. L. V. de; NASCIMENTO, D. R. de; MARANHÃO, E. **A história da poliomielite no Brasil e seu controle por imunização**. História, Ciências, Saúde:Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 573-600, 2003.

CASSINO, N.M. e cols. **Validação em Métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas**. Quim. Nova, São Carlos, v. 32, n.4, p. 1021-1030, 2009.

COHEN, J. e cols. **Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: Description of a standardised laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination**. Vaccine, v. 26, n. 1, p. 59-66, 2007.

CORDEIRO, J.V.M. *Reflections on Total Quality Management: end of another fad or incorporation of the concept through new management tools?* Rev. FAE, Curitiba, v.7, n.1, p.19-33, 2004.

DOAN, T., MELVOD, R.; WANTELNBAUGH, C. **Imunologia Médica Essencial**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006, p.1-52.

DOMINGO, C. e cols. **First International External Quality Assessment Study on Molecular and Serological Methods for Yellow Fever Diagnosis**. PloS One, Califórnia, v.7, n. 5, 2012.

DOMINGUES, C.M.A.S.; TEIXEIRA, A.M.S. **Coberturas vacinais e doenças imunopreveníveis no Brasil no período 1982-2012: avanços e desafios do Programa Nacional de Imunizações**. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, v. 22, n. 1, p. 9-27, 2013.

EMEA. European Medicines Agency. ICH Topic Q2 (R1). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. 1995. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf. Acesso em 10/01/2014.

EMEA. European Medicines Agency. ICH Topic E6 (R1). **Guideline for Good Clinical Practice**. 2002. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002874.pdf. Acesso em 10 jan. 2014.

EMEA. European Medicines Agency. **Guideline on bioanalytical method validation**. 2011. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf> Acesso em: 03 mar. 2014.

FALCONI, V.C. **TQC Controle da Qualidade Total**. 8ª ed. Belo Horizonte: Editora Escola de Engenharia da UFMG. 1992.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm/>. Acesso em: 05 mar. 2013.

FERNANDES, T.: **Vacina antivariólica: seu primeiro século no Brasil (da vacina jenneriana à animal)**. História, Ciências, Saúde — Manguinhos, v.6, n.1, p. 29-59, 1999.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. 2014. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/oswaldo-cruz>. Acesso em: 02 jan. 2014.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. 2014. Disponível em: <<http://www.coc.fiocruz.br/patrimonio/>>. Acesso em 10/01/2014

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION/ FDA. **Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation**. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2013.

FRIEDMAN, LM; FURBERG, CD; DEMETS, DL. **Fundamentals of clinical trials**. BioMed Central, v. 3, n. 28, 1998.

FUCHES, R.M.M. **Validação de bioensaios para o estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva**. 2010. 83f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto Butantã, São Paulo, 2010.

FUJINO,M., YOSHIDA,N., KIMURA,K.,ZHOU,J., MONTEGI,Y., KOMASE,K., NAKAYAMA,T. **Development of a new neutralization test for measles vírus**. Journal of Virological, Tokyo, v. 142, p.15-20, 2007.

GURGEL, C.B.F.M.; ROSA, C.A.P. **História da medicina: a varíola no Brasil Colonial (séculos XVI e XVII)**. Revista de Patologia Tropical, Campinas, v.41, n. 4, p. 387-399, 2012.

HOMMA, A. e cols. **Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica**. Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 445- 458, 2011.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008. 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 7 set. 2013.

LIMA, C.G.R.D e cols. **Padronização de teste de potência *in vitro* para vacinas que contenham toxoide alfa de *Clostridium novyi* tipo B**. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.78, n.4, p.507-512, 2011.

LOPES, M.B; POLITO, R. **Para uma história da vacina no Brasil: um manuscrito inédito de Norberto e Macedo**. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*, Rio de Janeiro, v.14, n.2, p.595-605, 2007.

MARQUES, C.H. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica**. 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

MARTINS, L. **Níveis de anticorpos contra sarampo entre mulheres em idade fértil na população da Guiné-Bissau expostas a sarampo natural e a imunização contra sarampo**. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA. **Memória da Administração Pública Brasileira**. 2014. Disponível em: <http://linux.an.gov.br/mapa/?p=2746>. Acesso em 18 jan. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 2009. Disponível em : <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/ZOO/lepto_gve7ed_atual.pdf>. Acesso em 10 out. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Estratégia Nacional de Vacinação Contra o Vírus Influenza Pandêmico (H1N1)**. 2010. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estrategia_nacional_vacinacao_influenza.pdf> . Acesso em: 23 nov. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 2010. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guiabolso.pdf>. Acesso em: 22 out. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Imunização. 2013. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_imunizacoes_pni40.pdf> . Acesso em: 28 fev. 2014.

MOURA, W. C. **Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva**. 2009. 119 p. Tese(Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

NIEDRIG, M. e cols. **Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA.** Trop Med Int Health, v. 4, n.12,p.867-871, 1999.

NIEDRIG M, KÜRSTEINER O, HERZOG C & SONNENBERG K. **Evaluation of na indirect immunofluorescence assay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against yellow fever virus.** Clin Vaccine Immunol. v.15, n.2, p.177-181, 2008.

OHAYON, P. & VIEIRA,V.M.M. **Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D.** Rev. Economia & Gestão da PUC Minas, Belo Horizonte, v.6, n.13, 2006.

OLIVEIRA, G.G.D. **Ensaio Clínicos: princípios e prática.** Brasília: Editora Sobravime, 2006.

OPAS – Organização Pan-americana da Saúde. **Boas Práticas Clínicas:** Documento das Américas, 2005, 102 p.

PERES, T.B. **Noções Básicas de Cromatografia.** Biológico, São Paulo, v.64, n.2, p.227-229, 2002.

PICININ, C.T.; KOVALESKI, J.L.; PEDROSO, B. **Abordagens sobre gestão da transferência de tecnologia.** Rev.de Engenharia e Tecnologia, Ponta Grossa, v. 3, n. 1, p. 81-89, 2011.

PINTO, E.F; MATTA, N.E; CRUZ, A.M. **Vacinas: Progressos e novos desafios para o controle de doenças imunopreveníveis.** Acta Biológica Colombiana, n.3, v.16, 2011.

PLOTKIN, A.P. **Vaccines: past, present and future.** Nature Publishing Group, Nature Medicines Supplement, n. 4, v.11, p. 5-11, 2005.

PLOTKIN, S.A. & MORTIMER, E.A. (Eds). **Vaccines.** Philadelphia WB Saunders, 1994.

ROERING, J.T; HOMBAC, J; BARRET, A.D. **Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses.** Viral Immunol 2008; 21(2):123-32.

RIBANI, M. e cols. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quim. Nova, Campinas, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SANTOS, V.O; SIMÕES, M. **Determinação e comparação dos pontos de corte de duas metodologias para o teste sorológico de neutralização por redução de placas de lise (MICRO PRNT) na detecção de anticorpos para o vírus do sarampo.** 2012. 11 f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2012.

SANTOS, N.S.O; ROMANOS, M.T.V; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008. p. 83-116.

SILVA, I.B e cols. **Ensaio de potência da alfaepoetina: Comparação de camundongos Swiss Webster, NIH, C57BL/6, BALB/c com o híbrido B6D2F1**. Vigilância Sanitária em Debate, v. 1, n.3, p. 49-58, 2013.

SILVA, M.M. **Contribuições para a Melhoria do Sistema de Vigilância Pós-Comercialização de Vacinas em Bio-Manguinhos: Eventos Adversos Pós-Vacinação**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos), Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

SIMÕES, M. e cols. **Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-Prnt) in detection of yellow fever virus antibodies**. Biologicals, p. 1-6, 2012.

SIMÕES, M. **Avaliação da acurácia e confiabilidade do teste sorológico de neutralização por redução de placas de lise (*micro* PRNT) na detecção de anticorpos para o vírus da Febre Amarela**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

SILVERSTEIN, A.M. **A history of immunology**. Oxford: Elsevier, 2009.

TAKAHASHI, V.P.; SACOMANO, J. B. **Proposta de um modelo conceitual para análise do sucesso de projetos de transferência de tecnologia: estudo em empresas farmacêuticas**. Gestão e Produção, Ribeirão Preto, v.9, n.2, p.181-200, 2002.

TAKAHASHI, V. P. **Transferência de Conhecimento Tecnológico: Estudo de Múltiplos Casos na Indústria Farmacêutica**. Gestão e Produção, Ribeirão Preto, vol.12, n. 2, P. 255-269, 2005.

THE AMERICAN ACADEMY of PEDIATRICS. **Guidelines for Health Supervision of Infants, Children, and Adolescents**. 2008. Disponível em: <https://brightfutures.aap.org/pdfs/BF3%20pocket%20guide_final.pdf>. Acesso em: 12 set. 2013.

TIMIRYASOVA, T.M. e cols. **Optimization and Validation of a Plaque Reduction Neutralization Test for the Detection of Neutralizing Antibodies to Four Serotypes of Dengue Virus Used in Support of Dengue Vaccine Development**. Am. J. Trop. Med. Hyg, Pennsylvania, v. 88, n. 5, p. 962-970, 2013.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 10. ed .Rio de Janeiro: LTC, 2011. p. 60-96 .

TOLEDO, G.L.; OVALLE, I.I. **Medidas de dispersão**. In: TOLEDO, G.L.; OVALLE, I.I, editors. **Estatística Básica**. 2. ed. Ed. Atlas S.A,1995. p.181-226.

URDANETA, I. P. **O Trabalho Informacional na perspectiva do aprendizado tecnológico para o desenvolvimento.** Ciência da Informação, Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (Ibict), Brasília, v.21 , n.2, p. 155- 168, 1992.

UNITED STATES PHARMACOPEIA/ USP. **Design and Development of Biological Assays.** 2010. Disponível em:< http://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1032.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA/ USP. **Biological Assay Validation.** 2010. Disponível em: <http://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1033.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA/ USP. **Analysis of Biological Assays.** 2010. Disponível em: http://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1034.pdf. Acesso em> 22 dez. 2013.

VIEIRA, V. M.M.; OHAYON, P. **Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D.** Revista Economia & Gestão da PUC, v. 6, n.13, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ WHO. **Good Manufacturing requirements – Part 2: Validation.** 1997. Disponível em: <[https://www.google.com.br/#q=a+who+guide+to+good+manufacturing+practice+\(gmp\)+requirements+part+2+validation](https://www.google.com.br/#q=a+who+guide+to+good+manufacturing+practice+(gmp)+requirements+part+2+validation)>. Acesso em 23 dez. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ WHO. **Guidelines on transfer of technology in pharmaceutical manufacturing.** 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS961/TRS961_Annex7.pdf>. Acesso em 03 jan. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ WHO. 2013. **WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system.** 2013 global summary. Disponível em: <http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/countries?countrycriteria%5Bcountry%5D%5B%5D=BRA>. Acesso em: 18 dez. 2013.

9 - ANEXOS

9.1 - ANEXO I

Detalhamento do parâmetro de precisão segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA ^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Precisão	<p>Precisão intra-ensaio: Amostra homogênea em vários pontos da curva em um único ensaiocom três diluições de cada concentração: baixa, média e alta. Realizar 10 replicatas de cada concentração. Calcular a média, o desvio padrão e o CV em cada ponto da curva.</p> <p>Precisão inter ensaio: Realizar o mesmo ensaio 3 vezes, variando dias, analistas e lotes. Calcular a média e o desvio padrão em cada ponto da curva de cada teste individualmente. Calcular o CV para cada ponto da curva entre cada ensaio executado.</p> <p>Critério de Aceitação: Ensaio de ligação: 5 a 10% Ensaio em células: cerca de 50% Ensaio <i>in vivo</i>: cerca de 50%.</p>	<p>Desenvolvimento de bioensaios com característica físico-química: Precisão intra-ensaio: Amostra em 3 concentrações, e realizar no mínimo 5 cinco replicatas de cada concentração em um único ensaio.</p> <p>Precisão inter ensaio: Realizar o mesmo ensaio 3 vezes, variando analistas, equipamentos, reagentes e laboratórios.</p> <p>Critério de aceitação: Não são admitidos valores > 15%, exceto o LIQ, ≤ 20%.</p> <p>Desenvolvimento de bioensaios: ensaios microbiológicos e ensaios de ligação: Não aplicado</p>	<p>Precisão: Várias diluições da amostra padrão e a da amostra teste em um único ensaio (mesmo dia, mesmo analista, mesmo laboratório e mesmos equipamentos).</p> <p>Precisão intermediária: Realizar mesmo ensaio (em dias diferentes, analistas diferentes e equipamentos diferentes).</p> <p>Critério de aceitação: Teste de potência: In vivo: CV < 50% Em célula: CV < 20%</p>	<p>Bioensaios em geral: Precisão intra-ensaio: Amostras (LIQ, baixa, média, alta e CQ), 5 replicatas em uma única corrida.</p> <p>Precisão inter ensaio: Realizar o mesmo ensaio em pelo menos 2 dias diferentes.</p> <p>Critério de Aceitação: Não são admitidos valores > 15%, exceto o LIQ, ≤ 20%.</p> <p>Ensaio de Ligação: Precisão intra-ensaio: Preparar no mínimo 5 amostras de CQ, 3 amostras de LIQ, médio, alto e LSQ e cada concentração em duplicata. Fazer 6 leituras de cada amostra. Realizar o ensaio em uma única corrida.</p> <p>Precisão inter-ensaio: Realizar o mesmo ensaio, em corridas e dias diferentes.</p> <p>Critério de Aceitação: Não são admitidos valores > 20%, exceto o LIQ, ≤ 25%. Erro total: 40% para o LIQ e LSQ e 30% para as demais concentrações.</p>	<p>Precisão intracorrida: Amostra (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), 5 replicatas de cada concentração em um único ensaio;</p> <p>Precisão Intercorridas: Realizar o mesmo ensaio com corridas em dias distintos;</p> <p>Critério de Aceitação: Não são admitidos valores > 15%, exceto o LIQ, ≥ 20%.</p>

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012.

9.2 - ANEXO II

Detalhamento do parâmetro de exatidão segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Exatidão	<p>Bioensaios - pode não ser possível pela indisponibilidade de padrões. Porém se o ensaio possuir sensibilidade e especificidade, é considerado satisfatório.</p> <p>Para imunoensaios: Preparar no mínimo 3 concentrações através de spikes de duas amostras distintas. Testar as 6 amostras em triplicata.</p> <p>Critério de Aceitação: Ensaio de ligação: 5 a 10% Ensaio em células: cerca de 50% Ensaio in vivo: cerca de 50%.</p>	<p>Desenvolvimento de bioensaios com característica físico-química: Amostra em 3 concentrações, 5 replicatas de cada concentração em um único ensaio;</p> <p>Critério de aceitação: Não são admitidos valores > 15%, exceto o LIQ, ≤ 20%.</p> <p>Desenvolvimento de bioensaios: ensaios microbiológicos e ensaios de ligação: Não aplicado</p>	<p>Utilizar concentrações diferentes da amostra padrão e da amostra teste, dentro da faixa de concentração do bioensaio, onde os valores são comparados através do deslocamento horizontal (reta) através do paralelismo.</p> <p>Recuperação: Adicionar um analito a uma amostra biológica, extrair e mensurar através da resposta do detector, comparando com a concentração real do padrão. Preparar amostras extraídas de concentração baixa, média e alta. Comparar com padrão não extraído em 100% de concentração.</p> <p>Critério de aceitação: A recuperação não necessita ser de 100%, mas deve ser precisa e reprodutível.</p>	<p>Bioensaios em geral Exatidão intra-ensaio: Realizar uma única corrida, com no mínimo de 5 replicatas, de pelo menos quatro níveis de concentração: dentro da faixa de curva de calibração : LIQ, CQA, CQM e CQB.</p> <p>Exatidão Intercorrida: Realizar o mesmo ensaio, porém em 3 corridas, em pelo menos dois dias diferentes.</p> <p>Critério de Aceitação: Não são admitidos valores > 15%, exceto o LIQ, ≤ 20%.</p>	<p>Exatidão intracorrida: Preparar amostras: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, 5 replicatas em um único ensaio.</p> <p>Exatidão Intercorrida: Realizar o mesmo ensaio com corridas em dias distintos.</p> <p>Critério de Aceitação: Não são admitidos valores > 15%, exceto o LIQ, ≤ 20%.</p>

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012

9.3- ANEXO III

Detalhamento do parâmetro de linearidade/curva de calibração segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Linearidade/ curva de calibração	<p>Curva contendo de seis a oito concentrações dentro da faixa de trabalho. Testar cada diluição em triplicata em três curvas distintas; Calcular o R² ou R.</p> <p>Método Alternativo: Calcular a exatidão e precisão de cada concentração. Se ambos estiverem dentro do critério de aceitação, o ensaio é considerado satisfatório.</p> <p>Critério de Aceitação: Ensaio de ligação: 5 a 10% Ensaio em células: cerca de 50% Ensaio in vivo: cerca de 50% R = 0,99</p>	<p>Desenvolvimento de bioensaios com característica físico-química: Realizar spikes para preparar as concentrações desejadas. A curva deve apresentar amostra branco, uma amostra matriz, e de 6 a 8 amostras diferentes de zero, incluindo o LIQ.</p> <p>Critério de Aceitação: O LIQ deve ser pelo menos cinco vezes a resposta da amostra branco. A resposta do pico deve ser identificável e reprodutível com uma precisão de 20 % e acurácia de 80-120 %. Se não for utilizado um modelo linear para a curva de calibração e padrão de calibração deverá ser justificado. CV ≤ 20 % de desvio para o LIQ; CV ≤ 15 % demais concentrações; Pelo menos 4 dos 6 padrões diferentes de zero deve atender aos critérios acima referidos, incluindo o LIQ e o padrão de calibração na concentração mais elevada.</p>	<p>Curva contendo 6 concentrações em duplicata. A curva geralmente não é linear, podendo ser usado o modelo de quatro parâmetros ou paralelismo;</p> <p>Critério de aceitação: Calcular a precisão e exatidão de cada concentração se ambos estiverem dentro do critério de aceitação, o ensaio é considerado satisfatório.</p>	<p>Avaliar no mínimo 3 curvas de calibração com: amostra branco, amostra zero e 6 amostras de diferentes concentrações adicionados de PI;</p> <p>Critérios de aceitação: Para o padrão de calibração: desvio ≤ 20% em relação à concentração nominal para os padrões de LIQ; e ≤ 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração. Para a curva de calibração: no mínimo 75% dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores e no mínimo seis padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores.</p> <p>Ensaio de Ligação: Preparar 6 padrões de concentrações diferentes, que devem ser uniformemente espaçados numa escala logarítmica. Preparar cada concentração em duplicata. Realizar no mínimo 6 corridas independentes.</p>	<p>Avaliar no mínimo 3 curvas de calibração com: amostra branco, amostra zero e 6 amostras de diferentes concentrações adicionados de PI. Deve ser apresentada justificativa científica para a faixa de concentração contemplada pela curva de calibração; Deve ser adotado preferencialmente o modelo linear. Se não for possível utilizar modelos lineares, devem ser incluídas no mínimo 8 amostras de diferentes concentrações na curva de calibração;</p> <p>Critérios de aceitação: Para o padrão de calibração: desvio ≤ 20% em relação à concentração nominal para os padrões de LIQ; e desvio ≤ 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração. Para a curva de calibração: no mínimo 75% dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores e no mínimo 6 padrões de calibração de concentrações diferentes,</p>

<p>Linearidade/ curva de calibração (continuação)</p>		<p>Desenvolvimento de bioensaios: ensaios microbiológicos e ensaios de ligação: Ensaio com característica não linear. Preparar no mínimo seis concentrações do padrão em duplicata, que represente melhor a curva do teste.</p> <p>Critério de aceitação: Verificar a precisão dos resultados.</p>		<p>Critério de aceitação: Não são admitidos valores >20%, exceto o LIQ ≤ 25%, em pelo menos 75% dos padrões de calibração.</p>	<p>incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores.</p>
--	--	--	--	--	---

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012.

9.4 - ANEXO IV

Detalhamento do parâmetro intervalo segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Intervalo	Determinado através do limite inferior e superior, com exatidão e precisão aceitáveis derivado do teste da linearidade.	Desenvolvimento de bioensaios com característica físico-química: Determinado na curva de calibração. Desenvolvimento de bioensaios: microbiológicos e ensaios de ligação: Não aplicado	Determinado através das diluições determinadas no testes de precisão e exatidão	Determinado através do limite inferior e superior, com exatidão e precisão aceitáveis derivado do teste da linearidade.	Determinado através do limite inferior e superior, com exatidão e precisão aceitáveis derivado do teste da linearidade.

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012

9.5 - ANEXO V

Detalhamento do parâmetro de seletividade/ especificidade segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Seletividade/ especificidade	<p>Não apresenta um detalhamento para a execução do teste.</p> <p>Critério de aceitação: Demonstrar que o teste mensura apenas a molécula alvo.</p>	<p>Desenvolvimento de bioensaios com característica físico-química: Verificar as interferências dos componentes da matriz e os produtos de degradação. Realizar teste de identificação (qualitativo) da molécula alvo.</p> <p>Critério de aceitação: Demonstrar que o teste mensura apenas a molécula.</p> <p>Desenvolvimento de bioensaios: ensaios microbiológicos e ensaios de ligação: Verificar as interferências como a reatividade cruzada de metabólitos, medicações concomitantes.</p> <p>Critério de aceitação: Demonstrar que o teste mensura apenas a molécula.</p>	<p>Determinar através de amostras branco de matriz biológica que deve ser obtida de 6 amostras distintas. Possíveis interferentes: metabólitos, produtos de decomposição.</p> <p>Critério de aceitação: Demonstrar que nenhum componente da matriz biológica interfere na quantificação do analito. Se o método se destina a quantificar mais do que um analito, cada analito deve ser testado para garantir que não há interferência.</p>	<p>Bioensaios em geral Devem ser analisadas amostras de matriz biológica obtidas, de no mínimo, seis fontes distintas.</p> <p>Critério de aceitação: As respostas dos picos interferentes devem ser < 20% nas amostras LIQ e 5% para o PI.</p> <p>Ensaio de Ligação:</p> <p>Seletividade: Testar no mínimo 10 amostras de matrizes distintas, tendo amostra na concentração LIQ. Neste caso, deve ser verificada também qual a concentração mínima que a interferência pode ocorrer.</p> <p>Critério de Aceitação: Verificar a precisão Não são admitidos valores superiores a 20%, exceto o LIQ, que se admite valores menores ou iguais a 25%, em pelo menos 80% das amostras testada</p>	<p>Devem ser analisadas amostras de matriz biológica obtidas, de 6 fontes distintas;</p> <p>Critério de aceitação: Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do LIQ; As respostas dos picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser < 20% da resposta do analito nas amostras LIQ; As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser < 5% da resposta do PI; Caso uma ou mais amostras analisadas apresentarem interferência acima dos limites especificados, novas amostras de, no mínimo, outras seis fontes distintas devem ser testadas.</p>

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012

9.6 - ANEXO VI

Detalhamento do parâmetro limite de detecção segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Limite de detecção	Pode ser calculado com base na resposta de 2 ou 3 vezes o desvio padrão da amostra branco são considerados satisfatórios.	Não aplicado	Não aplicado	Não aplicado	Não aplicado

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012

9.7 - ANEXO VII

Detalhamento do parâmetro limite de quantificação segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA ^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMA, 2011	ANVISA, 2012
Limite inferior de quantificação	Menor quantidade da substância a analisar que pode ser quantificada, apresentando precisão e exatidão aceitáveis. Parâmetro utilizado para determinar impurezas no produto. Não apresenta um detalhamento para a execução do teste.	Desenvolvimento de bioensaios com característica físico-química: Concentração mais baixa da curva de calibração onde a resposta do analito no LIQ deve ser pelo menos 5 vezes a resposta em comparação com a resposta do branco e o pico deve ser identificável e com precisão de CV até 20% e exatidão de 80 a 120%. Desenvolvimento de bioensaios: ensaios microbiológicos e ensaios de ligação: Mensurar através da curva de calibração.	Não aplicado	Não aplicado	Não aplicado

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMA, 2011; ANVISA, 2012.

9.8 - ANEXO VIII

Detalhamento do parâmetro robustez segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Robustez	As variações podem ser ambiente, temperatura ou umidade da incubadora, tempos de incubação, pH, reagentes. Critério de aceitação: A precisão e a exatidão podem ser utilizadas para mensurar este parâmetro.	Não aplicado	Não aplicado	Não aplicado	Não aplicado

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012

9.9 - ANEXO XIX

Detalhamento do parâmetro efeito matriz segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA ^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMA, 2011	ANVISA, 2012
Efeito matriz	Não aplicado	Não aplicado	Não aplicado	<p>Bioensaios em geral Deve ser investigada por espectrometria de massa, utilizando pelo menos 6 lotes de matriz em branco de doadores individuais. Matrizes agrupados não devem ser usados.</p> <p>Critério de aceitação: O CV dos FMN's relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.</p>	<p>Efeito da amostra do analito ou PI causado pela matriz biológica. Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras CQB e CQA. Calcular o fator matriz normalizado (FMN).</p> <p>O CV dos FMN's relativos a todas as amostras < 15%.</p>

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMA, 2011; ANVISA, 2012

9.10 - ANEXO X

Detalhamento do parâmetro efeito residual segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA ^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Efeito residual	Não aplicado	Não aplicado	Não aplicado	<p>Bioensaios em geral É o aparecimento de um sinal de analito na amostra branco após a análise de amostras com uma alta concentração de analito. Deve ser analisada através da injeção de amostras em branco depois de uma amostra de alta concentração ou padrão de calibração no limite superior de quantificação. Injetar a amostra em branco seguindo o padrão de alta concentração.</p> <p>Critério de aceitação: Não deve ser > 20% do LIQ e 5% para o PI.</p> <p>Ensaio de ligação Pode não ser possível realizar o teste devido a dificuldade de extração em matrizes complexas. Uma curva de calibração pode ser preparada utilizando matrizes substitutas e uma matriz real e fazer as comparações entre ambas.</p>	<p>Aumento do sinal do analito ou PI proveniente de amostras analisadas anteriormente.</p> <p>Realizar 3 injeções do branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ.</p> <p>Critério de aceitação: Os resultados devem ser comparados com as amostras processadas do LIQ; Os picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser < 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ; As respostas dos picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser < 5% da resposta do PI.</p>

^a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012.

9.11 - ANEXO XI

Detalhamento do parâmetro estabilidade do analito na matriz biológica segundo a OMS, USP, FDA, EMEA, ANVISA^a

Parâmetro	OMS, 1997	FDA, 2001	USP, 2010	EMEA, 2011	ANVISA, 2012
Estabilidade do analito na matriz biológica	Não aplicado	<p>Desenvolvimento de bioensaios com característica físico-química:</p> <p>I – Congelamento e descongelamento: 3 ciclos, com 3 alíquotas de cada concentração baixa e alta, na temperatura de armazenamento por 24h e descongeladas a temperatura ambiente, de maneira natural. Quando descongeladas, devem ser novamente congeladas de 12 a 24 horas, sob as mesmas condições. O ciclo de descongelamento deve ser repetido por mais duas vezes e devem ser analisadas no 3º ciclo. Analisar as concentrações. Se a substância for instável na temperatura de armazenamento pretendida, as amostras devem ser congeladas a -70°C, durante três ciclos de descongelamento. Analisar as concentrações após o 3º ciclo.</p> <p>II – Curto prazo: preparar três alíquotas de cada uma das concentrações: alta e baixa. As amostras devem</p>	Não aplicado	<p>Bioensaios em geral</p> <p>Demonstrar a estabilidade do analito na matriz biológica. As amostras baixa e alta conforme a faixa de trabalho.</p> <p>I – Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas no mínimo de doze horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Após descongelamento total, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento por, no mínimo doze horas, e assim sucessivamente. O número de ciclos de congelamento e descongelamento deve ser igual ou maior ao número de ciclos que a amostra será submetida.</p> <p>Determinar a concentração do analito após o último ciclo.</p> <p>II – Estabilidade de curta</p>	<p>I – Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: amostras congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas no mínimo de doze horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Após descongelamento total, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento por, no mínimo doze horas, e assim sucessivamente. O número de ciclos de congelamento e descongelamento deve ser igual ou maior ao número de ciclos que a amostra será submetida.</p> <p>Determinar a concentração do analito após o último ciclo.</p> <p>II – Estabilidade de curta duração: as amostras devem ser processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente, ou na temperatura de processamento estabelecida para o bioensaio, por tempo superior ao que as amostras</p>

<p style="text-align: center;">Estabilidade do analito na matriz biológica (continuação)</p>		<p>ser descongeladas e mantidas a temperatura ambiente de 4 a 24 horas. Analisar as concentrações da amostra após o estudo.</p> <p>III – Longo prazo: é determinada pelo análise de pelo menos três alíquotas das concentrações baixa e alta sob as mesmas condições de armazenamento preconizadas. A concentração da amostra deve ser analisadas e comparada com o resultado da primeira e da última amostra da estabilidade.</p> <p>IV – Estabilidade da solução: verificar a estabilidade das soluções de reserva do fármaco e do padrão interno. As amostras devem ser mantidas à temperatura ambiente por pelo menos 6 horas. Se as soluções são refrigeradas ou congeladas, a estabilidade deve ser documentada, comparando os resultados da concentração inicial das amostras.</p> <p>V – Estabilidade pós-processamento: as amostras devem ser analisadas durante todo tempo previsto da execução total da metodologia.</p>		<p>duração: as amostras devem ser processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente, ou na temperatura de processamento estabelecida para o bioensaio, por tempo superior ao que as amostras serão mantidas nas mesmas condições durante o estudo.</p> <p>III – Estabilidade de longa duração: as amostras devem ser submetidas as mesmas condições de armazenamento e pela mesmo tempo de duração que as amostras de rotina. No caso de moléculas pequenas é considerado aceitável uma abordagem de escalonamento, isto é, se a estabilidade for aprovada nas temperaturas de -70°C e -20°C, não é necessário investigar nas temperaturas intermediárias. Porém, para moléculas grandes, a estabilidade deve ser analisada em cada uma das temperaturas que a amostra de estudo é armazenada.</p> <p>III - estabilidade de estoque e soluções de trabalho: Não é necessária para estudar a estabilidade em cada nível de concentração de soluções de trabalho e uma abordagem de escalonamento pode ser usado.</p>	<p>serão mantidas nas mesmas condições durante o estudo.</p> <p>III – Estabilidade de longa duração: as amostras devem ser processadas e analisadas após serem armazenadas por período que exceda o intervalo de tempo entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última.</p> <p>IV- Estabilidade pós-processamento: as amostras devem ser processadas e mantidas sob as condições de análise das amostras em estudo. O período deve ser superior ao intervalo do tempo entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa. Caso haja armazenamento além do auto-injetor, a estabilidade deve ser comprovada.</p> <p>V – Estabilidade do analito e PI em solução: deve ser comprovada a estabilidade do analito e PI em , no mínimo, três amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho de menor concentração por tempo superior ao período de uso ou armazenamento das mesmas; As amostras devem ser analisadas após serem</p>
--	--	---	--	---	---

<p>Estabilidade do analito na matriz biológica (continuação)</p>		<p>Critério de aceitação: não definido</p> <p>Desenvolvimento de bio-ensaios: ensaios microbiológicos e ensaios de ligação: Não aplicado.</p>		<p>IV – Estabilidade da amostra processada: realizar o estudo a temperatura ambiente ou condições de armazenamento durante toda análise.</p> <p>Critério de aceitação: A concentração média de cada nível deve estar dentro de 20% da concentração nominal.</p> <p>Ensaio de ligação Avaliar a estabilidade usando amostras de alto e baixo em relação ao CQ. Realizar a estabilidade de curto prazo à temperatura ambiente ou temperatura de processamento da amostra e estabilidade congelamento-descongelamento.</p> <p>Critério de aceitação: A concentração média de cada nível deve estar dentro de 20% da concentração nominal.</p>	<p>submetidas as mesmas condições a que serão submetidas as soluções durante seu uso e armazenamento;</p> <p>A estabilidade das soluções de trabalho e das soluções primárias deve ser analisada por meio de diluições apropriadas, verificando também a faixa de medição do detector;</p> <p>A média das respostas instrumentais oriundas das soluções em estudo deve ser comparada com a média de amostras recém preparadas do analito e do PI;</p> <p>Se for empregado um isótopo estável como PI, o estudo de estabilidade em solução não é necessário, desde que seja comprovada a ausência de reações de troca de isótopos nas condições do estudo da estabilidade.</p> <p>Critério de aceitação: As soluções serão estáveis quando não apresentar um desvio maior de 10% em comparação com soluções preparadas recentemente.</p>
--	--	---	--	---	--

a Fonte: OMS, 1997; FDA, 2001; USP, 2010; EMEA, 2011; ANVISA, 2012

