

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA QUALIDADE
DE PRODUTOS, AMBIENTES E SERVIÇOS VINCULADOS À
VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Natalia Guido Fernandes

**AVALIAÇÃO DO INGRESSO DO TESTE DE POTÊNCIA DA VACINA
ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS NO SISTEMA DE ALEATORIEDADE-
ANVISA/INCQS**

Rio de Janeiro

2012

Natalia Guido Fernandes

**AVALIAÇÃO DO INGRESSO DO TESTE DE POTÊNCIA DA VACINA
ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS NO SISTEMA DE ALEATORIEDADE-
ANVISA/INCQS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Orientador: Clarice Lima do Canto Abreu

Rio de Janeiro

2012

Fernandes, Natália Guido

Avaliação do ingresso do teste de potência da vacina atenuada contra Rotavírus no sistema de aleatoriedade– ANVISA/INCQS / Natália Guido Fernandes. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

56 f., il., tab.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2012.

Orientadora: Clarice Lima do Canto Abreu

1. Vacinas contra Rotavirus. 2. Controle de Qualidade. I.

Natalia Guido Fernandes

**AVALIAÇÃO DO INGRESSO DO TESTE DE POTÊNCIA DA VACINA ATENUADA
CONTRA ROTAVÍRUS NO SISTEMA DE ALEATORIEDADE– ANVISA/INCQS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora

Alexandre Alves de Souza Oliveira Dias- Doutor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Aparecida Affonso Boller- Mestre
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Isabel Maria Alexandre Freire- Mestre
Bio-Manguinhos- Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

- A minha família, pela inspiração e incentivo, além do amor que me incentivou a buscar o crescimento profissional

AGRADECIMENTOS

“A Deus, senhor de todas as ciências, por sustentar meu ânimo e determinação, a cada novo dia.”

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / FIOCRUZ, em especial a Maria Aparecida Affonso Boller e Katia Christina Leandro, pelo empenho em proporcionar-me a chance de realizar minha especialização.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação que me proporcionam.

Ao Eric Baur, que me ajudou, em muitos aspectos da formatação e até de confecção de figura e tabelas. Muito obrigada pelo carinho e pela enorme paciência.

A minha orientadora Clarice Lima do Canto Abreu, por entender minhas dificuldades e ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Wlamir Moura e ao professor Sergio Silva, pela ajuda em toda parte estatística deste trabalho, muito obrigada por toda sua paciência.

A todos do laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS, pelas valiosas sugestões dadas durante esse trabalho. Em especial a Patrícia Alves, Michele Nascimento e Jarbas Emilio, pelo apoio e incentivo.

A minha amiga Danielle da Silva Almeida, minha "irmã-de-coração", muito obrigada por todo o incentivo, ajuda e carinho, por todos estes anos.

A todos os professores da pós- graduação.

Aos meus amigos de Curso de especialização, pela amizade e apoio.

RESUMO

O Rotavírus foi identificado pela primeira vez por Ruth Bishop em 1973. Em 1979 Bishop e sua equipe descobriram que o vírus era responsável por 25% a 40% de todas as internações de crianças menores de cinco anos de idade. Infecções por Rotavírus constituem a segunda maior causa de morte mundial em menores de cinco anos. Pertence a família *REOVIRIDAE*, possui sete grupos (A a G), com transmissão fecal-ora, o vírus causa diarreia líquida, levando a desidratação. Atualmente existem duas vacinas disponíveis mundialmente: Pentavalente com rearranjo humano bovino, e a Monovalente consistindo da cepa RIX4414, que é registrada em mais de 48 países, e a única disponível no Brasil – licenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Desde 2006 está incluída no Programa Nacional de Imunização (PNI). É analisada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que atende ao PNI através de uma lógica de análise por aleatoriedade. Este estudo tem o intuito de contribuir com o processo de entrada desta vacina no sistema aleatoriedade, reduzindo assim o tempo de liberação de laudos e de insumos consumidos nos testes de avaliação da potência da vacina atenuada contra Rotavírus. O presente estudo se baseou em dados gerados por gráficos de consistência de produção, onde verificamos se o processo de produção da vacina obedece a uma constância, se mantendo uniforme ao longo do tempo. Todos os 222 lotes analisados no presente estudo foram aprovados e encontram-se sob controle estatístico. Desta forma recomendamos o ingresso do teste de Potência Biológica vacina atenuada contra Rotavírus no sistema de aleatoriedade.

Palavra chave: Vacina atenuada contra Rotavírus. Sistema Aleatoriedade. Gráfico de Controle

ABSTRACT

The Rotavirus was first identified in 1973 by Ruth Bishop. In 1979 Bishop and her team found that the virus was responsible for 25% to 40% of all hospitalizations of children under five years old. Rotavirus infections are the second leading cause of death worldwide in children under five years old. It belongs to the family *REOVIRIDAE*, has seven groups (A to G), with fecal-oral transmission. The virus causes watery diarrhea leading to dehydration. There are currently two vaccines available worldwide, with rearrangement Pentavalent human bovine and Monovalent consisting of RIX4414 strain, which is registered in over 48 countries, and only available in Brazil - licensed by the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA). Since 2006 is included in the National Immunization Program (PNI) is analyzed by the National Institute of Quality Control in Health (INCQS), which serves the PNI through a logical analysis of randomness. This study aims to contribute to the entry of this process of the biological potency test for attenuated rotavirus vaccine into the system of randomness, thereby reducing the release time of reports and raw materials consumed in tests to assess the biological potency of the vaccine against rotavirus. This study relied on data generated by graphs of production, where it was checked if the vaccine production process follows a constancy, with regard to the biological potency, remained uniform over time. All 222 lots examined in this study were approved and are under statistical control. According to this we recommend that the potency test of the attenuated rotavirus vaccine entry into the randomness system.

Keyword: Attenuated vaccine against rotavirus. Randomness System. Control Chart

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Taxa de mortalidade mundial de crianças causadas pelo Rotavírus	15
Figura 2 - Foto do vírus REOVIRIDAE	16
Figura 3 - Utilização mundial da vacina contra Rotavírus em Programa Nacional de Imunização em 2009	21
Figura 4 - Esquema resumido do procedimento de titulação da vacina contra Rotavírus	29
Figura 5 - Esquema de aplicação das amostras diluídas em microplacas de 96 orifícios	30
Figura 6 - Gráfico dos lotes de vacina contra Rotavírus analisadas por ano no INCQS	39
Figura 7 - Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2006	41
Figura 8 - Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2007	43
Figura 9 - Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2008	45
Figura 10 - Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2009	47
Figura 11 - Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2010	49
Figura 12 - Tabela demonstrando o coeficiente de variação interlaboratorial e a diferença entre as médias em log	50

LISTA DE SIGLAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCID₅₀- Dose Infectante em 50% da População Celular
CDC- *Center for Disease Control*
CENEPI/FUNASA- Centro Nacional de Epidemiologia- Fundação Nacional de Saúde
CEV- Campanha de Erradicação da Varíola
CGPNI- Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunização
CV%- Coeficiente de Variação
DAB- Diaminobenzidina
DEVEP/SVS- Departamento de Vigilância Epidemiológica- Secretaria de Vigilância em Saúde
DNEES- Divisão Nacional de Epidemiologia e Estatística de Saúde
ECVAM- *European Centre for Validation Alternative Methods*
FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA- Fundação Nacional de Saúde
ICH- *International Conference of Harmonization*
INCQS- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LCL- *Lower Control Limits*
MS- Ministério da Saúde
PNI- Programa Nacional de Imunização
POP- Procedimento Operacional Padrão
PU- Procedimento de Uso
SPC- *Statistical Process Control*
UCL-*Upper Control Limits*
WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. PATOGENICIDADE	13
1.2. ETIOLOGIA	15
1.3. SINTOMAS	17
1.4. TRASMISSÃO	18
1.5. PREVENÇÃO E CONTROLE	19
1.6. A VACINA ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS	19
1.7. PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÃO	22
1.8. QUALIDADE DOS IMUNOBIOLOGICOS	24
1.9. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE	25
1.9.1. Análise documental	26
1.9.2. Análise laboratorial	27
1.10. TESTE DE POTÊNCIA DA VACINA ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS	27
1.11. SISTEMA ALEATORIEDADE	31
1.12. ANÁLISE DE CONSISTÊNCIA DE PRODUÇÃO	31
1.13. ACOMPANHAMENTO DA CONSITÊNCIA DE PRODUÇÃO	32
1.14. CONTROLE ESTATÍSTICO DE PROCESSO	33
1.15. JUSTIFICATIVA	35
2. OBJETIVOS	36
2.1. OBJETIVOS GERAIS	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. METODOLOGIA	37
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1.1. Levantamento dos dados gerados nos testes de potência da vacina atenuada contra Rotavírus entre 2006 e 2010	37
3.1.2. Confecção de gráficos de controle	37
3.1.3 Limite de Confiança preconizado pelo ICH	38
3.1.4 Confecção do Coeficiente de Variação	38
3.1.5 Média das Diferenças	38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. TOTAL DE LOTES DE VACINA ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS	39
4.2. AVALIAÇÃO DA CONSISTÊNCIA DE PRODUÇÃO DA VACINA ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS ATRAVÉS DA ANALISE DOS GRAFICOS DE CONTROLE	40
4.2.1 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2006	40
4.2.2 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2007	42
4.2.3 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2008	44
4.2.4 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2009	46
4.2.5 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2010	48
4.2.6 Diferença interlaboratorial (Coeficiente de Variação)	50
5. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Dos diferentes agentes infecciosos conhecidos por serem associados com o desenvolvimento de diarreia em crianças, o Rotavírus é a causa mais comum de doença grave na infância (GLASS et al., 2005).

O Rotavírus foi identificado pela primeira vez em 1973 por Ruth Bishop, bióloga que estudava doenças gastrointestinais no Hospital Real de Crianças, em Melbourne, Austrália. Naquela época, a diarreia infantil causava perplexidade. Apesar de a doença ser comum e freqüentemente aguda, seu agente causador raramente era identificado. O grupo de Bishop analisou biópsias de tecidos do duodeno ou intestino delgado de crianças com diarreia aguda em microscópio eletrônico e encontrou uma infestação de vírus com formato circular (daí se deu a origem do nome Rotavírus) nas células epiteliais da parede do intestino (GLASS, 2006).

Em 1979, Ruth Bishop e sua equipe ficaram surpresos ao descobrir, que o vírus era responsável por 25% a 40% de todas as internações de crianças com menos de 5 anos admitidas com diarreias, em Bangladesh, no Centro Internacional de Pesquisa de Doenças Diarréicas, onde acreditavam que a causa da diarreia fosse bacteriana (GLASS, 2006).

Estudos mundiais mostraram resultados semelhantes. Tais estudos revelaram que o Rotavírus não só era muito comum, como era a principal causa de mortes nos países mais pobres (GLASS, 2006).

No Brasil, o Rotavírus foi detectado pela primeira vez em 1976 pelo Doutor Alexandre Linhares, do Instituto Evandro Chagas, em Belém. Este pesquisador esteve à frente de estudos epidemiológicos e clínicos para o desenvolvimento de uma vacina, quando o vírus foi isolado em cerca de 46% das crianças menores de três anos que apresentavam diarreia grave (LINHARES, 2000).

Em novo estudo realizado por Linhares, no período de janeiro 1979 a dezembro de 1980, o vírus foi isolado nas fezes de 122 (33%) das 369 crianças menores de seis anos com diarreia. O pesquisador registrou uma incidência do agente patogênico de 52% nas crianças menores de um ano; de 42% naquelas com idade entre um e dois anos, e de 31% entre as de dois e três anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÃO, 2006).

Tais observações representaram o marco inicial de inúmeros outros estudos no país, a maioria dirigida ao impacto determinado pela doença moderada ou grave por Rotavírus, qual seja, a que se traduz em consultas médicas e internação hospitalar (LINHARES, 2000).

1.1 PATOGENICIDADE

No mundo a infecção por Rotavírus constitui-se na principal causa de diarreia grave em crianças, contribuindo para elevada morbidade hospitalar e mortalidade (CARMO, 2006).

O Rotavírus é o responsável, aproximadamente a cada ano, por 114 milhões de episódios de gastroenterite, 25 milhões de consultas, 2,4 milhões de hospitalizações em menores de cinco anos e 611 mil mortes infantis, o que representa a cifra de 5% da mortalidade infantil mundial (AGUILAR et al., 2009; PARASHAR et al., 2003).

Estima-se no mundo que ao completar 5 anos, quase todas as crianças terão pelo menos um episódio de gastroenterite por Rotavírus, 1 em cada 5 crianças terá visitado uma unidade de saúde, 1 em 65 terá sido hospitalizada por essa causa, e aproximadamente 1 em cada 293 chegara a óbito (NIETO et al., 2008; PARASHAR et al., 2003).

A incidência da doença por Rotavírus em crianças é similar em países desenvolvidos e em desenvolvimento. No entanto, as crianças em países em desenvolvimento morrem com mais frequência, devido a vários fatores, entre eles o difícil acesso à terapia de hidratação e uma maior prevalência de desnutrição (PARASHAR et al., 2003).

Dados publicados pela Organização Mundial de Saúde em setembro de 2009, revelaram que a África e Ásia eram os continentes que apresentavam um maior número de mortes causada pelo Rotavírus, como demonstrado na figura 1.

Diante destes dados alarmantes, a rotavirose constitui a segunda causa de morte mundial nos menores de cinco anos, sendo precedida apenas pelas infecções respiratórias (NIETO et al., 2008). Segundo registros morrem a cada dia aproximadamente 2.000 crianças com quadro diarreico causado por esse patógeno,

e 82% destas mortes ocorrem em países mais pobres (LINHARES, 2000; PARASHAR et al., 2003).

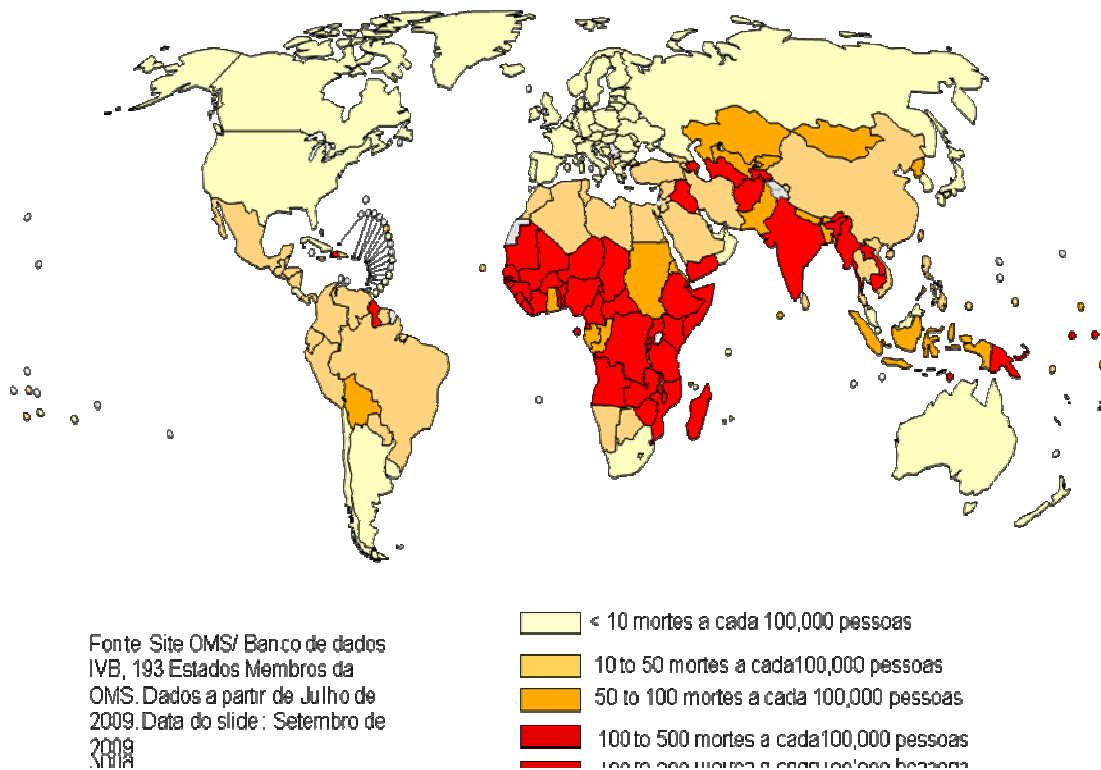
No Brasil, a realidade não difere da mundial, dados do DataSUS referentes ao ano de 2006 revelam que ocorreram neste período 2.236 óbitos por doenças diarreicas em menores de 5 anos.

Dados de 2008 disponíveis na Sala de Situação do Ministério da Saúde revelam que, nesse ano, ocorreram 47.223 óbitos por doenças infecciosas e parasitárias na população brasileira. Desse total, 3.737 decorreram de diarreia e gastroenterite de origem infecciosa presumida e 1.128, de diarreia em menores de 5 anos, representando uma tendência decrescente em relação ao ano de 2006, o que ainda representa um dado alarmante, que necessita de estratégias eficazes de combate (SALVADOR et al., 2011).

Em países desenvolvidos, assim como no Brasil, sua importância está relacionada ao impacto da doença na população, traduzido pelos seus danos à saúde, afetando o desenvolvimento infantil, bem como à sociedade pelos custos gerados da demanda aos serviços médicos, atendimento ambulatorial, pronto atendimento, hospitalizações (custos diretos) e as perdas de dias de trabalhos, de escola, gastos com medicamentos, transportes e outros (CARMO, 2006).

O conhecimento da interação de diarreia persistente e má nutrição como causa de mortalidade, tem reforçado a necessidade de desenvolvimento de programas de intervenção, além do tratamento baseado em terapia de reidratação oral primeiramente, e na ocorrência de vômitos e diarreias graves, e indicado tratamento via endovenosa, o que requer internação (SALVADOR et al., 2011).

Figura 1 - Taxa de mortalidade mundial de crianças causada pelo Rotavírus



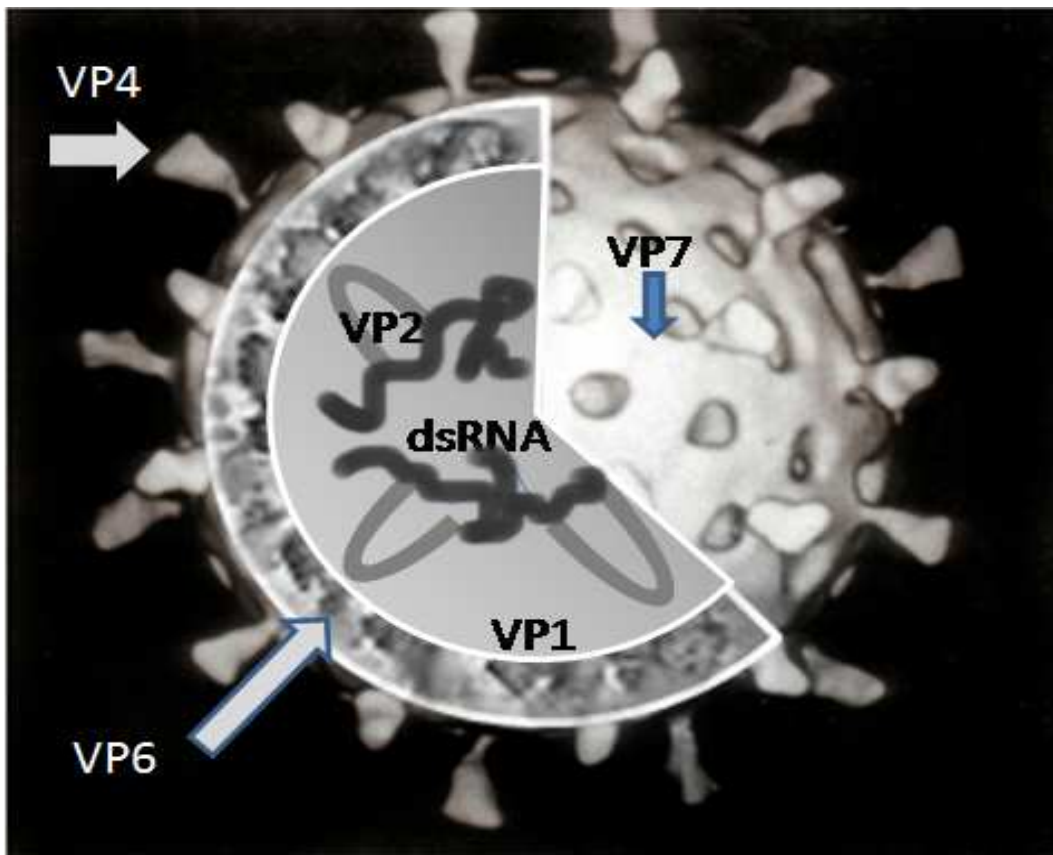
Fonte: site WHO

http://www.who.int/nuvi/rotavirus/Mortality_Rate_per_100000_Child_Deaths_due_to_RotaV.pdf

1.2 ETIOLOGIA

O Rotavírus pertence à família *REOVIRIDAE* e apresenta uma morfologia esférica com simetria icosaédrica, cerca de 100 nm de diâmetro e capsídeo viral constituído por três camadas protéicas concêntricas, como demonstrado na figura 2, (RÁCZ et al., 2005). O genoma consiste em RNA de fita dupla com 11 segmentos localizados dentro do nucleocapsídeo e com proteínas não estruturais, responsáveis por funções essenciais à replicação, patogênese e determinação da especificidade da espécie. Homens e animais são passíveis da infecção pelo Rotavírus, que possui sete grupos (de A a G). Porém, apenas os grupos A, B e C infectam o homem.

Figura 2 – Foto do Vírus *REOVIRIDAE*



Fonte: site WIKISPECIES

http://species.wikimedia.org/wiki/File:Rotavirus_Structure.png

A subdivisão em grupos depende dos antígenos comuns, localizados primordialmente no capsídeo interno. Os Rotavírus que causam mais de 95% das infecções em humanos correspondem aos do grupo A. Dentre os Rotavírus deste grupo, identificam-se diferentes tipos de antígenos (denominados sorotipos), baseados nas diferenças antigênicas das proteínas do capsídeo interno, VP7 e VP4. Até o momento, foram descritos 14 tipos antigênicos VP7 humanos (denominados também de tipos G por se tratar de uma glicoproteína) e 9 tipos antigênicos P (denominados P, devido à “sensibilidade à protease”) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÃO, 2006). O grupo B causou grandes focos de gastroenterite em crianças e adultos apenas na China; e o grupo C, apesar de ser de distribuição mundial, foi encontrado em baixa prevalência (COMITÊ NACIONAL DE INFECTOLOGIA, 2006).

Freqüentemente os mais encontrados em todo o mundo são os sorotipos G1 a G4 do Grupo A (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Dados de Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Equador, Honduras, México, Panamá e Venezuela estimam que mais da metade das hospitalizações por Rotavírus se deve ao sorotipo G1 (NIETO et al., 2008).

Quando o ser humano ingere o vírus, a proteína VP4 da superfície externa dos Rotavírus é fracionada, pelas enzimas pancreáticas, tripsina ou elastase, em duas proteínas menores (VP5 e VP8), e após este fenômeno o vírus adere às células do epitélio intestinal (BRINCKS, 2005). Assim, o principal sitio de replicação viral é o intestino delgado, em particular o jejuno, nas células do topo das vilosidades intestinais (RÁCZ et al., 2005). A lesão de tal epitélio desencadeia então o fenômeno de má absorção, devido à depressão transitória no nível das dissacaridasas, resultando, por conseguinte, no caráter osmótico da diarreia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

1.3 SINTOMAS

O caráter severo dos episódios diarreicos associados aos Rotavírus é de reconhecimento universal, identificando-se maior impacto nos países do Terceiro Mundo, onde despontam como agravantes a desnutrição e, os simultâneos processos infecciosos envolvendo outros enteropatógenos (LINHARES, 2000).

Infecções por Rotavírus muitas vezes podem ocorrer de forma subclínica. Apresentando curto período de incubação, os episódios de diarreia podem variar de um quadro leve, com diarreia líquida e duração limitada a quadros graves com febre, vômitos e desidratação. As conseqüências da infecção estão relacionadas à idade. Embora possam infectar indivíduos de todas as idades, infecções sintomáticas, isto é, apresentando diarreia, geralmente ocorrem em crianças na faixa etária de seis meses a dois anos. Aproximadamente 90% das crianças nos países desenvolvidos e em desenvolvimento são acometidos de uma infecção por Rotavírus até os 3 anos de idade (BERNSTEIN, 2007).

Tem sido a principal causa de surtos de diarreia nosocomial em creches e pré-escolas. Apesar da doença diarreica ocorrer primariamente em crianças,

também é comum em jovens e adultos, associada a surtos esporádicos de diarreia em espaços fechados como escolas, ambientes de trabalho e hospitais (CARMO, 2006).

A duração do quadro clínico é, em média, de quatro a cinco dias, embora o período possa variar de um a dez ou mais dias. A lesão da mucosa intestinal pode levar a uma intolerância transitória aos dissacarídeos que, numa pequena proporção de pacientes, pode se prolongar (SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÃO, 2006).

Como existem vários sorotipos de Rotavírus, a gastroenterite por este agente pode ocorrer mais de uma vez. A primeira infecção geralmente é a mais grave. Estudos clínicos sugerem que após a segunda infecção as manifestações clínicas se abrandam e a doença tem menor probabilidade de complicações (CARMO, 2006).

1.4 TRANSMISSÃO

As fezes de crianças infectadas apresentam concentrações de Rotavírus que são excretadas desde dois dias antes, até vinte e um dias após o início dos sinais e sintomas. Cerca de 10 a 100 partículas virais já são suficientes para desencadear a doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÃO, 2006).

A transmissão é fecal-oral (alta excreção nas fezes – um trilhão de partículas virais/mL de fezes), por água ou alimentos contaminados, por contato pessoa a pessoa, objetos contaminados e, também por secreções respiratórias, mecanismo que permite a disseminação explosiva da doença (VRANJAC, 2006).

A sazonalidade das infecções, estendendo-se desde o outono até a primavera, é observada nos países de clima temperado. Nas regiões tropicais as infecções ocorrem o ano todo (VRANJAC, 2006).

O elevado potencial disseminador e a grande variedade de cepas circulantes do Rotavírus, favorecidos por fatores como o clima, conglomerados urbanos de alta densidade populacional, convivência em creches e outros ambientes fechados, mostram que, além das medidas tradicionais de higiene e de saneamento básico para sua prevenção, a perspectiva real para o seu controle seria a introdução de uma vacina eficaz e segura no calendário de vacinação infantil (VRANJAC, 2006).

1.5 PREVENÇÃO E CONTROLE

Prevalece amplo consenso, atualmente, de que o efetivo controle das gastroenterites por Rotavírus se condiciona ao advento de uma vacina eficaz para uso corrente ao longo do primeiro semestre de vida (LINHARES, 2000). Tal asserção se fundamenta na singularidade que permeia a epidemiologia das infecções por esses vírus, evidenciada pelo fato de as taxas de incidência da doença nos países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento serem comparáveis. Devido ao fato de o vírus ser altamente contagioso e se espalhar com grande facilidade deduz-se que, eventuais intervenções na esfera da saúde pública, como o acesso amplo à água potável e a implementação de medidas visando ao saneamento básico, resultarão em impacto inexpressivo no que concerne à morbidade associada às diarreias por Rotavírus (LINHARES, 2000).

1.6 A VACINA ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS

Os investimentos em pesquisas para disponibilizar uma vacina eficaz e segura contra o Rotavírus vêm sendo realizados desde 1980 (VRANJAC, 2006).

Tal esforço se deve, sobretudo, ao quadro epidemiológico dramático da infecção por este agente, que não é passível de prevenção por meio de programas de saneamento e higiene (VRANJAC, 2006).

Em agosto de 1998, o laboratório Wyeth Ayerst licenciou, nos Estados Unidos, a vacina denominada Rotashield™ de natureza antigênica polivalente e com rearranjo genético, na tentativa de ampliar a proteção contra os sorotipos G1 a G4 (VRANJAC, 2006). Nos nove meses seguintes mais de 600 mil crianças receberam 1,2 milhões de doses da vacina. Em 1999, vários bebês sofreram uma séria complicação duas semanas após receberem a vacina. Em tal complicação, um segmento do intestino invaginava-se sobre outro segmento, obstruindo a luz intestinal, criando um bloqueio chamado intussuscepção (IS). O Centers for Disease Control (CDC) que monitorava a experiência, ordenou a suspensão imediata do

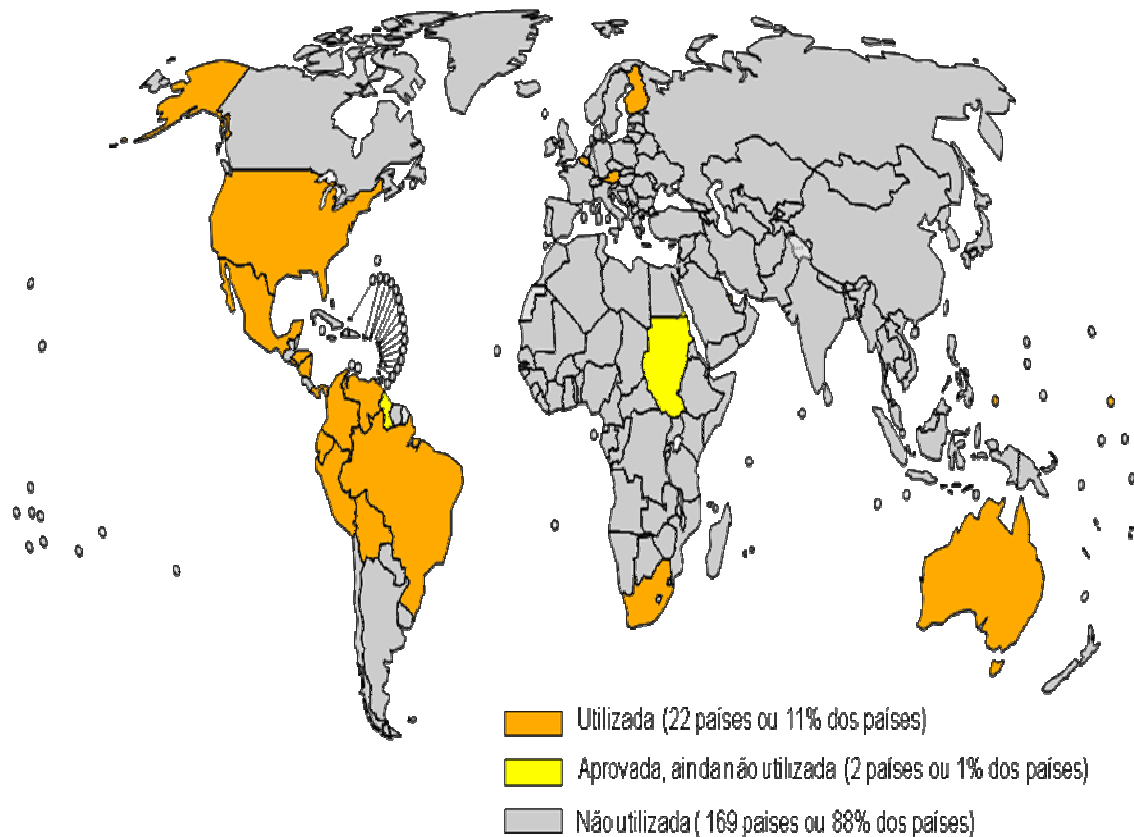
programa de imunização, que havia consumido 15 anos e centenas de milhões de dólares (GLASS, 2006).

Atualmente existem duas vacinas contra Rotavírus disponíveis no mercado que se mostraram altamente eficazes. As duas produzidas por indústrias internacionais. Sendo uma delas, monovalente consistindo na cepa RIX4414; de origem humana, e a outra, pentavalente, com rearranjo humano-bovino, contendo cinco vírus geneticamente distintos reagrupados (GLASS, 2006).

Segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), a vacina contra Rotavírus deve ser administrada em crianças do mundo todo (WHO, 2010).

Como demonstrado na figura 3, dados da WHO de 2009 avaliaram que países pobres da África e Ásia, não possuem a vacina contra Rotavírus em seu programa nacional de Imunização (WHO, 2010).

Figura 3- Utilização mundial da Vacina contra Rotavírus em Programas Nacionais de Imunização em 2009.



Fonte: OMS / Banco de dados IWB: Dados de Novembro de 2010, 193 Estados Membros da OMS
 Data do slide: 04 de Novembro de 2010.

Fonte : site WHO

http://www.who.int/nuvi/rotavirus/Countries_Using_RotaV_Nat_Immunization_Schedule.pdf

A vacina monovalente RIX4414 foi desenvolvida com uma cepa isolada em Cincinnati, Ohio, EUA (cepa 89-12) a partir de uma criança doente infectada pelo Rotavírus em 1989. Observou-se que a infecção natural com a cepa de Rotavírus 89-12 induzia a produção de anticorpos neutralizantes contra os quatro principais sorotipos do Rotavírus e conferia a proteção contra Rotavírus subsequentes, mesmo quando a infecção inicial era assintomática (BERNSTEIN, 2007).

Tal vacina é registrada em mais de 48 países e a única disponível no Brasil - licenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2005 e

incluída no calendário do Programa Nacional de Imunizações (PNI) em 2006. A licença concedida determina a administração de duas doses em crianças de seis a 24 semanas, com intervalo mínimo de quatro semanas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÃO, 2006).

Composta de vírus de seres humanos isolados e atenuados, que permitem a manutenção de sua capacidade imunogênica, porém não patogênica, apresenta apenas um sorotipo em sua composição G1[P8]. A apresentação é monodose, sendo que cada dose da vacina contém: frasco com pó liofilizado e aplicador com diluente; após a reconstituição, cada dose corresponde a 1 mL, a qual deve ser administrada exclusivamente por via oral (SALVADOR et al., 2011).

O maior objetivo da vacinação contra o Rotavírus é mimetizar a resposta imunológica à infecção natural, protegendo o vacinado contra doença moderada/grave e suas conseqüências, como hospitalizações, morte e impacto socioeconômico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÃO, 2006).

Atualmente, as cifras brasileiras acerca da eficácia da vacina contra Rotavírus utilizada no Brasil revelam que a proteção para todas as diarreias por Rotavírus é de aproximadamente 70%; para formas graves, é de 86% a 98%; para hospitalizações por diarreia por Rotavírus, é de 80% a 95% (SALVADOR et al., 2011).

1.7 PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÃO

Com o êxito da Campanha de Erradicação da Varíola (CEV) na década de 60, houve o fortalecimento dentro do Ministério da Saúde, de uma corrente que defendia maiores investimentos no controle de doenças infecciosas preveníveis por imunização. O último caso de varíola no Brasil foi em 1971 e, no mundo, em 1977 na Somália (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Em 1973, com o Ministério da Saúde (MS) funcionando no Rio de Janeiro, as atividades de vacinação estavam divididas: enquanto algumas eram operacionalizadas pelos programas verticais do MS, como varíola, tuberculose e febre amarela, outras eram executadas através das secretarias estaduais de Saúde, como poliomielite, sarampo e vacina tríplice bacteriana (TEMPORÃO, 2003).

Entre 1971 e 1973, a Divisão Nacional de Epidemiologia e Estatística de Saúde (DNEES) desenvolveu toda a tecnologia e metodologia necessárias à

implementação de ações de vacinação em massa que pudessem ser utilizadas no controle de outras doenças. Na essência trabalhava-se na construção de uma estratégia que pudesse tirar a extrema defasagem histórica no combate a estas doenças com uma intervenção baseada em campanhas, associada a uma forte estrutura de vigilância epidemiológica (TEMPORÃO, 2003).

A criação do Programa Nacional de Imunização (PNI), em 1973, deu-se no âmbito do processo de formulação de grandes programas nacionais, na gestão do ministro Mário Machado de Lemos (1972-74). Lançado oficialmente em Brasília, no final de 1973, o PNI estava funcionalmente vinculado ao DNEES com o objetivo de coordenar as ações de imunização que se caracterizavam, até então, pela descontinuidade, pelo caráter episódico e pela reduzida área de cobertura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O PNI, em seu documento conceitual, refere como exigências programáticas que seria preciso estender as vacinações às áreas rurais, aperfeiçoar a vigilância epidemiológica em todo o território nacional, capacitar laboratórios oficiais para respaldarem com diagnóstico, instituir pelo menos um laboratório nacional de referência para o controle da qualidade das vacinas, racionalizar sua aquisição e distribuição e uniformizar as técnicas de administração, além de promover a educação em saúde para aumentar a receptividade da população aos programas de vacinação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

De 1990 a 2003, o PNI fez parte do CENEPI/FUNASA (Centro Nacional de Epidemiologia-Fundação Nacional de Saúde). A partir de 2003, passou a integrar a DEVEP/SVS (Departamento de Vigilância Epidemiológica- Secretaria de Vigilância em Saúde), inserido na Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunização- (CGPNI) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Ao longo do tempo, a atuação do PNI, ao consolidar uma estratégia de âmbito nacional, apresentou, na sua missão institucional precípua, consideráveis avanços. As metas mais recentes contemplam erradicação do Sarampo e a eliminação do Tétano neonatal. A essas se soma, controle de outras doenças imunopreveníveis como Difteria, Coqueluche, e Tétano acidental, Hepatite B, Meningites, Febre Amarela, formas graves da Tuberculose, Rubéola e Caxumba em alguns estados, bem como, a manutenção da erradicação da Poliomielite (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Diante deste panorama, destaca-se que um dos escopos do Programa Nacional de Imunização (PNI) é garantir a excelência de qualidade dos imunobiológicos a serem aplicados, ou seja, não garantir tão somente a vacinação, mas uma perfeita e adequada imunização, tentando alcançar coberturas vacinais de 100% de forma homogênea em todos os municípios e em todos os bairros (SALVADOR et al., 2011).

1.8 QUALIDADE DOS IMUNOBIOLOGICOS

A institucionalização do Programa Nacional de Imunizações, a progressiva implementação e dinamização de suas atividades e o sucesso alcançado pela adoção de estratégias de imunização em massa proporcionadas pelas campanhas aumentaram em muito a utilização de imunobiológicos e trouxeram consigo a necessidade de garantir a qualidade dos produtos empregados tanto pelo Programa Nacional de Imunização como pelas demais atividades de vacinação colocadas fora de sua esfera de atenção. Tal necessidade se tornou pública em maio de 1981, quando, em virtude de ter sido constatada a contaminação da vacina importada da Iugoslávia, que iria ser utilizada na campanha contra a poliomielite, foram adiados os dias nacionais de vacinação, previstos para julho e agosto daquele ano (PONTE, 2003).

O problema começou em abril daquele mesmo ano, quando foram observadas alterações de cor e presença de impurezas em alguns frascos do imunizante adquirido para uso na campanha em fase de preparação. A detecção desses frascos levou a um exame mais cuidadoso da vacina e do processo de produção do Laboratório Torlak, fabricante do antígeno sob suspeita. As análises levadas a efeito pela FIOCRUZ identificaram a proliferação do fungo *Penicillium sp*, que, apesar de não ser nocivo ao homem, confirmava a existência de falhas na elaboração da vacina. Por outro lado, técnicos brasileiros (da Fiocruz e do Instituto Butantan) enviados à Iugoslávia constataram defeitos mecânicos na máquina de envasamento que poderiam explicar a contaminação do produto. Diante de tais circunstâncias, as autoridades optaram por rejeitar as 26 milhões de doses já estocadas no Brasil e cancelar o recebimento de 54 milhões de outras também contratadas com o laboratório Iugoslavo. Paralelamente, buscaram suprir as

necessidades de vacinas da campanha nacional contra a poliomielite fazendo novas aquisições com outros laboratórios (PONTE, 2003).

Em 30 de maio de 1981, o Ministério da Saúde iria começar a discutir a implantação de um sistema nacional de controle da qualidade de vacinas, definindo os laboratórios mais aptos para realizar esse tipo de análise, ficava estabelecido que qualquer vacina importada pelo Brasil deveria passar por exames rigorosos no Centro Nacional de Referência para Enterovirose, da FIOCRUZ. O país começava a perceber o grau de defasagem institucional e tecnológica que o separava dos países do primeiro mundo no que se relacionava ao controle da qualidade e à produção de vacinas e medicamentos (PONTE, 2003).

No início de 1979, recursos para controle da qualidade e produção de vacinas foram transferidos provisoriamente para os laboratórios de Bio-Manguinhos e Farmanguinhos na Fiocruz, até que as novas instalações fossem construídas no campus daquela instituição. A nova sede, a mudança de denominação para Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), bem como os recursos necessários ao funcionamento do laboratório já haviam sido negociados com o Governo Federal e vinham sendo paulatinamente liberados (PONTE, 2003).

Concluía-se as obras do prédio sede, adquiria-se equipamentos necessários, contratava-se pessoal e iniciava-se a ocupação dos 12 mil metros quadrados de área construída. Embora aclamado como o maior laboratório no gênero da América Latina, somente em 1983 o INCQS passou a centralizar o controle da qualidade das vacinas empregadas pelo PNI (PONTE, 2003).

1.9 INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) que atua em áreas de ensino, de pesquisa e de tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. Entre seus parceiros estão a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os Laboratórios Centrais e Centros de Vigilância Sanitária das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde. Como membro integrante do Sistema de Vigilância Sanitária

Brasileira, tem como sua responsabilidade as ações tecnológicas e normativas correspondentes ao controle e fiscalização de produtos e substâncias de interesse para a saúde, com o objetivo de verificar o cumprimento da legislação. Estão no escopo de sua competência as análises laboratoriais previstas na legislação sanitária; emissão de documentos ou normas; participação em inspeção de indústrias, quando convidado; avaliação de processo de registro de produtos e a capacitação de recursos humanos (BRANDÃO, 2008).

Os produtos chegam para a análise no Instituto por apreensões fiscais (demanda espontânea), por programas de análise com a ANVISA e Vigilâncias Estaduais ou Municipais, enviados pelos Laboratórios Centrais ou para análise e parecer em processos Judiciais (BRANDÃO, 2008).

É atualmente constituído por quatro departamentos técnicos de acordo com a área de conhecimento: Química (DQ), Microbiologia (DM), Farmacologia e Toxicologia (DFT), Imunologia (DI), além do Departamento de Apoio aos Programas de Saúde (DAPS), para recebimento e armazenamento de amostras (INCQS, 2011; BRANDÃO, 2008).

Com o início da vacinação contra Rotavírus pelo Programa Nacional de Imunização (PNI) em 2006, o INCQS deu início as seguintes análises:

1.9.1 Análise documental

É analisada a documentação referente à produção com a intenção de avaliar se o produto obedece a todos os parâmetros de qualidade estabelecidos pelas normas oficiais da OMS.

Tem como objetivo a competência técnica na realização de ensaios e na produção de resultados precisos e exatos. Abrange todas as atividades das áreas técnicas e administrativas, garantindo a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados institucionais, controlada de acordo as normas oficiais da OMS (BRANDÃO, 2008).

1.9.2 Análise laboratorial

- Departamento de Química
 - Determinação do pH
 - Volume Médio

- Departamento de Microbiologia
 - Esterilidade

- Departamento de Imunologia
 - Termoestabilidade
 - Identidade
 - Potência

1.10 TESTE DE POTÊNCIA DA VACINA ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS

O teste de potência tem por objetivo constatar se o título da vacina, informado pelo produtor encontra-se dentro de todas as especificações preconizadas pela OMS.

O teste fundamenta-se na estimativa do conteúdo de vírus infectante da amostra, expresso em CCID₅₀ (dose 50% infectante em cultura de células).

A determinação da potência da vacina atenuada contra Rotavírus é realizada a partir da avaliação de três frascos, de um mesmo lote, recebido e armazenado conforme recomendações do fabricante, no Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS.

Teste realizado *in vitro*, segundo POP 653430040 (INCQS, 2008), como observado na figura 4, utilizando microplacas de 96 orifícios sementeadas com suspensão celular de linhagem MA-104 (células de linhagem de rim fetal de macaco Rhesus) em um volume de 200 µL na concentração de 1×10^4 cél/mL em meio

DMEM, para a manutenção e crescimento celular, a placa deve ser incubada a 37 °C por 3 a 4 dias.

Após este tempo todo o meio de crescimento das microplacas é descartado e as mesmas são lavadas três vezes com meio de lavagem DMEM, para a completa remoção do soro fetal bovino.

A vacina (teste e referência) diluída é inoculada em um volume de 100 µL por orifício das quatro últimas diluições em cada 10 orifícios da microplaca, sempre da mais diluída, para a mais concentrada, deixando a coluna 12 para controle de células, como o esquema da figura 5.

Após 7 dias de incubação em estufa de CO² a 37 °C, todo o conteúdo existente nas microplacas é retirado e adicionado acetona a 90% em água destilada, incubando-as por 20 minutos a – 20 °C.

A acetona é removida, deixando-se as microplacas secando em temperatura ambiente, posteriormente adiciona-se anticorpo anti VP7 (2C9- Identificação do Anticorpo) diluído em Blotto (80 mg PBS+ 4 mg Leite Desnatado), incubando por uma hora à 37 °C.

Lavar e secar bem as placas após este intervalo e adicionar anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase.

Após a incubação por uma hora a 37 °C lava-se três vezes e secar as placas para inocular solução de DAB (Diaminobenzidina - um cromógeno que promove a visualização da reação antígeno-anticorpo final que ocorre com a proteína detectada na célula), deixa-se as placas por 10 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

O corante é descartado completamente após este intervalo de tempo, as microplacas são lavadas em água corrente por três vezes, deixa-se secar, a leitura é realizada no microscópio invertido, onde será visualizado em quantos poços ocorre o efeito citopático (traduzido por uma alteração na cor, provocada pela interação antígeno-anticorpo, marcada por corante ligado ao anticorpo - DAB). Para cada poço onde ocorre tal efeito, é atribuído um valor, que corresponde ao fator de diluição (0,6). Posteriormente, calcula-se a média geométrica dos poços que apresentaram efeito citopático, atribuindo a cada um deles o valor de diluição de 0,6. Aplica-se estes valores em uma planilha de cálculo estatístico do Excel, onde o programa realiza o cálculo com base na leitura do 7º dia, segundo Spearman & Karber expressando os resultados em CCID₅₀ / dose. A média deve ser acima 10⁶ CCID₅₀ /

dose, que definirá se a amostra encontra-se dentro do título preconizado.

Figura 4-Esquema resumido do procedimento de titulação de Vacina contra Rotavírus

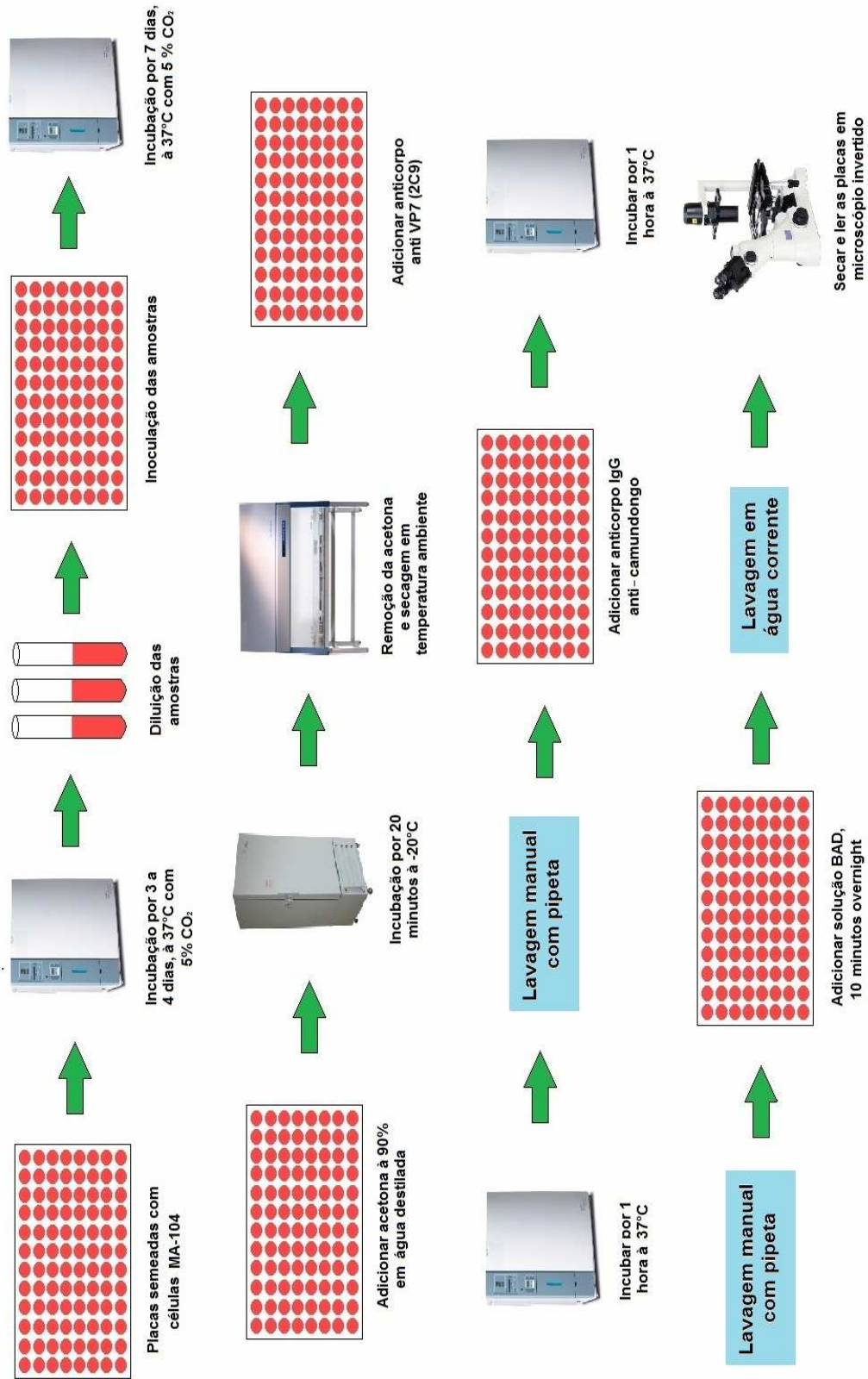
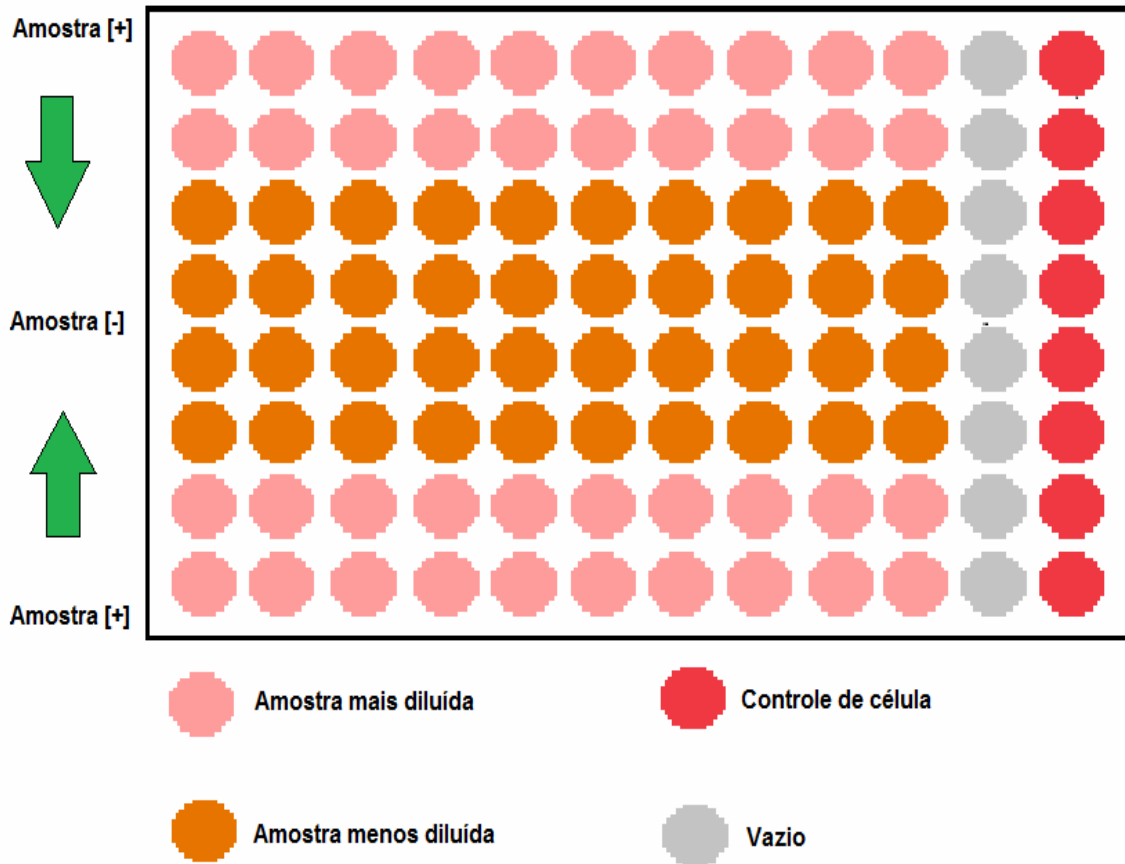


Figura 5- Esquema da aplicação das amostras diluídas em microplacas de 96 orifícios.



1.11 SISTEMA DE ALEATORIEDADE

Através de um acordo firmado com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), em reunião realizada em junho de 2002, em Brasília, o INCQS passa, a partir do início de 2003, a não mais realizar análise laboratorial lote-a-lote de algumas vacinas. A liberação dos laudos analíticos se dá após a verificação das informações descritas nos protocolos resumidos de produção e controle da qualidade do produto e, no caso de importados, também com base no certificado de liberação emitido pela autoridade regulatória do país de origem. Esta decisão levou em consideração três critérios básicos: histórico de consistência de resultados analíticos satisfatórios ao longo dos anos; autorização de comercialização expedida pela ANVISA (registro sanitário); e histórico de eventos adversos. Este procedimento é sugerido como forma efetiva de controle da qualidade pela OMS e já vem sendo realizado pelos principais laboratórios oficiais dos países de tecnologia de ponta (NETTO, 2010).

O INCQS atende ao PNI através de uma lógica de análise por aleatoriedade, isto é, para cada 4 lotes de vacinas e diluentes ingressados no Instituto, independente de sua apresentação, somente 1; e aleatoriamente selecionado e submetido aos ensaios laboratoriais, esta seleção é realizada através do SGA (Sistema de Gerenciamento de Amostra), utilizado pelo INCQS desde 1999, sistema informatizado que permite o acompanhamento das análises de produtos desde a sua chegada ao Instituto até a liberação dos laudos de análise. A política de aleatoriedade prevê ainda que 100% dos lotes ingressados no INCQS seja objeto de análise documental, e a análise de protocolo resumido de produção e controle, ocorra para todos os lotes destinados ao PNI.

1.12 ANÁLISE DE CONSISTÊNCIA DE PRODUÇÃO

Consistência é um conceito antigo que tem por objetivo assegurar a liberação ininterrupta de produtos eficazes e seguros para a população. Tal definição de análise de consistência pode ser usada quando se refere a uma nova abordagem para a liberação de lotes de vacinas tradicionais. A análise de consistência utiliza parâmetros estabelecidos para a constituição de um perfil do produto, que pode

substituir o teste atualmente utilizado para liberação de lotes. O perfil do produto é estabelecido no momento de seu licenciamento e tal perfil é monitorado durante toda a sua produção sob um estrito sistema da qualidade. O perfil do produto garante que cada lote liberado seja similar à vacina do fabricante de eficácia clínica e segurança comprovadas, no que diz respeito a todas as características estabelecidas entre produtor e órgão regulador no momento da licença (HENDRIKSEN et al., 2008, MATTIA et al., 2011).

A análise de consistência visa identificar indicadores críticos de um produto efetivo e seguro e ainda monitorar tais indicadores durante a produção, reduzindo assim, a necessidade de realização de testes em produtos finais (HENDRIKSEN et al., 2008).

Consistência se baseia em informações obtidas durante o desenvolvimento do produto e a produção utilizando ferramentas analíticas adequadas e contínua avaliação dos dados gerados através do tempo (HENDRIKSEN et al., 2008). É um conceito que inclui a aplicação de diretrizes do processo de validação, testes no processo e produto final, com a finalidade de verificar se um processo de fabricação produz lotes finais que são consistentes com um que preenche todos os critérios de segurança, qualidade e eficácia (MATTIA et al., 2011)

1.13 ACOMPANHAMENTO DA CONSISTÊNCIA DE PRODUÇÃO

Um Workshop realizado pelo European Centre for Validation Alternative Methods (ECVAM) em 2006 na Itália chegou à conclusão de que a liberação de lotes de vacinas por análise de consistência pode ser considerado uma realidade (HENDRIKSEN et al., 2008). A análise de consistência leva a um sistema mais rigoroso de controle da qualidade dos lotes de vacina (HENDRIKSEN et al., 2008).

Além dos testes analíticos-laboratoriais e análise documental para verificação dos critérios preconizados pelas normas oficiais para os produtos imunobiológicos, os laboratórios nacionais podem realizar a análise da consistência de produção lote a lote. No caso deste estudo, a análise consistiu na confecção de gráficos de controle com os resultados de potência obtidos pelo produtor, e pelo INCQS, e a diferença absoluta de resultados dos valores fornecidos pelo produtor e pelo INCQS,

com a finalidade de verificar a possibilidade do ingresso do teste de potência da vacina atenuada contra Rotavírus no sistema de aleatoriedade ANVISA/INCQS.

O processo de produção de vacinas em sistemas biológicos é altamente sujeito a muitas variações, das mais complexas até as mais sutis.

Por este motivo, todas as fases da produção de vacinas devem ser rigorosamente checadas e controladas desde o início ao final da mesma.

Essas variações podem ocorrer tanto por alterações da atividade do material de referência (que são devidamente certificados e aferidos), como do próprio método, ou de outros fatores envolvidos, como linhagens celulares, reagentes e subjetividade dos desfechos relacionados aos testes empregados (OMS, 2010).

1.14 CONTROLE ESTATÍSTICO DE PROCESSO

Para a confecção dos gráficos, foi utilizado o programa SPC Explorer RT da Quality America que foi desenvolvido em 1960, e refere-se a um conjunto de técnicas avançadas para monitoramento e controle do desempenho operacional de lotes e processos contínuos (BERSIMIS et al., 2007). Este programa é muito utilizado pelo INCQS, e validado pela OMS para o acompanhamento de materiais de referência visando à validação de ensaios, para a avaliação de consistência de produção de fabricantes de imunobiológicos e para a comparação entre os resultados dos fabricantes e do órgão fiscalizador. Sua principal ferramenta é o gráfico de controle, usado para verificar a estabilidade do processo (WOODAL, 2000). O gráfico reflete os limites de especificação, ou seja, o limite de controle superior (UCL), e o limite de controle inferior (LCL), os quais os dados do teste devem obedecer (RALLABANDI et al., 2009), distinguindo causas de variabilidade comuns e especiais.

As comuns seriam originárias da variabilidade natural do processo, cuja variação possui um comportamento puramente aleatório, indicando que o processo esta sob controle (BAYER, KOZAKEVICIUS, 2010). As causas especiais revelam a formação de padrões distintos acusando que algo incomum está influenciando o processo (BAYER, KOZAKEVICIUS, 2010). Se não houver variabilidade devido a causas especiais, este processo pode ser considerado “sob controle estatístico” (WOODAL, 2000).

A OMS recomenda o uso de gráficos de controle com limites de confiança de três desvios-padrão para acompanhamento dos materiais de referência, da análise de tendências e da consistência de produção (OMS, 1997; 2010).

1.15 JUSTIFICATIVA

Dentre os produtos biológicos analisados pelo INCQS, encontra-se a vacina atenuada contra Rotavírus, que é uma das vacinas que ainda não entrou no sistema de aleatoriedade, e que constitui um papel importante no Brasil, pois a rotavirose como mencionado anteriormente, representa a segunda maior causa de mortes em crianças menores de cinco anos, constituindo um problema de saúde pública.

O ingresso do teste de potência da vacina atenuada contra Rotavírus no sistema de aleatoriedade proporcionara uma redução de tempo de liberação de lotes da mesma, assim como dos insumos consumidos nestes testes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possibilidade do ingresso do Teste de Potência da vacina atenuada contra Rotavírus no sistema de aleatoriedade ANVISA/INCQS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar os dados dos Testes de Potência da vacina atenuada contra Rotavírus, fornecidos pelo produtor, e pelo INCQS, no período de 2006 a 2010;
- Aplicar os dados no Programa Estatístico de Controle de Processo (SPC Explorer RT);
- Estabelecer o limite de confiança de 95% preconizado pelo ICH, para $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável;
- Confeccionar o coeficiente de variação CV% geométrico;
- Calcular a média das diferenças;
- Comparar os valores resultantes dos testes de potência, obtidos pelo fabricante com os dados do INCQS, e analisar as diferenças através do programa SPC Explorer RT.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Levantamento dos dados gerados nos Testes de Potência da vacina atenuada contra Rotavírus entre 2006 e 2010;

Realizado junto à equipe do Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS, levantamento sobre os resultados obtidos pelos fabricantes para os testes de potência, através de consulta ao protocolo resumido de produção e controle. Esses dados foram utilizados para analisar criticamente a consistência de produção das vacinas atenuada contra Rotavírus e ainda, para comparar com os valores obtidos dos testes de potência realizados no INCQS.

Foram transferidos para planilhas de Microsoft Excel®, para posteriormente ser representado através de gráficos com o uso do Programa SPC Explorer RT.

3.1.2 Confeção de gráfico de controle

Os gráficos foram realizados utilizando os seguintes dados:

- Valores de potência fornecidos pelo fabricante no protocolo resumido de controle e produção;
- Valores de potência obtidos nos testes realizados no INCQS;
- Diferença absoluta dos valores fornecidos pelo fabricante e os obtidos pelo INCQS.

A partir da coleta dos dados, os gráficos foram confeccionados como definido no PU 3400.011 (INCQS, 2008).

Os eixos dos gráficos foram formados pelo tempo (abscissa) e pelo resultado do teste de potência (ordenada). As linhas centrais dos gráficos (PCL) consistiram da média, dos limites superiores e inferiores, calculados a partir da média adicionada de 2 desvios-padrão (DP) e média mais 3 DP.

Duas linhas paralelas a PCL, respectivamente, acima e abaixo desta, são traçadas correspondendo aos limites superiores de controle (UCL) e o limite inferior de controle (LCL). Os limites inferiores foram calculado a partir da média subtraída de 2 DP e 3 DP. As médias, os desvios- padrão e, conseqüentemente os limites foram calculados com os 20 primeiros valores mensurados a cada ano. Os limites de 2 DP são considerados limites de alerta e os de 3 DP, limites de rejeição do ensaio. Limites de controle (0, 999=3 DP) e de alerta (0, 975= 2 DP) para a média e o desvio-padrão (amplitude) são definidos estatisticamente pela probabilidade de um ponto encontrar-se dentro dos limites quando o processo é controlado.

3.1.3 Limite de Confiança preconizado pelo ICH

O limite de confiança superior foi calculado a partir da soma de $0,5 \log_{10}$ na média e o limite de confiança inferior a partir da subtração de $0,5 \log_{10}$ na média.

3.1.4 Confecção do Coeficiente de Variação

É uma medida relativa de dispersão, para comparação em termos relativos do grau de concentração em torno da média.

Para cada ano foi avaliado o CV% geométrico utilizando planilhas do Microsoft Excel. O cálculo é feito a partir da seguinte fórmula:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \cdot 100$$

3.1.5

M

média das diferenças

Após calcular a diferença entre valores do produtor e do INCQS, calcula-se a média das diferenças.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

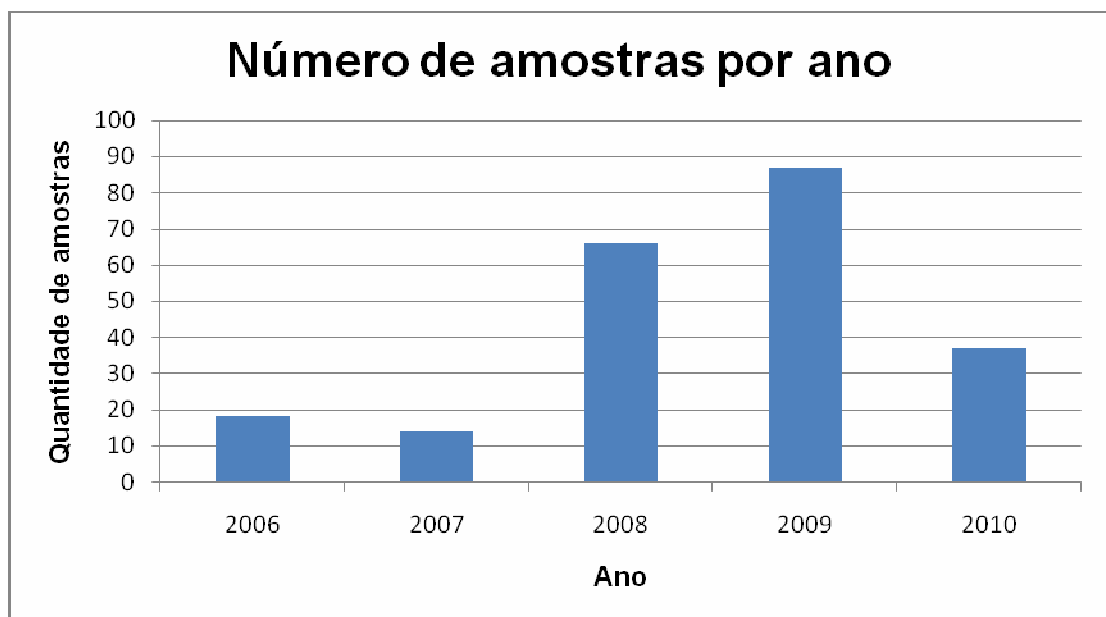
4.1 TOTAL DE LOTES DE VACINA ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS

Conforme observado na figura 6, no período compreendido entre o mês de janeiro de 2006 e dezembro de 2010, ingressaram no INCQS 222 lotes de vacina atenuada contra Rotavírus. Pode-se observar que existe uma variação no número de lotes, enquanto 87 lotes foram analisados no ano de 2009, observa-se que apenas 18 lotes ingressaram em 2006 e 14 lotes no ano de 2007.

Neste sentido, é importante ressaltar que nos anos de 2006 e 2007, o teste de potência da vacina atenuada contra Rotavírus, estava sendo implementado e aperfeiçoado pelo INCQS. Ressaltamos ainda que a vacinação foi incluída no calendário do PNI, em 2006.

Esta variação no quantitativo dos lotes por ano pode ser explicada por fatores como: o tamanho do lote (que depende da capacidade de produção de cada fabricante), e pelas estratégias políticas relacionadas a ações preventivas pelo Ministério da Saúde.

Figura 6- Gráfico dos lotes de vacina atenuada contra Rotavírus analisados por ano no INCQS.



4.2 AVALIAÇÃO DA CONSISTÊNCIA DE PRODUÇÃO DA VACINA ATENUADA CONTRA ROTAVÍRUS ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE CONTROLE

Foram adotadas duas abordagens para a análise dos dados dos testes de potência da vacina atenuada contra Rotavírus: gráficos de controle, e a abordagem preconizada pelo ICH, onde o limite de 95% de confiança não deve ser maior que $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável, como preconizado para titulação de suspensões virais (ICH Q5A, 1999).

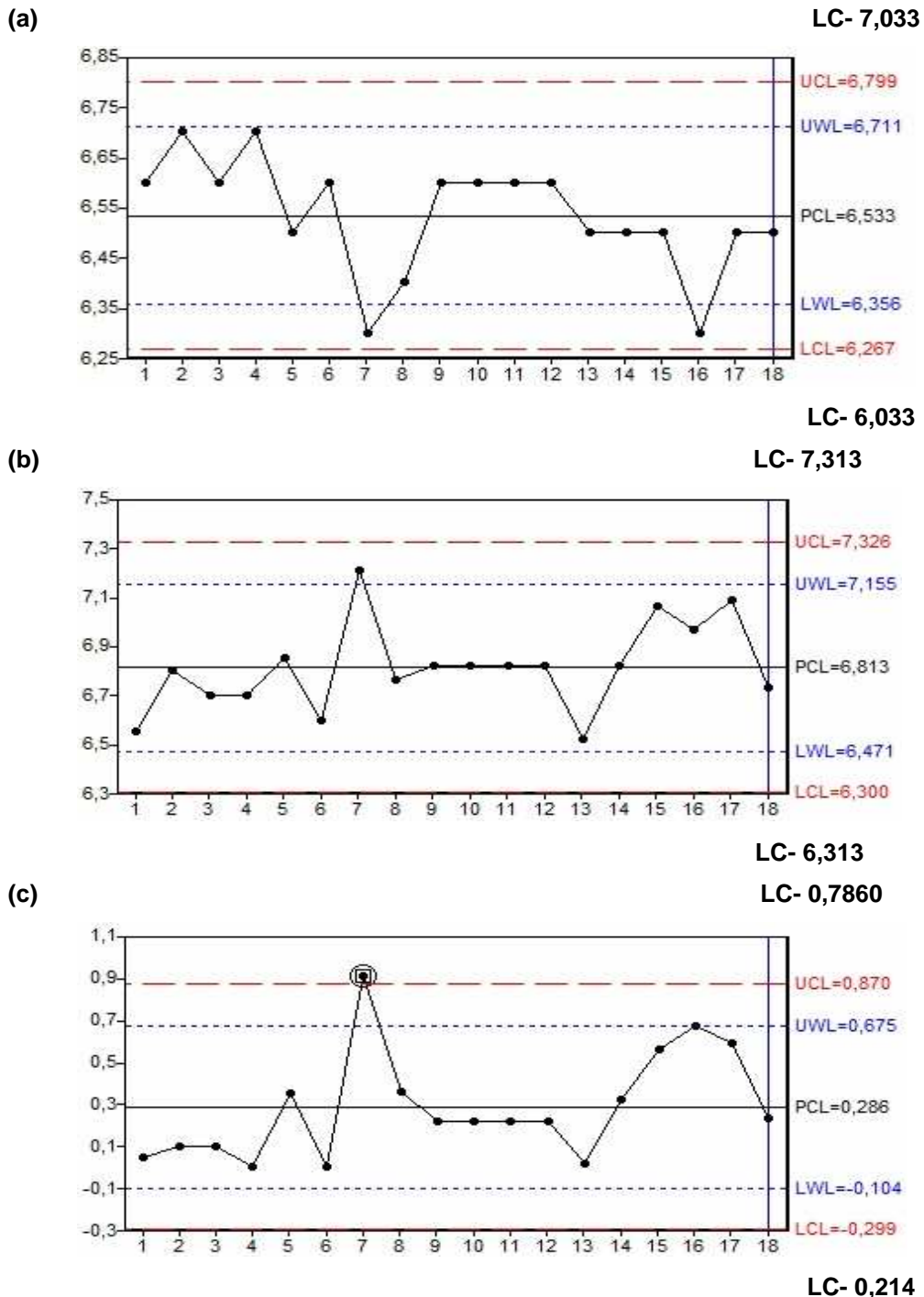
4.2.1 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2006

Todos os 18 lotes analisados pelo produtor encontraram-se dentro dos limites de controle (figura 7 a). Nenhum valor ultrapassou o limite de confiança de 95% preconizado pelo ICH, para $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável.

A figura 7 b, mostra os valores de potência obtidos pelo INCQS para os mesmos lotes da figura 7 a, demonstrando que nenhum lote encontra-se fora dos limites de controle. Assim como na figura 7 a nenhum valor ultrapassou o limite de confiança de 95% preconizado pelo ICH, para $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável.

Na figura 7 c, constam as diferenças absolutas para os valores de potência do laboratório de controle do produtor e do INCQS. Foi observado um valor fora do limite superior de controle. Este valor ultrapassou o limite de confiança de 95% preconizado pelo ICH.

Figura 7: Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2006



UCL- Limite superior de controle; UWL- Limite superior de alerta; LWL- Limite inferior de alerta; LCL- Limite inferior de controle; LC-Limite de confiança.

4.2.2 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2007

Em 2007, foram analisados apenas 14 lotes de vacina contra Rotavírus. Todos os lotes encontraram-se dentro dos limites de controle, no gráfico que representa os valores fornecidos pelo produtor (figura 8 a).

Na Figura 8 b, 7 valores encontram-se além do limite superior de controle, e 6 lotes fora do limite inferior de controle.

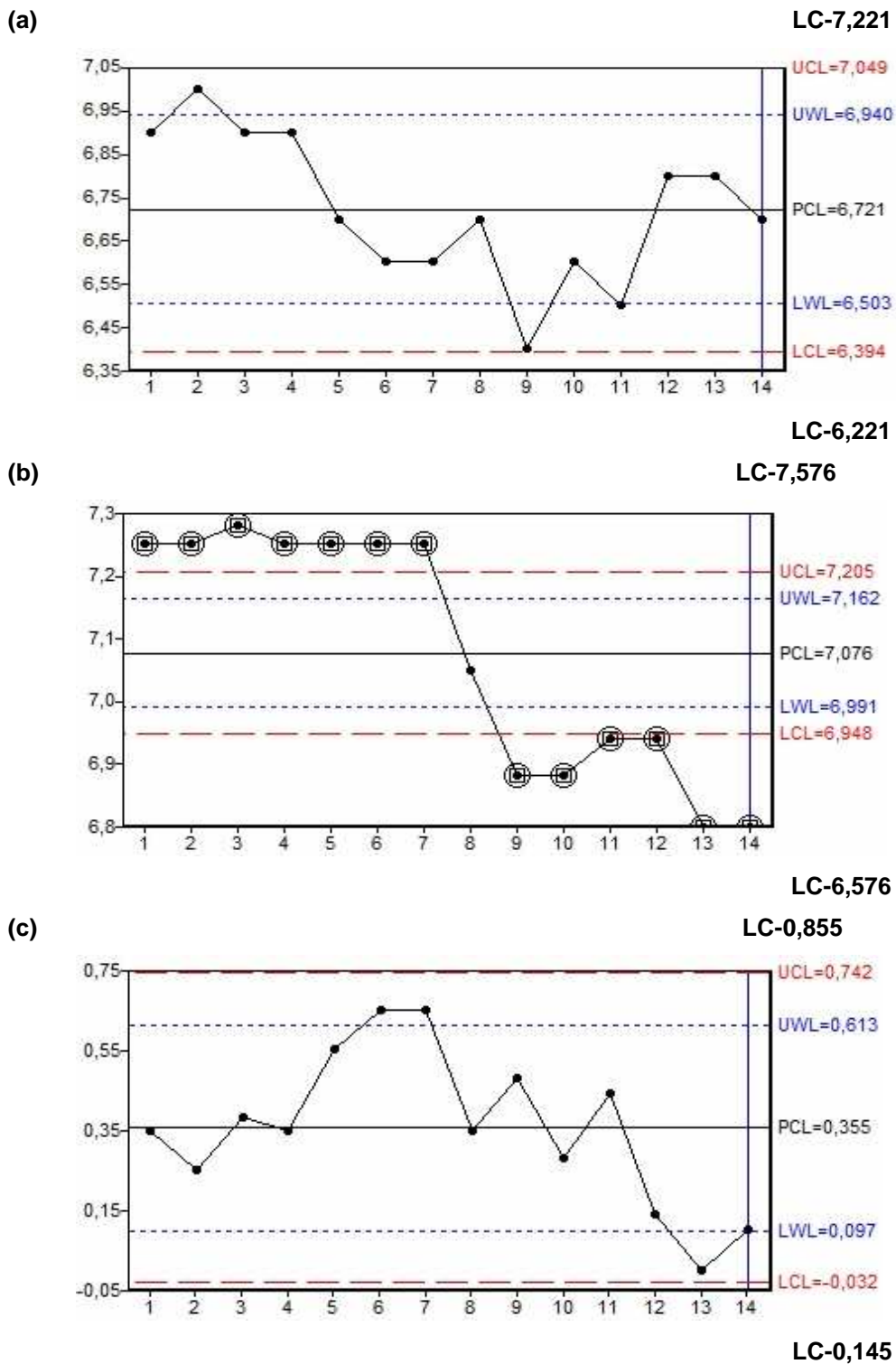
No limite de confiança de 95% preconizado pelo ICH, para $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável apenas 6 valores encontram-se fora deste limite.

Na Figura 8 c, que representa as diferenças absolutas para os valores de potência do produtor e do INCQS, foi observado que todos os valores encontram-se dentro dos limites de controle.

Foi possível observar um número significativo de valores do teste de potência do INCQS fora dos limites de controle. Alguns fatores como: mudança no Bulk, na produção da vacina ou algumas alterações no comportamento das células usadas nos testes, podem ter ocasionado a distribuição bimodal (onde o gráfico apresenta 2 médias), ou distribuição não normal na curva do gráfico na figura 8.

No entanto todos os lotes da vacinas atenuada contra Rotavírus avaliados neste ano foram aprovados.

Figura 8: Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2007



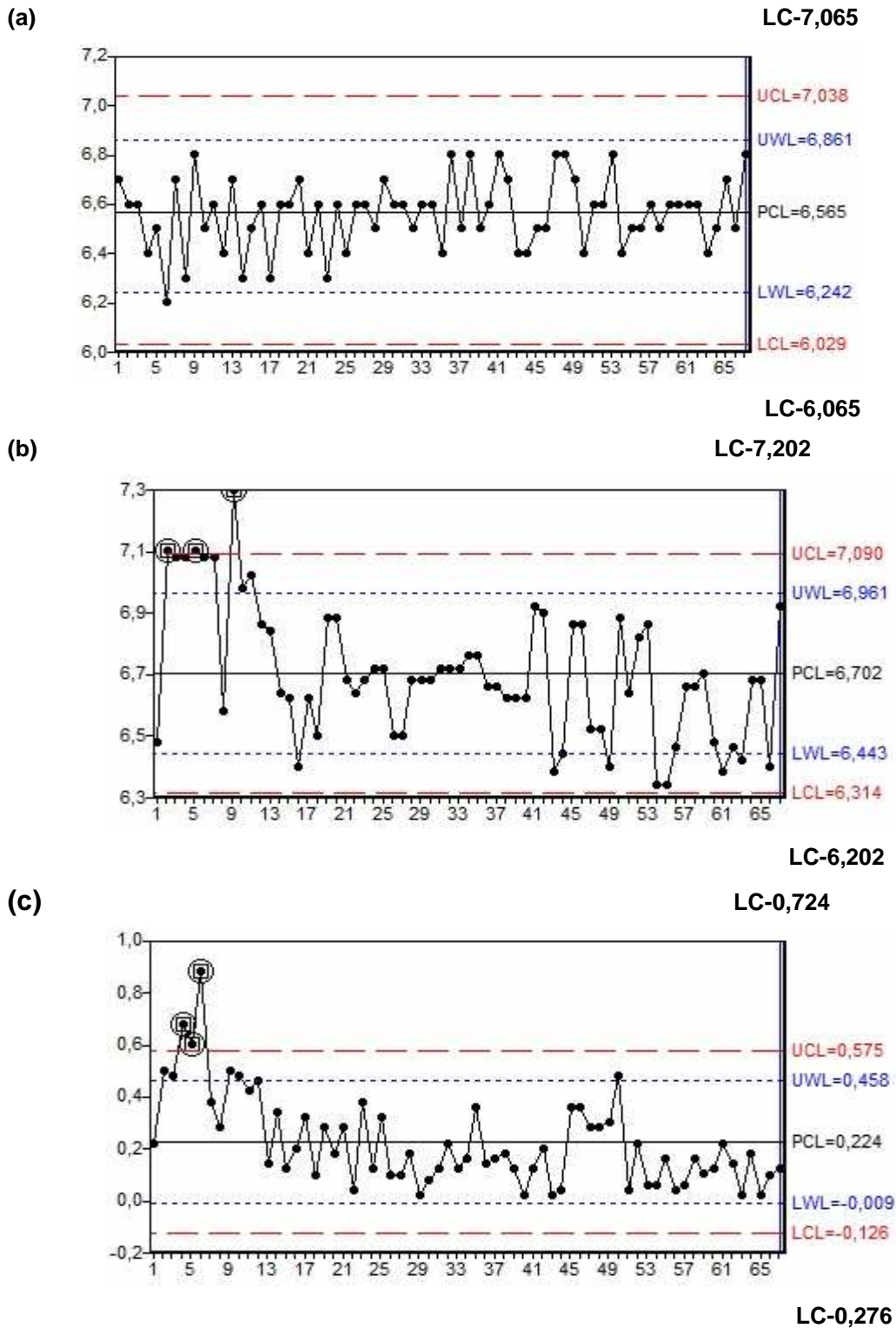
UCL- Limite superior de controle; UWL- Limite superior de alerta; LWL- Limite inferior de alerta; LCL- Limite inferior de controle; LC- Limite de confiança.

4.2.3 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2008

No ano de 2008, foram analisados 66 lotes. Todos apresentaram valores de potência dentro dos limites de controle. A Figura 9 a representa os valores fornecidos pelo produtor, diferentemente dos valores encontrados para as figuras 9 b e 9 c, onde 3 valores estavam acima da UCL.

Já no limite de confiança de 95% preconizado pelo ICH, para $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável, nas figuras 9 a, 9 b e 9 c, não foram encontrados valores acima ou abaixo deste limite estabelecido.

Figura 9: Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2008



UCL- Limite superior de controle; UWL- Limite superior de alerta; LWL- Limite inferior de alerta; LCL- Limite inferior de controle; LC- Limite de confiança.

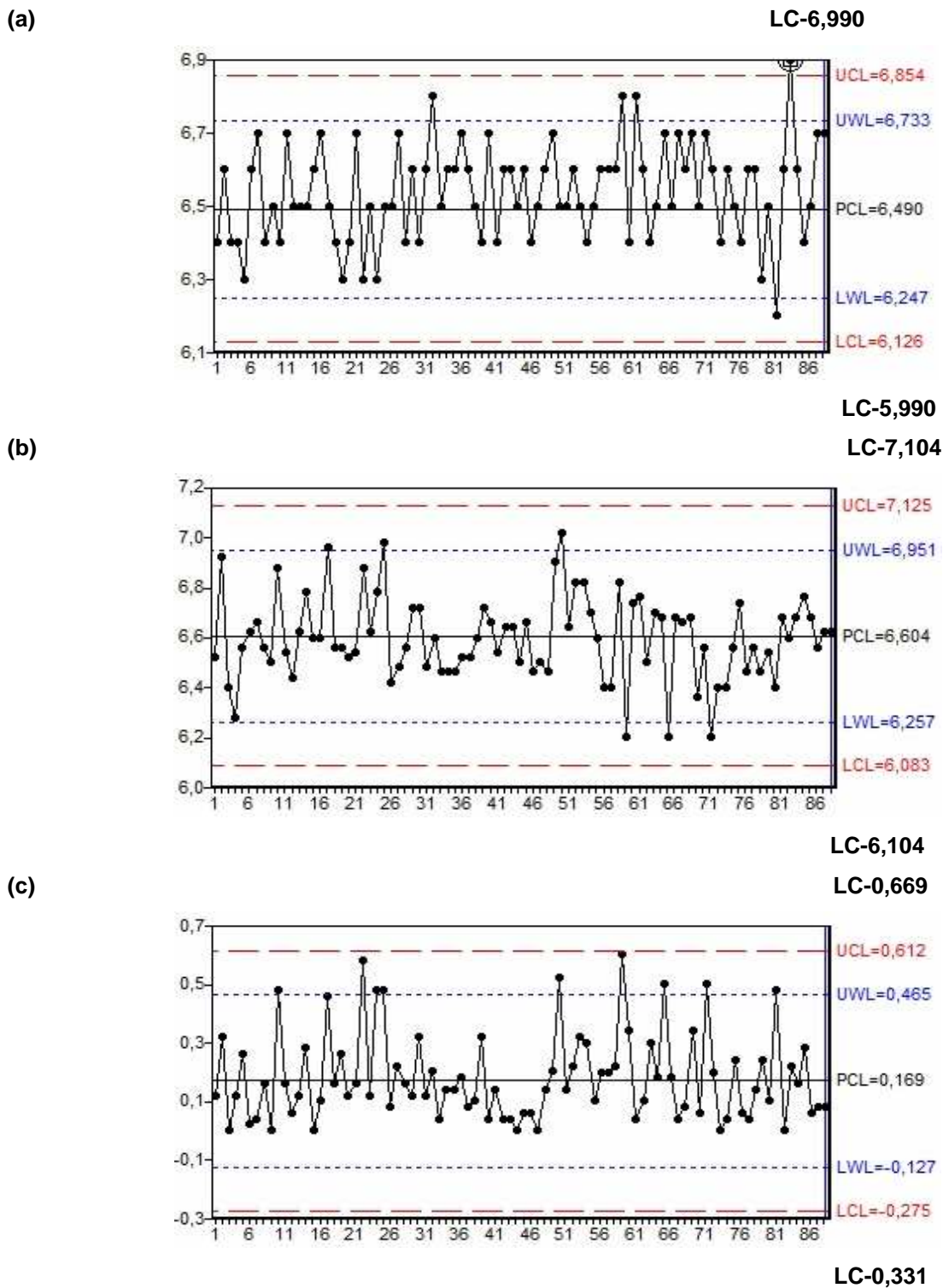
4.2.4 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2009

No ano de 2009, somente 1 entre os 87 valores fornecidos pelo produtor encontra-se acima do limite superior de controle figura 10 a.

No gráfico dos valores encontrados pelo INCQS na figura 10 b, e no gráfico que representa os valores de diferença absoluta entre os valores fornecidos pelo produtor e pelo INCQS (figura 10 c), nenhum dos valores encontrava-se fora dos limites de controle.

Já para o limite de confiança de 95% preconizado pelo ICH, de $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável, nas figuras 10 a, 10 b e 10 c, assim como no ano anterior, não foram encontrados valores acima ou abaixo do limite estabelecido.

Figura 10: Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2009



UCL- Limite superior de controle; UWL- Limite superior de alerta; LWL- Limite inferior de alerta; LCL- Limite inferior de controle; LC-Limite de confiança.

4.2.5 Avaliação da consistência de produção da vacina atenuada contra Rotavírus no ano de 2010

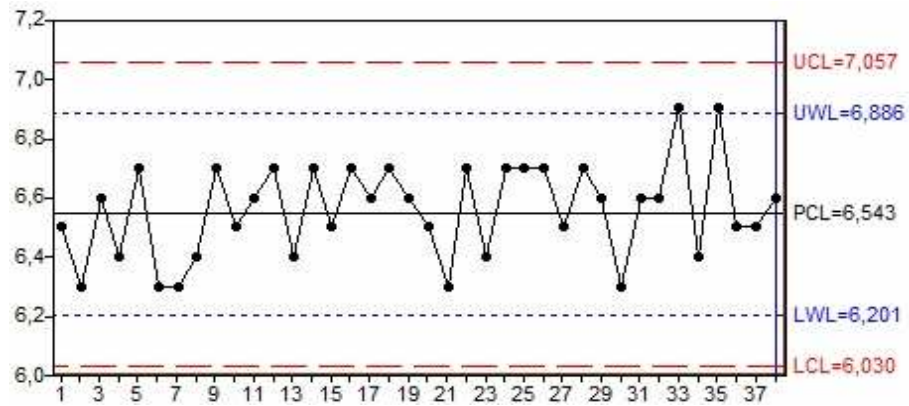
Em 2010, foram analisados 37 lotes de vacina contra Rotavírus, na figura 11 a, que representa os valores fornecidos pelo produtor, todos os valores estão dentro dos limites de controle, assim como no gráfico do INCQS (figura 11 b), e no gráfico (figura 11 c) que representa a diferença absoluta dos valores do produtor e do INCQS.

Como observado nos anos de 2008 e 2009, nenhum dos valores das figuras 11 a, 11 b e 11 c, estão fora do limite de confiança de 95% preconizado pelo ICH, para $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável.

Figura 11: Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e a diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2010

(a)

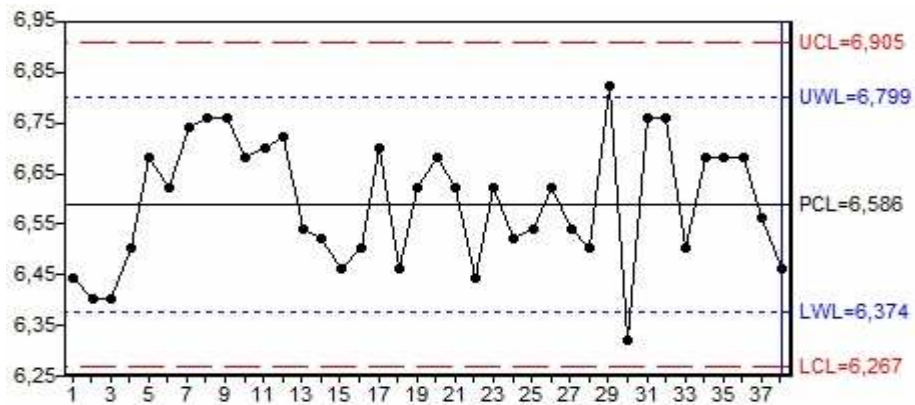
LC-7,043



(b)

LC-6,043

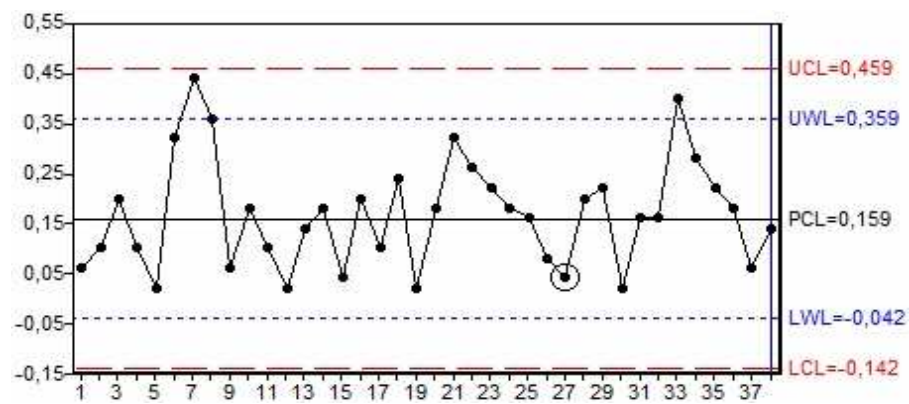
LC-7,086



(c)

LC-6,086

LC-0,659



LC-0,341

UCL- Limite superior de controle; UWL- Limite superior de alerta; LWL- Limite inferior de alerta; LCL- Limite inferior de controle; LC-Limite de confiança.

4.2.6 Diferença interlaboratorial (Coeficiente de Variação)

Através da tabela na figura 12 podemos observar que Coeficiente de variação (CV%) interlaboratorial esta de acordo com o que a OMS preconiza, onde ensaios biológicos realizados com linhagens celulares podem apresentar uma variação superior a 50% (WHO/ VSQ/97.02).

Figura 12: Tabela demonstrando o coeficiente de variação interlaboratorial e a diferença entre as médias em log.

ANO	CV%	DIF. MEDIA EM LOG
2006	3, 687	0, 261
2007	3, 636	0, 307
2008	2, 890	0, 217
2009	2, 523	0, 181
2010	2,134	0, 167
TODAS AS AMOSTRAS	2,774	0, 204

CV%- Coeficiente de Variação; DIF.MÉDIA EM LOG- Diferença entre as médias de cada laboratório expressas em log.

Na Figura 12 podemos observar que os valores dos limites de variabilidade de cada ano, e de todos os anos juntos, encontram-se dentro do preconizado pela OMS, onde – via de regra- ensaios biológicos apresentam uma variação entre 5 e 20%, e ensaios com linhagem celular- no caso deste estudo- podem apresentar valores superiores a 50% (WHO/ VSQ/97.02).

A média das diferenças dos valores de potência biológica da vacina atenuada contra Rotavírus encontradas no laboratório do produtor e no INCQS, não ultrapassou 0,5 log₁₀. Afirmando que não houve grande variabilidade entre eles.

5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permite concluir que:

A partir de 2008 todos os anos subseqüentes analisados neste estudo como 2009 e 2010 demonstraram testes de potência da vacina atenuada contra Rotavírus realizados pelo produtor e pelo INCQS, sob controle estatístico, e as causas especiais de variação, caso ocorram, estão sendo controladas.

Todos os valores encontram-se dentro dos limites de confiança de 95% preconizado pelo ICH, que devem ser da ordem de $\pm 0,5 \log_{10}$ da estimativa da média aceitável.

Através da análise dos dados deste estudo, podemos concluir que o teste de Potência Biológica da vacina atenuada contra Rotavírus encontra-se sob controle estatístico. Desta forma recomendamos que seja efetuada a inclusão deste teste no sistema de aleatoriedade.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, M. E. et al. Mortalidad por enfermedad diarreica em menores, antes y después de La introducción de La vacuna contra El rotavírus. **Salud Publica**, Mexico, v. 51, n. 4, p. 285-290, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/spm/v51n4/v51n4a04.pdf>>. Acesso em: 07 maio 2011.
- BAYER, A. J; KOZAKEVICIUS, A.J. SPC-Threshold: Uma Proposta de Limiarização para Filtragem Adaptativa de Sinais. **Sociedade Brasileira de Matemática Aplicada e Computacional**, Brasil, v.11, n.2, p.121-132, 2010. Disponível em: <http://www.sbmac.org.br/tema/seletas/docs/v11_2/Bayer_Kozakevicius.pdf>. Acesso em: 20 de set. 2011.
- BERNSTEIN, D. I. RIX4414 (Rotarix™): uma vacina contra o rotavírus humano com vírus vivo atenuado. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 193-195, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jped/v83n3/v83n3a02.pdf>>. Acesso em: 07 maio 2011.
- BERSIMIS, S. et al. Multivariate Statistical Process Control Charts and the Problem of Interpretation: A Short Overview and Some Applications in Industry. **Munich Personal RePEc Archive**, Grécia, n.6397, Dez. 2007. Disponível em: <http://mpa.ub.uni-muenchen.de/6397/1/MPRA_paper_6397.pdf>. Acesso em: 12 set. 2011.
- BRANDÃO, S. M. C. **Avaliação da confiabilidade dos resultados gerados a partir das verificações físicas e químicas do ensaio de dissolução de medicamentos de 1983 a 2008**. 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico Doença Diarreica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano – VORH**. Brasília, 2006. 36 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_rotavirus2.pdf>. Acesso em: 10 maio 2011.
- BRASIL. Sociedade Brasileira de Imunização. **Informe Rotavírus**. Rio de Janeiro, 2006. 8p. Disponível em: <http://sbim.org.br/sbim_info_rotavirus.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **SI-PNI - Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações**. Disponível em: <<http://pni.datasus.gov.br/apresentacao.asp>>. Acesso em: 06 Jun. 2011.

BRINCKS, L. F. Rotavírus: atualização sobre doenças e vacinas. **Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 252-266, 2005. Disponível em: <<http://www.pediatrasiapaulo.usp.br/upload/pdf/1146.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2011.

CARMO, E.H. Doença diarreica por rotavírus: magnitude, introdução da vacina e desafios para a vigilância epidemiológica. **Caderno de Saúde Pública**, Salvador, v.22, n.11, p.2266-2267, Nov. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v22n11/01.pdf>>. Acesso em: 04 maio 2011.

COMITÉ NACIONAL DE INFECTOLOGIA. Gastroenteritis por rotavírus y su prevención. **Arch Argent Pediatr**, Argentina, v. 104, n.6, p. 554-559, 2006. Disponível em: <<http://www.sap.org.ar/docs/profesionales/consensos/v104n6a12.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2011.

GLASS, R.I; BRESEE, J. S. et al. Rotavirus Vaccines: Targeting the Developing World. **The Journal of Infectious Diseases**, American, v. 192, n. 1, p. 160-166, 2005. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/192/Supplement_1/S160.full.pdf+html>. Acesso em: 07 Jun. 2011.

GLASS, R.I. Depois de 30 anos de pesquisa, começam a surgir vacinas para barrar o maior causador de diarreia infantil aguda em todo o mundo, potencialmente letal em países em desenvolvimento. **UOL**, Rio de Janeiro, maio 2006. Disponível em: <http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/combate_ao_rotavirus_imprimir.html>. Acesso em: 06 Jun. 2011.

HENDRIKSEN, C. et al. The consistency approach for the quality of vaccines. **Biologicals**, v. 36, n. 1, p. 73-77, Jan. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE – INCQS
Disponível em: www.incqs.fiocruz.br. Acesso em 17/11/2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 653430040**: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO. Ensaio de Potência, termoestabilidade e identidade da vacina de Rotavírus humano vivo atenuado. Set. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **PU 3400.011**: PROCEDIMENTO DE USO. SPC Explorer- Gráfico de Controle. Out. 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (**ICH**) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, **VIRAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY PRODUCTS DERIVED FROM CELL LINES OF HUMAN OR ANIMAL ORIGIN Q5A (R1)** Appendix3: Statistical Considerations for Assessing Virus Assays, Sep. 1999.

LINHARES, A.C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, n.3, p. 629-646, Set. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v16n3/2949.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2011.

MATTIA, F. et al. The consistency approach for quality control of vaccines-A strategy to improve quality control and implement 3Rs. **Biologicals**, v.39, n.1, p. 59-65, Jan. 2011.

NETTO, E. J. R. **Avaliação do controle da qualidade das vacinas contra febre amarela analisadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde no período de 2000 a 2008**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado Profissional Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

NIETO, G. J. et al. . Impacto de La introducción de La vacuna contra El rotavirus em La hospitalización por gastroenteritis aguda grave em El Hospital Del Niño de La Ciudad de Panamá. **Revista Panam Salud Publica**, Panama, v. 24, n. 3, p. 189-194, 2008. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v24n3/a05v24n3.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2011.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities**: Draft – meeting is going to be held in oct-2010. Authorities. Disponível em: <http://www.who.int/entity/biologicals/BS2128_Lot_Release_CLEAN.pdf>. Acesso em: 21 set.2011.

PARASHAR, D. U. et al. Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, n. 5, p. 565-572, Maio 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2972763/>> . Acesso em: 01 Out. 2011.

PONTE, C. F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **Historia Ciência Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.10, n.2, p. 619-653, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702003000500009>. Acesso em: 03 maio 2011

RÁCZ, M. L; MUNFORD, V; CASTILHO, J. G; RESQUE, H. R. Gastroenterites virais. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. **Microbiologia**. 4ª Ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

RALLABANDI, S. et al. Utility of Quality Control Tools and Statistical Process Control to Improve the Productivity Quality in Industry. **International Journal of Reviews in Computing**, India, p.15-20, 2009. Disponível em: <<http://www.ijric.org/volumes/Vol5/3Vol5.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2011.

SALVADOR, P. T. C. O. et al. A rotavirose e a vacina oral de rotavírus humano no cenário brasileiro brasileiro: revisão integrada da literatura. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 567- 574 2011. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/csc/v16n2/v16n2a20.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2011.

TEMPORÃO, J.G. O Programa Nacional de Imunizações (PNI): origens e desenvolvimento. **Historia Ciência Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.10, n.2,p.601-617, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-59702003000500008&script=sci_arttext> . Acesso em: 03 maio 2011.

VRANJAC, A. Vacina contra rotavírus. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 2, p.355-358, abr. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102006000200026&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 abr. 2011.

WHO. World Health Organization. **Countries Using Rotavirus Vaccine in National Immunization Schedule, 2009**. Database 193. Nov. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/nuvi/rotavirus/Countries_Using_RotaV_Nat_Immunization_Schedule.pdf>. Acesso em: 03 Maio 2011.

WHO. World Health Organization. **Immunization, Vaccines and Biologicals, Rotavírus**. Apr. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/index.html>>. Acesso em: 26 Jun. 2011.

WHO. World Health Organization. **Mortality Rate per 100,000 Child Deaths due to Rotavirus Disease**. Database 193. Sep. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/nuvi/rotavirus/Mortality_Rate_per_100000_Child_Deaths_due_to_RotaV.pdf>. Acesso em: 03 Maio 2011.

WHO. World Health Organization. **WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements**. Part 2: Validation. Global Program for Vaccines and Immunization Vaccine Supply and Quality. Global Network. World Health Organization. Genebra. 1997.

WIKISPECIES. **A simplified diagram of the location of rotavirus structural proteins**. Feb. 2008. Disponível em: <http://species.wikimedia.org/wiki/File:Rotavirus_Structure.png>. Acesso em: 26 Jun. 2011.

WOODAL, W. H. Controversies and Contradictions in Statistical Process Control. **Journal of Quality Technology**, Minnesota, v. 32, n. 4, p. 341-350, Out. 2000. Disponível em: <http://myplace.frontier.com/~stevebrainerd1/STATISTICS/ECE-580-DOE%20WEEK%203_files/Woodall%20paper%20Control%20charts.pdf>. Acesso em: 13 Set. 2011.