

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

Renata Faria de Carvalho

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO COMPONENTE DA HEPATITE B NAS VACINAS
COMBINADAS PENTAVALENTE (DTP/HB/Hib) DE DIFERENTES PRODUTORES**

Rio de Janeiro

2014

Renata Faria de Carvalho

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO COMPONENTE DA HEPATITE B NAS VACINAS
COMBINADAS PENTAVALENTE (DTP/HB/Hib) DE DIFERENTES PRODUTORES**

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

Orientadora: Dra. Kátia Christina Leandro

Colaborador: Dra. Catia Ines Costa

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na Fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Carvalho, Renata Faria de

Avaliação da potência do componente da Hepatite B nas vacinas combinadas pentavalentes (DTP/HB/Hib) de diferentes produtores / Renata Faria de Carvalho. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

78 f, il.

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

Orientadora: Dra. Kátia Christina Leandro. Colaborador: Dra. Catia Ines Costa

1. Vigilância Sanitária. 2. Potência de Vacina. 3. Hepatite B. I. Título

Evaluation the potency of hepatitis B component in pentavalent combined vaccines (DTP/HB/Hib) from different manufacturers

Renata Faria de Carvalho

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO COMPONENTE DA HEPATITE B
NAS VACINAS COMBINADAS PENTAVALENTE (DTP/HB/Hib) DE
DIFERENTES PRODUTORES**

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

Aprovado: 28/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karen Friedrich (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Jose Nelson dos Santos Silva Couceiro (UFRJ)

Profa. Dra. Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza (FIOCRUZ)

Profa. Dra. Kátia Christina Leandro (FIOCRUZ) - Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar ao meu lado, me fornecendo uma enorme força e energia para lutar ultrapassando as dificuldades pessoais e profissionais.

As minhas filhas, Gabriela e Júlia, pelo amor e compreensão nos diversos e longos períodos de ausência necessários para realização deste trabalho.

A minha mãe Edméa pelo amor, dedicação e por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao meu pai Flávio, pelo carinho e incentivo constante nos estudos.

Ao meu marido Ronaldo pelo amor, carinho, paciência e por me incentivar nos momentos de desânimo.

A minha irmã, Flávia, pelo amor incondicional e pelo apoio sempre demonstrado.

A minha orientadora Dra. Catia Ines Costa, pela amizade, carinho e pelos ensinamentos em confiar no futuro e não temer aos obstáculos.

A minha orientadora Dra. Kátia Christina Leandro pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

A minha amiga Simone pelo carinho, incentivo, paciência e companheirismo em todos os momentos, bons e difíceis.

A minha amiga Andréa Lorangeira pela amizade e colaboração na execução deste projeto.

Ao Departamento de Imunologia (INCQS/ FIOCRUZ) pela realização dos ensaios.

A Coordenação de Pós Graduação do INCQS, pela organização do curso de Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária

“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar....
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo ...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

RESUMO

No Brasil a criação do Programa Nacional de Imunizações (PNI), em 1973, deu-se no âmbito do processo de formulação de grandes programas nacionais. A partir de agosto de 2012, o PNI introduziu no calendário básico da criança a vacina combinada pentavalente (DTP/HB/Hib), que reúne em uma só dose a proteção contra cinco doenças (difteria, tétano, pertussis, *Haemophilus influenza* tipo b e hepatite B). A Hepatite B é uma doença causada pela infecção do Vírus da Hepatite B (HBV), um vírus DNA, da família *Hepadnaviridae*. O envoltório externo do HBV contém proteínas antigênicas que constituem o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). A Organização Mundial de Saúde calcula que mais de 240 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo HBV no mundo. O desafio para o desenvolvimento e a introdução das novas vacinas combinadas em grande parte é sobre o potencial de interação antigênica. Com isso, a eficácia e a segurança de cada componente devem ser avaliadas separadamente e na sua forma final através de ensaios de controle da qualidade. Dentre os ensaios preconizados está o teste de potência que é um ensaio para avaliação da eficácia das vacinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a potência do componente da hepatite B nas vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) de diferentes produtores, através da metodologia *in vitro* baseada em ensaio do tipo imunoenzimático – ELISA. Além disso, foram também avaliadas as possíveis interferências dos demais componentes (DTP e Hib) e do adjuvante fosfato de alumínio contidos nas diferentes formulações das vacinas, estudo da estabilidade em situação de estresse a 60°C por 7 dias e comparação do uso dos kits comerciais Murex e Enzygnost. Um total de dezessete amostras de vacinas combinadas pentavalente com o componente HBsAg, de dois diferentes produtores (A e B), mantidas de 2 a 8°C foram selecionadas para esse estudo. A metodologia do ensaio *in vitro* foi estabelecida para avaliação da potência das amostras de vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) dos produtores A e B. Os resultados encontrados mostraram que não há interferência dos antígenos difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* tipo b na avaliação da potência do componente HBsAg. Os lotes de vacina combinada 1622/12 e 3032/12 foram eleitos como referência interna para o produtor A e o produtor B respectivamente. Os kits comerciais selecionados (murex e enzygnost) foram adequados para a proposta do estudo.

ABSTRACT

The Brazilian National Immunization Program (PNI) was created in 1973, during the formulation of the most important national programs in Brazil. Starting on August, 2012, PNI has introduced the Pentavalent Combined Vaccine as part of the children basic calendar, unifying in one dose the protection against five diseases (diphtheria, tetanus, *pertussis*, *Haemophilus influenzae* type b and hepatitis B). Hepatitis B is a disease caused by the infection of Hepatitis B virus (HBV), a DNA virus from *Hepadnaviridae* family. The HBV external involucre contains antigenic proteins that are the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). The World Health Organization calculates that over 240 million people around the world are chronically infected by HBV. The challenge for the development and introduction of the combined vaccines is mostly about the potential of antigenic interaction. Thus, the efficacy and safety of each component must be individually evaluated and in its final form through quality control assays. Among the preconized assays, the potency test is the assay that evaluates the vaccines effectiveness. The purpose of this work is to evaluate the potency of hepatitis B component in pentavalent combined vaccines (DTP/HB/Hib) from different manufacturers through *in vitro* methodology based on enzyme linked immunosorbent assay – ELISA. Moreover, were also evaluated the interference of the other components (DTP and Hib) and the aluminum phosphate adjuvant contained in the different vaccine formulations, stability study in stress situations on 60°C for seven days and the comparison of using commercial kits Murex and Enzygnost. A total of seventeen samples of pentavalent combined vaccine with HBsAg component from two different producers (A and B) kept from 2°C to 8°C were selected for this study. The methodology for the *in vitro* assay was established to evaluate the potency of pentavalent combined vaccine (DTP/HB/Hib) samples from producers A and B. The results showed that there is no interference with diphtheria, tetanus, *pertussis* and *Haemophilus influenzae* type b antigens when evaluating the potency of HBsAg component. The combined vaccines lots 1622/12 and 3032/12 were elected as internal reference to producer A and producer B, respectively. The commercial kits selected (murex and enzygnost) were appropriate for the purpose of this study.

LISTA DE SIGLAS

3Rs – Três Erres

Anti-HBS – anticorpo contra HBsAg

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA – *Bovine serum albumin* - albumina sérica bovina

CDC – *Center for Disease Control*

CHO – *Chinese hamster ovary* - ovário de hamster chinês

DEA – *Diethanolamine* - Dietanolamina

DNA – Ácido desoxirribunucleico

DO – Densidade Ótica

DTP – Vacina contra difteria, tétano e pertussis

DTP- HepB + Hib – vacina contra difteria, tétano, pertussis e meningite causada pela (*Haemophilus influenzae* do tipo b) e hepatite B

DTP- HepB - vacina contra difteria , tétano , pertussis e hepatite B

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – ensaio imunoenzimático

HBsAg – *Hepatitis B surface antigen* – antígeno de superfície do HBV

HBV - *Hepatitis B virus* – vírus da Hepatite B

HepB-Hib – vacina contra hepatite B combinada com a vacina contra meningite causada pela *Haemophilus influenzae* do tipo b

Hib - *Haemophilus influenzae* do tipo b

HRP – *horse -radish peroxidase* – enzima peroxidase

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IPV – vacina da poliomielite inativada

Lf – Limite de floculação

MS – Ministério da Saúde

ARN - Agência Reguladora Nacional

OMS – Organização Mundial de Saúde

OU_p – Unidade opacimétricas

PBS – *Phosphate Buffered Saline* - Salina tamponada com fosfato

PNI – Programa Nacional de Imunização

TMB - 3,3',5,5' - Tetrametilbenzidina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura representativa da partícula do HBV. Genoma DNA, Polimerase e as proteínas do HBsAg: pequena (S), média (S + Pré-S2) e grande (S + Pré-S2 + Pré-S1).....	21
Figura 2: Distribuição Mundial HBsAg. Mapa mostrando em vermelho a alta prevalência de infecção crônica pelo vírus da hepatite B, em azul intermediária e em verde baixa prevalência de Hepatite B no mundo.	23
Figura 3: Taxa de incidência de casos hepatite B (por 100.000 habitantes) segundo região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2011	24
Figura 4: Representação esquemática do ensaio ELISA tipo sanduíche	31
Figura 5: Resultados de potência do componente HBsAg nas vacinas combinadas pentavalente do produtor A, pelo método <i>in vitro</i>	44
Figura 6: Resultados de potência do componente HBsAg após a dissociação do adjuvante utilizando a solução DEA para o produtor A.....	45
Figura 7: Resultados de potência do componente HBsAg após a dissociação do adjuvante usando a solução Citrato de sódio a 20%, para amostras do produtor A.....	46
Figura 8A: Resultados de potência do componente HBsAg para eleição do lote de vacina de referência interna do produtor A	47
Figura 8B: Avaliação da repetitividade do resultado de potência da vacina de referência interna (lote 1622/12) para o produtor A.....	48
Figura 9A: Resultados de potência do componente HBsAg para eleição do lote de vacina de referência interna para amostras do produtor B	50
Figura 9B: Repetitividade do resultado de potência da vacina de referência interna (lote 3032/12), para o produtor B.....	51
Figura 10: Resultado de potência do componente HBsAg do lote de vacina de referência interna (lote 1622/12), do produtor A utilizando o Kit Enzygnost.....	53
Figura 11: Resultado da potência do componente HBsAg do lote de vacina de referência eleito (3032/12) do produtor B utilizando o Kit Enzygnost	55
Figura 12: Correlação dos resultados obtidos pelas metodologias <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> utilizando as amostras de vacinas combinadas do produtor A.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados comparativos de potência das vacinas sem dissociação do adjuvante e com dissociação do adjuvante com as diferentes soluções para as amostras do produtor A	47
Tabela 2: Resultados de densidades ótica de amostras sem e com o componente HBsAg.	49
Tabela 3: Avaliação de potências dos componentes HBsAg nos diferentes lotes de vacina combinada pentavalente do produtor A	49
Tabela 4: Resultados de potência do componente HBsAg na vacina combinada do produtor B.....	52
Tabela 5: Resultados de potência do componente HBsAg na vacina combinada pentavalente do produtor A	54
Tabela 6: Resultados de potência do componente HBsAg nas vacinas combinadas do produtor B com o uso do Kit Enzygnost	56
Tabela 7: Resultados de potência das amostras de vacina combinada dos produtores A e B mantidas a 4°C e submetidas a 60°C por 7 dias	57
Tabela 8: Teste t-Student pareado para comparação dos resultados de potência encontrados nos Kits Murex e Enzygnost	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais acontecimentos relacionados à vacinação contra a hepatite B no Brasil.	25
Quadro 2: Calendário básico da criança.....	27
Quadro 3: Composição e apresentação das vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib)	28
Quadro 4A: Diluição das amostras de vacina pentavalente	42
Quadro 4B: Diluição do lote de vacina eleita como referência interna (1622/12)	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Programa Nacional de Imunizações: 40 anos da Saúde Pública Brasileira	16
1.2	Vacinas combinadas	17
1.2.1	Difteria.....	18
1.2.2	Tétano	19
1.2.3	Pertussis.....	20
1.2.4	Meningite, otite, pneumonia, epiglote - <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b – Hib	20
1.2.5	Hepatite B.....	21
1.2.5.1	Epidemiologia da hepatite B	22
1.2.6	Vacinação contra a hepatite B	24
1.2.7	Características das vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib).....	26
1.2.7.1	Composição e apresentação das vacinas combinadas pentavalente com o componente da hepatite B (DTP/HB/Hib)	27
1.3	Controle da qualidade de vacinas	28
1.3.1	Avaliação da potência para o componente da hepatite B	29
1.3.2	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> – ELISA.....	30
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	Amostras de vacinas selecionadas para o estudo	34
4.1.1	Avaliação da potência pelo método <i>in vitro</i>	34
4.1.2	Avaliação da potência pelo método <i>in vivo</i>	34
4.1.3	Estudo de estabilidade (estresse 60 °C por 7 dias)	34
4.1.4	Vacina monovalente usada para eleição do lote de vacina de referência interna para as amostras dos produtores A e B.....	34
4.1.5	Avaliação da interferência dos componentes difteria, tétano, pertussis e <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b na potência do componente HBsAg	35
4.2	Kits comerciais utilizados na avaliação da potência pela metodologia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	35

4.2.1	Metodologia <i>in vitro</i>	35
4.2.2	Metodologia <i>in vivo</i>	36
4.3	Padronização da potência do componente da hepatite B (HBsAg) pela metodologia <i>in vitro</i>	36
4.3.1	Avaliação da interferência do adjuvante fosfato de alumínio na avaliação da potência	36
4.3.1.1	Pré-tratamento das amostras para dissociação do adjuvante fosfato de alumínio.....	37
4.3.1.2	Diluição das amostras de vacinas após dissociação do adjuvante fosfato de alumínio.....	37
4.3.2	Diluições das amostras de vacinas sem dissociação do adjuvante fosfato de alumínio.....	38
4.4	Eleição dos lotes de referência interna das vacinas pentavalente dos produtores A e B.....	38
4.4.1	Diluições utilizadas após eleição dos lotes de referência interna para os produtores A e B.....	39
4.5	Metodologia do kit comercial Murex HBsAg versão 3 – Laboratório ABBOTT, para detecção do componente HBsAg da vacina pentavalente	40
4.6	Metodologia do kit comercial Enzygnost HBsAg – Laboratório DADE BHERING para detecção do componente HBsAg da vacina pentavalente	40
4.7	Metodologia <i>in vivo</i> , para avaliação de potência para as amostras de vacinas pentavalente dos produtores A e B.....	41
4.7.1	Inoculação da vacina em animais.....	42
4.7.2	Metodologia do kit comercial Enzygnost Anti-HBs II usado nas avaliações dos soros dos camundongos inoculados com as amostras de vacinas pentavalente	43
4.8	Avaliação estatística dos resultados obtidos com as metodologias <i>in vitro</i>	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Avaliação da potência do componente HBsAg nas vacinas pentavalente pela metodologia <i>in vitro</i> usando o KIT MUREX.....	44
5.1.1	Amostras de lotes de vacina sem a dissociação do adjuvante – Produtor A.....	44
5.1.2	Dissociação do adjuvante fosfato de alumínio utilizando solução DEA.....	45
5.1.3	Dissociação do adjuvante fosfato de alumínio utilizando solução Citrato de Sódio a 20% das amostras de vacinas combinadas pentavalente do produtor A	45

5.1.4	Resultados comparativos das vacinas sem a dissociação do adjuvante e com dissociação do adjuvante utilizando as soluções DEA e Citrato de Sódio nas amostras de vacinas do produtor A	46
5.1.5	Eleição do lote de vacina de referência interna para amostras do PRODUTOR A	47
5.1.6	Avaliação da potência da vacina combinada tetravalente DTP + Hib sem o componente da hepatite B e da vacina pentavalente DTP-HepB + Hib com o componente da hepatite B	48
5.1.7	Potência dos lotes de vacina do PRODUTOR A após o estabelecimento do protocolo final	49
5.1.8	Eleição do lote de vacina de referência interna para amostras do PRODUTOR B	50
5.1.9	Potência do componente HBsAg na vacina combinada pentavalente do PRODUTOR B	51
5.2	Resultados de potências dos componentes HBsAg nas vacinas pentavalente dos produtores A e B pela metodologia <i>in vitro</i> usando, KIT ENZYGNOST	52
5.2.1	Lote de vacina de referência interna do PRODUTOR A – repetitividade	52
5.2.2	Potência dos lotes de vacina do PRODUTOR A após o estabelecimento do protocolo final usando o Kit Enzygnost	53
5.2.3	Lote de vacina de referência interna do PRODUTOR B, com o Kit Enzygnost – repetitividade	54
5.2.4	Potência dos diferentes lotes de vacina combinada pentavalente do PRODUTOR B	55
5.3	Estudo da estabilidade das amostras de vacinas combinadas mantidas a 4°C e submetidas a 60°C por 7 dias	56
5.4	Correlação dos resultados obtidos através das metodologias <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com as amostras de vacinas combinadas pentavalente do produtor A	57
5.5	Estatística comparativa dos resultados das amostras dos produtores A e B de vacinas combinadas pentavalente utilizando os Kits Murex e Enzygnost, pelo teste t-Student pareado	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	66
8	PERSPECTIVAS.....	67

REFERÊNCIAS	68
--------------------------	-----------

ANEXO 1 – Padronização dos protocolos para avaliação da potência do componente da hepatite B nas vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) de diferentes produtores	75
---	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1 Programa Nacional de Imunizações: 40 anos da Saúde Pública Brasileira

A criação do Programa Nacional de Imunizações-PNI, em 1973, deu-se no âmbito do processo de formulação organizacional da política nacional de vacinação da população brasileira (TEMPORÃO, 2003).

Ao longo de quatro décadas, o PNI consolidou-se como o coordenador de uma relevante intervenção de Saúde Pública de caráter universal, a vacinação, contribuindo sobremaneira para a redução da morbidade e mortalidade por doenças transmissíveis no Brasil. Após a criação do PNI, é que foram desenvolvidas ações planejadas e sistematizadas para o controle ou erradicação das doenças infecto-contagiosas e imunopreveníveis, mediante a imunização através da vacinação periódica da população com o uso de vacinas monovalentes e combinadas. O PNI é, ao mesmo tempo, herdeiro de experiências exitosas da Saúde Pública brasileira e protagonista de um novo momento, no qual a complexidade do quadro epidemiológico e o desenvolvimento de novas vacinas passaram a exigir uma mais adequada e inédita maneira de organização das ações de vacinação (BRASIL, 2003).

Essa nova organização é fundamental para assegurar a uniformidade do calendário vacinal, a introdução sustentável de novas vacinas, padronização técnica, e a adoção de estratégias inovadoras como a combinação de vacinação de rotina com campanhas de vacinação, que tiveram um papel essencial na eliminação da poliomielite e do sarampo, alcançadas no período de existência do PNI. O PNI tem se modernizado continuamente, tanto para ofertar novos imunobiológicos custo-efetivos como para implementar e fortalecer novos mecanismos e estratégias que garantam e ampliem o acesso da população às vacinas preconizadas, especialmente dos grupos mais vulneráveis. Atualmente, o PNI disponibiliza 43 produtos, entre vacinas, soros e imunoglobulinas. A existência do PNI possibilitou a manutenção da aquisição centralizada de vacinas, uma medida que constitui instrumento importante para a promoção da equidade, possibilitando que os municípios com menor estrutura cumpram exatamente o mesmo calendário vacinal que os municípios estruturados. Ao completar 40 anos, o PNI comemora uma história de conquistas e reafirma seu compromisso de resposta, cada vez mais qualificada, aos novos desafios na área das doenças (JUNIOR, 2013).

A política de utilização das vantagens econômicas decorrentes do mecanismo de compra centralizada, combinada com o esforço pelo desenvolvimento tecnológico da

produção nacional, tem possibilitado a rápida incorporação de novas vacinas, como aconteceu, recentemente, com a vacina oral para rotavírus humano (2006), a vacina pneumocócica 10 valente (2010), a vacina meningocócica C (conjugada) (2010), vacina para *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada) (2012) – e a vacina contra a poliomielite inativada (2012) e as vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) – vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis, hepatite B (recombinante). A vacina pentavalente também é distribuída pelo Programa Nacional de Imunizações para a vacinação dos povos indígenas.

1.2 Vacinas combinadas

As vacinas combinadas destinam-se a proteger contra duas ou mais doenças ou contra uma doença causada por diferentes cepas do mesmo organismo. Portanto, as vacinas combinadas apresentam dois ou mais organismos vivos, organismos inativados ou antígenos purificados, combinados pelo produtor ou misturados imediatamente antes da administração pelo aplicador (OMS, 2012b).

O desafio para o desenvolvimento e a introdução das vacinas combinadas em grande parte deve-se ao potencial de interação antigênica, o que poderia reduzir a imunogenicidade e/ou a eficácia em comparação com vacinas de menor complexidade de combinações e vacinas monovalentes. No entanto, o comprovado sucesso do uso de vacinas que possuem muitos antígenos em uma única injeção torna provável que os desafios de interferência sejam superados e que as vacinas com combinações mais complexas se tornem mais frequentes (ANDRE, et al., 2008, ARISTEGUI, et al., 2003, DECKER, 2001, DECKER et al., 2008).

Dentre as vantagens dessas vacinas encontram-se a possibilidade de redução do custo do processo e de aumento da adesão da população através da redução no número de injeções necessárias e da dor experimentada por crianças e jovens adolescentes, além da diminuição do número de idas aos serviços de saúde (EDWARDS, 1994, PICHICHERO, 2000). Desse modo, menos vacinas serão necessárias para se proteger contra mais doenças, aumentando assim a aceitação dos programas de imunização, para o público em geral e médicos. Esses fatores impulsionarão a eficácia e o sucesso dos programas de imunização, aumentando a cobertura vacinal (EMA, 1998).

As vacinas combinadas passam por extensos testes antes da aprovação por Agências Reguladoras Nacionais (ARNs), para assegurar que os produtos são seguros, eficazes e de qualidade aceitável (OMS, 2014d).

A inclusão de novos antígenos a uma vacina combinada, já existente, garante início de alta cobertura de imunização, através do aumento da adesão da população (ANDRE, et al., 2008, ARISTEGUI, et al., 2003, DECKER, 2001). No entanto, é importante garantir que a segurança, imunogenicidade e eficácia da administração combinada de vários antígenos se comparem favoravelmente com a administração das vacinas monovalentes (EDWARDS, 1994, PICHICHERO, 2000, OBARO, 2003).

Como exemplo o uso do adjuvante, sua concentração e pureza precisam demonstrar compatibilidade com os componentes da vacina combinada e deverá ser aprovado pela ARN. A concentração de alumínio é geralmente superior nas vacinas combinadas do que em vacinas monovalentes, devido algum componente da vacina já ser pré-adsorvido em alumínio durante a formulação com os outros componentes, não podendo exceder a 1,25 mg/ dose (OMS, 2012b).

Em vacinas combinadas, a presença de mais de um componente, muitas vezes provoca uma interação, que conduz a uma diminuição ou um aumento de uma resposta aos componentes individuais, em relação ao componente específico quando é administrado sozinho. Tais interações são muitas vezes de natureza imunológica, mas problemas também podem ser causados pelas interações químicas e físicas entre os diferentes componentes da vacina (EMA, 1998).

As desvantagens das vacinas combinadas podem ser o aumento da reatogenicidade através de carga excessiva de endotoxina e toxóide; da imunogenicidade, através da competição antigênica e supressão do epítipo; além da estabilidade com menor validade (EMA, 1998).

A vacina combinada mais recente introduzida pelo PNI que protege de doenças transmitidas por diferentes agentes foi a pentavalente (DTP/HB/Hib). A vacina combinada pentavalente reúne em uma só dose a proteção contra cinco doenças (difteria, tétano, pertussis, *Haemophilus influenza* tipo b e hepatite B).

1.2.1 Difteria

A difteria é uma doença contagiosa, exclusiva de seres humanos, que acontece predominantemente em crianças nas fases pré-escolar e escolar. A difteria trata-se de toxinfecção causada pela exotoxina produzida pelo *Corynebacterium diphtheriae*, um bacilo aeróbico Gram-positivo, pleomórfico, imóvel e não formador de esporos. O período de

incubação costuma ser de um a seis dias, podendo alongar-se. A transmissão ocorre pelo contato direto com a pessoa doente ou com portadores assintomáticos da bactéria, através de gotículas eliminadas pela tosse, pelo espirro e ao falar, ou pelo contato com as lesões cutâneas (MOKROUSOV, 2009).

O número de casos de difteria notificados no Brasil vem decrescendo progressivamente, fundamentalmente em decorrência do aumento da utilização da vacina DTP. Em 1980 foram notificados 4646 casos; em 1990 foram notificados 640 casos. A partir de 2004, o número de casos não ultrapassou 30 por ano. No entanto no ano de 2010 foram confirmados 33 casos da doença em todo o país, esse aumento foi associado à ocorrência de um surto de difteria no Estado do Maranhão. Em 2012 e 2013 não foram confirmados casos da doença (SES-SC, 2013).

1.2.2 Tétano

O tétano é uma doença aguda, não contagiosa, causada pelo *Clostridium tetani*, um bacilo anaeróbio Gram-positivo, encontrado sob a forma de esporo. Os esporos podem ser encontrados em espinhos e pequenos ramos de plantas, pregos, latas enferrujadas e sujas de terra ou areia contaminada, instrumentos de lavoura e agulhas de injeção. Essa bactéria faz parte da microflora intestinal de alguns animais, sendo frequentemente encontrada em áreas contaminadas por fezes, podendo ocorrer também em humanos (CDC, 2000, RHEE et al., 2005). Os sintomas clínicos são causados pela ação de exotoxina (tetanospasmina), liberada pelo bacilo no local da porta de entrada da infecção. A doença pode ser localizada ou generalizada e caracteriza-se por rigidez e espasmos dos músculos esqueléticos (CDC, 2000).

A distribuição epidemiológica permite definir que o tétano é cosmopolita e considerado um das doenças infecciosas de mais alta letalidade. Sua incidência está associada às condições socioeconômicas e à cobertura vacinal da população, sendo um grande problema de saúde pública para muitos países subdesenvolvidos da África, Ásia, Oceania e América Latina (ROPER et al., 2007).

No Brasil, o número de casos de tétano já reduzido em 44%, devido à vacinação de rotina e ao reforço na imunização dos chamados grupos de risco, como agricultores, trabalhadores da construção civil e aposentados (BRASIL, 2012b).

1.2.3 Pertussis

A pertussis, também conhecida por coqueluche, é uma doença infectocontagiosa aguda que compromete o aparelho respiratório (traqueia e brônquios) e se caracteriza por paroxismos de tosse seca. A doença é transmitida pela bactéria *Bordetella pertussis*, que é um bacilo gram-negativo, aeróbio, não esporulado, imóvel e pequeno, provido de cápsula (formas patogênicas) e de fímbrias (BRASIL, 2012c).

A transmissão ocorre pelo contato direto com indivíduos sintomáticos, por meio de secreções do trato respiratório - gotículas de secreção eliminadas por tosse, espirro ou durante a fala. Os primeiros sintomas geralmente aparecem de 7-10 dias após a infecção, e os sinais e sintomas variam com a idade, condição vacinal e tempo decorrido desde a última dose da vacina (SES-SP, 2011).

A coqueluche é uma importante causa de mortalidade infantil em todo o mundo e continua a ser um problema de saúde pública, mesmo em países com alta cobertura vacinal. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2008, cerca de 16 milhões de casos de coqueluche ocorreram em todo o mundo, dos quais 95% em países em desenvolvimento, e cerca de 195000 crianças morreram da doença (OMS, 2014a).

Os números de casos notificados no Brasil até a 32ª semana epidemiológica de 2011 foram 1975 e confirmados 583 casos de coqueluche no país, dos quais 76,3% em crianças menores de um ano, sendo 88,3% dos casos em crianças menores de seis meses.

1.2.4 Meningite, otite, pneumonia, epiglote - *Haemophilus influenzae* tipo b – Hib

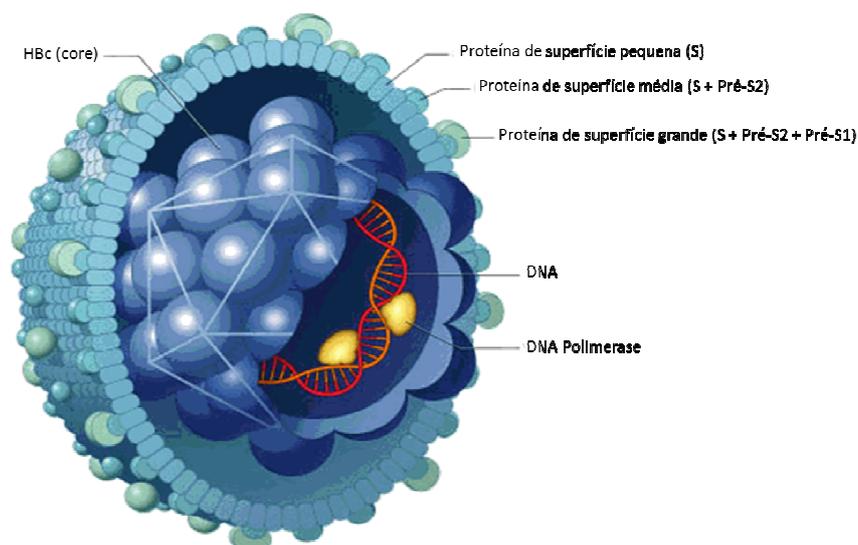
A cepa de *Haemophilus influenzae* tipo b, responsável por doenças graves causadas como meningite, pneumonia, otite (infecção do ouvido), epiglote (pode causar morte por sufocação), pericardite (inflamação da membrana que envolve o coração) e artrite séptica (uma doença que afeta as articulações). Hib era a causa mais comum de meningite bacteriana nas crianças com idades entre os dois meses aos cinco anos. Uma criança em cada 20 com meningite pode morrer e incapacidade séria aos nervos, surdez ocorre em cerca de 15 por cento dos casos (GRANOFF & CATES, 1985). As vacinas conjugadas de polissacarídeos-proteínas fazem parte de uma nova classe de vacinas, planejadas para imunizar crianças contra doenças causadas por bactérias cuja virulência está ligada à presença de cápsula de polissacarídeos extracelulares. Isto inclui a cepa de *Haemophilus influenzae* tipo b. Estes

conjugados foram avaliados em crianças e todos, de maneira efetiva elevaram a resposta dependente da célula T. Desse modo demonstrou-se clinicamente que as vacinas Hib são capazes de induzir imunidade de proteção nos grupos etários mais suscetíveis isto é, crianças nos primeiros dois anos de vida (POOLMAN, 1990).

1.2.5 Hepatite B

A Hepatite B é uma doença causada pela infecção do vírus da Hepatite B (HBV), um vírus de DNA, da família *Hepadnaviridae*. As partículas virais infecciosas e não infecciosas de forma esférica e partículas não infecciosas de forma filamentosa produzidas pelo HBV são encontradas no soro de indivíduos infectados. As formas esféricas completas, denominadas de partículas de Dane possuem uma estrutura complexa, composta de um nucleocapsídeo icosaédrico coberto por um envoltório externo e apresentam tamanho de 42 nm (Figura 1). O envoltório externo contém proteínas antigênicas que constituem o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (DANE, et al., 1970). O polipeptídeo HBsAg recombinante tem um peso molecular de 24/ 27 kDa e encontra-se circulante no sangue na forma de partículas incompletas de 22 nm esféricas ou tubulares (JEZEK, et al., 2009).

Figura 1: Figura representativa da partícula do HBV. Genoma DNA, Polimerase e as proteínas do HBsAg: pequena (S), média (S + Pré-S2) e grande (S + Pré-S2 + Pré-S1).



Fonte: www.hepcentro.com.br/images/HBV.gif

O gene HBsAg foi inserido em células de leveduras e de mamíferos, por meio de vetores de expressão adequados. A expressão do antígeno em várias espécies de levedura como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* e a *Pichia pastoris* e células de ovário de hamster chinês (CHO) tem sido usado para a produção de vacinas contra a hepatite B por mais de 20 anos (OMS, 2010).

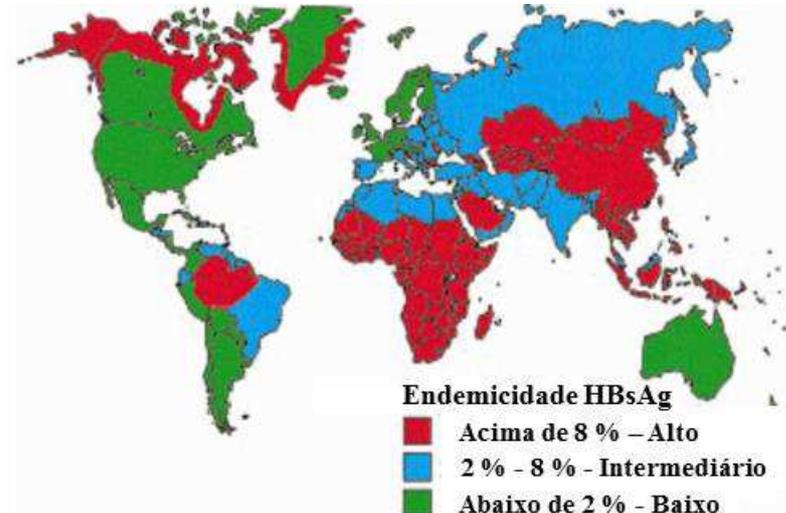
A infecção pelo HBV afeta principalmente o fígado e o período de incubação da hepatite B é de 90 dias (variando de 60-150 dias). Entre as pessoas com idade ≥ 5 anos, 30% a 50% irão desenvolver sinais e sintomas durante a infecção aguda. Em crianças <5 anos e adultos imunocomprometidos, a infecção aguda por HBV é normalmente assintomática. O índice de letalidade geral de hepatite B aguda é de aproximadamente 1%. A hepatite B aguda progride para infecção crônica por HBV em 30% a 90% das pessoas infectadas, como bebês ou crianças pequenas e em $<5\%$ das pessoas infectadas durante a adolescência ou na idade adulta. A infecção crônica pelo HBV pode resultar em doença crônica do fígado, incluindo cirrose e câncer de fígado (CDC, 2013).

1.2.5.1 Epidemiologia da hepatite B

A OMS calcula que mais de 240 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas e em risco de doença grave e morte, principalmente em decorrência da cirrose hepática e do carcinoma. Cerca de 600.000 pessoas morrem todos os anos devido às conseqüências agudas ou crônicas da hepatite B (OMS, 2014b).

A infecção pelo HBV exhibe padrões de alta, média e baixa prevalência distribuída mundialmente (Figura 2).

Figura 2: Distribuição Mundial HBsAg. Mapa mostrando em vermelho a alta prevalência de infecção crônica pelo vírus da hepatite B, em azul intermediária e em verde baixa prevalência de Hepatite B no mundo.



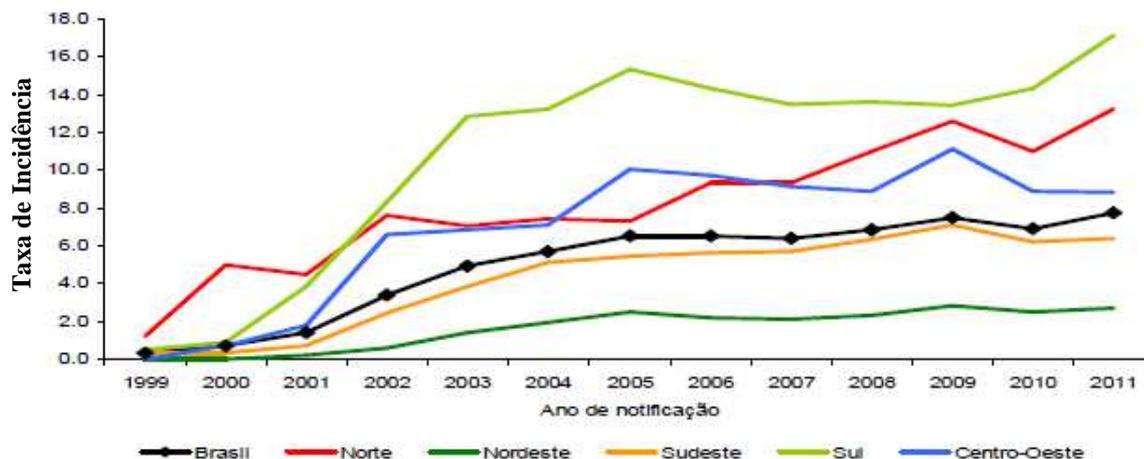
Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2012a

Nas regiões de endemicidade elevada, África, Sudoeste Asiático, Sul da China, Bacia Amazônica, e Alasca, 8 a 20% da população é portadora da infecção e 70 a 90% já tiveram contacto com o vírus. Nas regiões de endemicidade média, Oriente médio e Subcontinente Indiano, 2 a 7% da população é portadora do vírus, enquanto nas regiões de baixa endemia, Europa Ocidental, América do Norte e Austrália, a prevalência de portadores é inferior a 2%. Nas regiões de média e baixa endemicidade a infecção afeta, sobretudo, os adolescentes e adultos jovens (CASTRO, 1999, OMS, 2012a, OMS, 2014b).

No Brasil, a região Nordeste é considerada área de baixa endemicidade, as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste são de endemicidade intermediária, já a região Sul, Amazônia Legal, estado do Espírito Santo e a região Oeste do estado de Santa Catarina são consideradas de alta endemicidade (Figura 3) (BRASIL, 2013).

No período de 1999 a 2011, foram notificados 120.343 casos de hepatite B no Brasil, onde 14.000 casos e 500 mortes são registrados por ano no país (BRASIL, 2013).

Figura 3: Taxa de incidência de casos hepatite B (por 100.000 habitantes) segundo região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2011



Fonte: MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais e IBGE. Casos notificados no Sinan até 31/12/2011 e declarados no SIM de 1999 até 2011. Dados preliminares.

1.2.6 Vacinação contra a hepatite B

As vacinas contra hepatite B são constituídas pelo antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) que, por sua vez, é produzido por dois métodos diferentes: derivados do plasma ou de DNA recombinante (OMS, 2012a).

Em 1981, foi licenciada a primeira vacina contra a hepatite B, que consistiu de HBsAg purificado a partir do plasma de indivíduos com infecção crônica por HBV. Em 1986, foi introduzida a vacina contra hepatite B utilizando-se a tecnologia de DNA recombinante que substituiu a vacina derivada de plasma humano (OMS, 2009).

Datas históricas relacionadas à vacinação da hepatite B utilizando as vacinas monovalentes e em vacinas combinadas com hepatite B, são mostrados no Quadro 1.

Quadro 1: Principais acontecimentos relacionados à vacinação contra a hepatite B no Brasil.

DATA	ACONTECIMENTO
1986	É introduzida a vacina contra a hepatite B produzida através de tecnologia do DNA recombinante.
1991	A OMS recomenda a inclusão da vacina contra a hepatite B (produzida a partir de partículas não infecciosas purificadas do plasma de indivíduos com infecção aguda pelo HBV contendo o HBsAg) nos programas nacionais e a vacina entra no calendário básico do Amazonas para menores de um ano de idade.
1992	A produção por engenharia genética (Engerix-B) passa a ser adquirida no Brasil e faz parte do calendário básico da Amazônia Legal, Paraná, Espírito Santo, Santa Catarina e Distrito Federal para menores de 5 anos.
1994	A oferta é ampliada aos profissionais de saúde do setor privado, bombeiros, policiais, militares, estudantes de medicina, odontologia, enfermagem e bioquímica.
1995	A vacina contra a hepatite B é implantada no Distrito Federal para menores de um ano de idade.
1996	O Instituto Butantan desenvolve um projeto e inicia a produção industrial por engenharia genética; Redefinição das recomendações para a vacinação contra a hepatite B; Ampliação da oferta da vacina contra a hepatite B para toda a população brasileira menor de 1 (um) ano de idade, com exceção dos estados da Amazônia Legal, Espírito Santo, Santa Catarina, Paraná e Distrito federal, onde a oferta passa a ser aos menores de 15 anos de idade. A efetivação dessas novas recomendações apenas acontece em 1998.
1997	Inicia a implementação, conforme as recomendações definidas em 1996; campanhas de vacinação contra a hepatite para odontólogos, estudantes de odontologia e escolares. A iniciativa para a vacinação Infantil define um plano estratégico para o controle global efetivo da hepatite B mediante a implementação das vacinas em todas as regiões até 2005.
2000	A oferta é ampliada para menores de 20 anos, gradativamente até 2003 em todo o País (30% em 2001, 30% em 2002 e 40% em 2003).
2011	A oferta é ampliada para o grupo etário de 20 a 24 anos
2012	A oferta é ampliada para o grupo etário de 25 a 29 anos. A partir de agosto de 2012 o Ministério da Saúde altera o calendário básico de vacinação da criança com a substituição da vacina tetravalente (DTP+Hib) pela vacina Pentavalente que previne contra difteria, tétano, pertussis, hepatite B e meningites causadas pelo <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b e, com a introdução da vacina inativada poliomielite que protege contra a poliomielite.

Fonte: Brasil, 2003, 2012a

As vacinas contra a hepatite B estão indicadas de forma universal para todas as crianças, adolescentes e adultos pertencentes aos grupos de risco: politransfundidos, pacientes submetidos à diálise, profissionais da saúde, contactantes domiciliares com portador crônico, parceiro sexual de portador crônico, usuários de drogas injetáveis, pessoas de vida sexual ativa e imigrante de áreas endêmicas (CDC, 2002a).

Os recém-nascidos de qualquer peso ou idade gestacional devem ser vacinados nas primeiras 12 horas de vida para prevenir a transmissão vertical. O esquema vacinal é de zero, 1 e 6 meses (BRASIL, 2004). Algumas populações como imunocomprometidos, portadores

de insuficiência renal em programas de hemodiálise e alguns bebês prematuros, devem fazer uso de esquemas especiais (OMS, 2006).

As vacinas contra a hepatite B têm eficácia de 80% a 100% em prevenir a infecção naqueles indivíduos que recebem o esquema completo de vacinação (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000, CDC 2002a, WONG, et al., 1985). Entretanto, com a idade, ocorre queda da imunogenicidade e aos 60 anos, aproximadamente, apenas cerca de 75% dos vacinados desenvolvem anticorpos protetores. Os títulos de anti-HBs considerados protetores são superiores a 10 mUI/mL (CDC, 2002b).

Atualmente existem vacinas contra hepatite B monovalentes e combinadas com outros antígenos. As combinadas são DTP-HepB, DTP-HepB + Hib, HepB-Hib, contra Hepatite B com a vacina poliomelite inativada (IPV) e a hepatite A e B (OMS, 2014c).

1.2.7 Características das vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib)

O Ministério da Saúde (MS) adquiriu a vacina combinada Pentavalente de dois laboratórios produtores, Novartis/Berna e Serum Institute of India Ltda. As vacinas adquiridas são compostas por: toxóides de difteria e tétano, suspensão celular inativada de *Bordetella pertussis*, antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), e oligossacarídeos conjugados de *Haemophilus influenzae* do tipo b.

Estudos realizados com a vacina demonstraram alta imunogenicidade, com taxas de soroproteção equivalentes às da vacina de referência. Entretanto, para garantir a imunidade a médio e longo prazo, é necessário que seja feito o esquema completo de vacinação, incluindo reforço, conforme as normas do PNI. A aplicação intramuscular da vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis, hepatite B (recombinante) e *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada) estimula a produção dos respectivos anticorpos. No entanto, os reforços são necessários e são realizados de acordo com o calendário básico da criança (Quadro 2). Todas as vacinas cumprem os requisitos preconizados pelas normas oficiais (BRASIL, 2012a).

Quadro 2: Calendário básico da criança

CALENDÁRIO DE VACINAÇÃO INFANTIL					
COMO ERA			COMO FICA		
IDADE	VACINA	DOSE	IDADE	VACINA	DOSE
Ao nascer	BCC-ID	Dose Única	Ao nascer	BCC-ID	Dose Única
	Hepatite B	1ª dose		Hepatite B	1ª dose
1 mês	Hepatite B	2ª dose			
2 meses	Tetavalente (DTP+Hib)	1ª dose	2 meses	Pentavalente (DTP+Hib + HB)	1ª dose
	Vacina oral poliomielite			Vacina poliomielite inativada	
	Vacina oral Rotavírus Humano			Vacina oral Rotavírus Humano	
	Vacina pneumocócica 10			Vacina pneumocócica 10	
3 meses	Vacina meningocócica C	1ª dose	3 meses	Vacina meningocócica C	1ª dose
4 meses	Tetavalente (DTP+Hib)	2ª dose	4 meses	Pentavalente (DTP+Hib + HB)	2ª dose
	Vacina oral poliomielite			Vacina poliomielite inativada	
	Vacina oral rotavírus humano			Vacina oral rotavírus humano	
	Vacina pneumocócica 10			Vacina pneumocócica 10	
5 meses	Meningocócica C	2ª dose	5 meses	Meningocócica C	2ª dose
6 meses	Hepatite B	3ª dose	6 meses	Pentavalente (DTP+Hib + HB)	3ª dose
	Vacina Oral Poliomielite			Vacina Oral Poliomielite	
	Tetavalente (DTP+Hib)			Vacina pneumocócica 10	
	Vacina pneumocócica 10				
9 meses	Febre Amarela	Dose Inicial	9 meses	Febre Amarela	Dose Inicial
12 meses	Triplíce viral	1ª dose	12 meses	Triplíce viral	1ª dose
	Vacina pneumocócica 10	Reforço		Vacina pneumocócica 10	Reforço
15 meses	Triplíce bacteriana (DTP)	1º reforço	15 meses	Triplíce bacteriana (DTP)	1º reforço
	Vacina oral poliomielite	Reforço		Vacina oral poliomielite	Reforço
	Meningocócica C			Meningocócica C	
4 anos	Triplíce bacteriana (DTP)	2º reforço	4 anos	Triplíce bacteriana (DTP)	2º reforço
	Triplíce viral	2ª dose		Triplíce viral	2ª dose
10 anos	Febre Amarela	Uma dose a cada dez anos	10 anos	Febre Amarela	Uma dose a cada dez anos
Campanhas Nacionais para Crianças					
Menores de 5 anos	Vacina oral de poliomielite		Menores de 5 anos	Vacina oral de poliomielite	
De 6 meses a menores de 2 anos	Vacina Influenza (gripe)		De 6 meses a menores de 2 anos	Vacina Influenza (gripe)	

Fonte: BRASIL, 2012a

A vacinação básica das vacinas combinadas com a pentavalente consiste na aplicação de 3 doses, com intervalo de 60 dias (mínimo de 30 dias), a partir de 2 meses de idade. Os dois reforços necessários realizados com a vacina DTP (difteria, tétano e pertussis). O primeiro reforço aos 15 meses e o segundo entre 4 a 6 anos 11 meses e 29 dias. Ressalta-se que fará parte deste esquema, para os recém-nascidos, a primeira dose nas primeiras 24 horas, preferencialmente nas primeiras 12 horas, com a vacina contra hepatite B monovalente (recombinante) (BRASIL, 2012a).

1.2.7.1 Composição e apresentação das vacinas combinadas pentavalente com o componente da hepatite B (DTP/HB/Hib)

As vacinas combinadas são em suspensão injetável apresentada em frasco monodose contendo 0,5 ml, conforme Quadro 3.

Quadro 3: Composição e apresentação das vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib)

LABORATÓRIOS	COMPOSIÇÃO
<p align="center">PRODUTOR A</p> <p>suspensão injetável de 0,5 ml</p>	<p>Toxóide purificado de difteria $\geq 7,5$ Lf (nao inferior a 30 IU) Toxóide purificado de tétano $\geq 3,25$ Lf (nao inferior a 60IU) B. pertussis inativado ≥ 15 OU_p (nao inferior a 4 IU) Oligossacarídeos Hib..... 10μg, conjugados para aproximadamente 25μg de CRM 197 Antígeno de superfície da hepatite B (rDNA)..... 10μg Fosfato de alumínio (adjuvante) ...0,3 mg Al⁺³ Excipientes: Cloreto de sódio 4,5 mg e água para injeção Pode conter traços de timerosal como resíduo do processo de produção da vacina</p>
<p align="center">PRODUTOR B</p> <p>suspensão injetável de 0,5 ml</p>	<p>Toxóide diftérico..... ≤ 25 Lf (≥ 30 UI) Toxóide tetânico $\geq 2,5$ Lf (≥ 40 UI) B. Pertussis (de célula inteira)...≤ 16 OU_p ($\geq 4,0$ UI) HBsAg (rDNA)..... ≥ 10 mcg Polissacarídeo capsular purificado de Hib (PRP) conjugado com o toxóide tetânico (proteína transportadora).....10mcg Adsorvido em fosfato de alumínio, Al⁺³..$\leq 1,25$ mg e Conservante: Timerosal.....0,005%</p>

A vacina pentavalente contém na apresentação toxóides de difteria e tétano, suspensão celular inativada de *Bordetella pertussis* (DTP), antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg), e oligossacarídeos conjugados de *Haemophilus influenzae* do tipo b-Hib, antígenos que estimulam a produção dos anticorpos contra as respectivas doenças. Os toxóides diftéricos e tetânicos são preparados a partir das toxinas produzidas pelo crescimento da *Corynebacterium diphtheriae* e *Clostridium tetani*, respectivamente. As características e composição antigênica dessas vacinas a base de toxóide são baseadas em evidências de proteção e livres de reações inesperadas no grupo-alvo para qual a vacina se destina (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2012).

1.3 Controle da qualidade de vacinas

A expressão “Controle da qualidade” refere-se às ações relacionadas com a medição da qualidade, para avaliar se os requisitos estão a ser respeitados para a finalidade a que se destina. O controle da qualidade de vacinas é realizado pelo laboratório produtor e deve obedecer a critérios padronizados, estabelecidos pela OMS (Organização Mundial da Saúde).

Após aprovação em testes de controle do laboratório produtor, cada lote de vacina é submetido à análise no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, criado em 1981, órgão responsável pelo controle da qualidade das vacinas usadas no Programa Nacional de Imunizações – PNI, Brasil.

Em produtos combinados, a eficácia e a segurança de cada componente devem ser avaliadas separadamente e na sua forma final através de ensaios de controles da qualidade. A potência de cada componente isolado não pode ser reduzida pela interação com os outros componentes, devido o comprometimento da eficácia (FDA, 1997). Todavia, o desenvolvimento de testes de controle de qualidade para vacinas combinadas com o componente HBsAg tem sido limitado por interações inesperadas entre componentes da vacina, como os adjuvantes, excipientes, falta de padronização e ensaios de potência validados. Diferentes métodos, como de propriedades físico-químicas e biológicas são usados para avaliar a potência do componente HBsAg, oriundos de diferentes produtores. Esses ensaios podem ser usados sozinhos ou em paralelo para o controle da consistência de fabricação, formulação e avaliação do produto final (SIMON et al., 2003, DUTTA, et al., 2009). Requisitos farmacopéicos para os múltiplos componentes de vacinas fornecem um ponto de partida para o estabelecimento de ensaios como o de potência. Entretanto, mesmo quando um ensaio encontra-se estabelecido, alguns testes podem perder seu poder preditivo quando aplicados à combinação de vacinas surgindo à necessidade de nova avaliação, padronização e validação destes.

De maneira geral, as vacinas são avaliadas por testes de segurança (esterilidade, toxicidade e Pirogênio ou endotoxina bacteriana) e eficácia (Identidade, estabilidade e potência).

1.3.1 Avaliação da potência para o componente da hepatite B

Com a introdução da vacina contra hepatite B, no Brasil, em 1981, a metodologia in vivo preconizada nas normas oficiais para avaliação da potência passou a ser utilizada pelo INCQS. Entretanto, em função do grande número de animais requerido e do sofrimento causado em testes laboratoriais, a reavaliação da utilização de animais nos experimentos passou a ser tendência mundial. A partir da criação de diversas instituições, com o objetivo de

desenvolver e validar novos métodos com implementação regulatória de testes alternativos em diversos países, a fim de legalizar e harmonizar o uso dos animais surgiu um novo paradigma internacionalmente reconhecido chamado de 3Rs (SCHECHTMAN, 2002; MEYER, 2003).

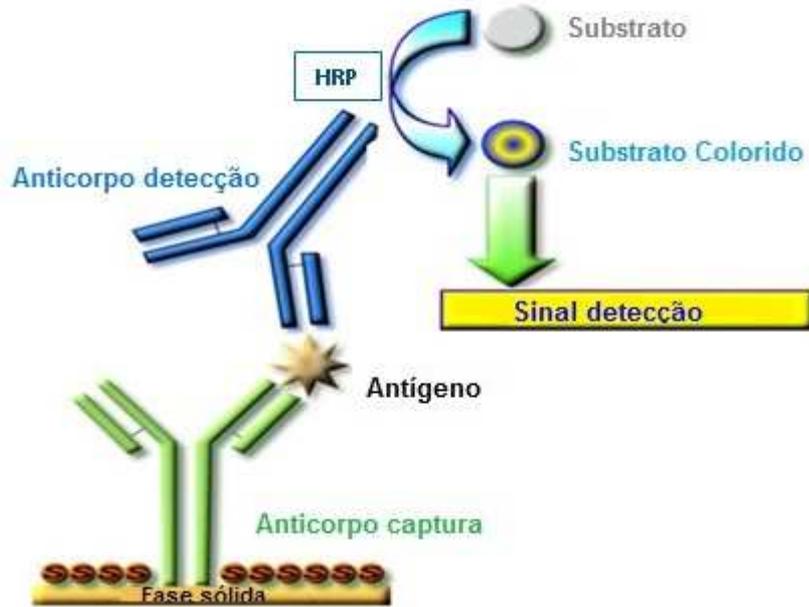
O paradigma 3Rs é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1) redução (*Reduction*), 2) refinamento (*Refinement*) e 3) substituição (*Replacement*), que significa a redução de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos, no sentido de reduzir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

Na redução da variabilidade, duração e custos de testes de potência em animais para a avaliação do antígeno de superfície da hepatite B-HBsAg em vacinas, alguns produtores tem desenvolvido metodologia *in vitro* baseado em ensaio imunoenzimático – ELISA para a avaliação da potência (COSTA, 2011; OMS, 2009). Esses ensaios são produto-específico utilizando kits comerciais ou *in house* para a detecção do HBsAg nas amostras de vacinas de lotes finais.

1.3.2 *Enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA

O método imunoenzimático do tipo ELISA é sensível, específico, de elevada precisão e exatidão, desenhado para facilitar o estudo de um grande número de amostras simultaneamente. O princípio básico da reação de um ensaio ELISA está na propriedade das proteínas (os anticorpos ou antígenos) serem facilmente adsorvidos a superfícies sólidas, dentre elas, as plásticas. Assim, a partir do momento que um dos compostos (anticorpo ou antígeno) encontra-se imobilizado, a separação entre os compostos que se ligaram e os que estão livres pode ser feita por sucessivos processos de lavagens da placa (Figura 4). O resultado de um ensaio do tipo ELISA é uma reação cromogênica que pode ser avaliada pela simples observação ou por espectrofotômetros específicos (TIJSSEN, et al.,1993; MARTINEZ et al.,1999).

Figura 4: Representação esquemática do ensaio ELISA tipo sanduíche



2 JUSTIFICATIVA

A crescente pressão para substituir os ensaios *in vivo* por métodos alternativos tem se expandido e se tornando realidade de âmbito gradativo mundialmente. No controle de qualidade dos imunobiológicos pelo órgão de controle nacional, o INCQS, essa substituição do *in vivo* para o *in vitro* encontra-se implementado para alguns ensaios e em fase de desenvolvimento para os demais.

O refinamento das metodologias alternativas como o ensaio *in vitro* para avaliação de potência pode contribuir não só para o conhecimento do comportamento das vacinas combinadas dos diferentes produtores, na avaliação da potência do componente HBsAg, como também um futuro estabelecimento do ensaio de potência nas vacinas pentavalente, após a validação. Essa padronização satisfaz as atividades de desenvolvimento de validação de métodos alternativos ao uso de animais realizado no INCQS com reconhecimento internacional (ALTWEB, 2010).

Considerando a necessidade do contínuo aperfeiçoamento e planejamento do Programa Nacional de Imunizações-PNI, para a introdução das vacinas combinadas pentavalente com o componente da hepatite B (DTP, Hib e Hepatite B), no calendário de vacinação brasileiro; existe a necessidade da ação de controle de qualidade desses novos produtos pelo INCQS, antes da liberação para a população através do PNI.

O ensaio de potência *in vitro* para avaliação do componente HBsAg, nas vacinas monovalentes, foi implementado como ensaio de rotina no INCQS desde 1997. Entretanto, não existe ensaio de potência para avaliação do componente HBsAg nas vacinas combinadas, sendo muito importante esse estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a potência do componente da hepatite B nas vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) de diferentes produtores.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar metodologia através do uso de protocolos com diferentes parâmetros (curva de calibração e limite de quantificação);
- analisar a possível necessidade de um pré-tratamento da retirada do adjuvante fosfato de alumínio, nas vacinas combinadas;
- avaliar a estabilidade das vacinas através de situação de estresse induzida por alta temperatura;
- avaliar a interferência dos componentes difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* tipo b na avaliação do componente HBsAg;
- avaliar a potência do componente da hepatite B (HBsAg) através da metodologia *in vivo*;
- comparar os resultados de potência obtido com o uso de kits comerciais de diferentes fabricantes na detecção do antígeno HBsAg em vacinas combinadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de vacinas selecionadas para o estudo

4.1.1 Avaliação da potência pelo método *in vitro*

Amostras de vacinas combinadas pentavalente com o componente HBsAg da vacina contra a hepatite B, produzidas por dois diferentes produtores foram codificadas como amostras do produtor A e produtor B.

Um total de dezessete amostras dos dois produtores, armazenadas de 2°C a 8°C foram selecionadas para o estudo proposto. Oito lotes foram produzidos pelo **produtor A** (lotes 1622/12; 1623/12; 1624/12; 3481/12; 4176/12; 4178/12; 1014/13 e 1015/13) e nove lotes produzidas pelo **produtor B** (lotes 3027/12; 3032/12; 3585/12; 4181/12; 1020/13; 1023/13; 1399/13; 1402/13 e 2152/13).

4.1.2 Avaliação da potência pelo método *in vivo*

Para avaliação da potência *in vivo* foram utilizados dois lotes de vacina (1622/12 e 1623/12) produzidos pelo produtor A.

4.1.3 Estudo de estabilidade (estresse 60°C por 7 dias)

Foram utilizados dois lotes de vacina do produtor A (lotes 1624/12 e 4178/12) e três lotes de vacina do produtor B (lotes 3027/12; 3032/12 e 3585/12).

4.1.4 Vacina monovalente usada para eleição do lote de vacina de referência interna para as amostras dos produtores A e B

Como não existe um padrão de referência internacional para avaliação da potência do componente HBsAg nas vacinas contra a hepatite B, devido as diferenças de produção, foi

selecionado inicialmente um lote de vacina monovalente (lote 3529/01). Essa amostra de lote de vacina contra a hepatite B selecionada foi produzida através da expressão do antígeno utilizando a levedura *Hansenula polymorpha*, mesma levedura utilizada na produção das vacinas contra a hepatite B usadas nas vacinas pentavalente. Esse lote 3529/01 que contém em torno de 20 µg/ mL do antígeno HBsAg foi usado para selecionar dois outros lotes de amostras de vacinas pentavalente para serem usados como referência interna para as amostras de vacinas dos produtores A e B.

4.1.5 Avaliação da interferência dos componentes difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* tipo b na potência do componente HBsAg

Foram utilizados dois lotes de amostras de vacinas combinadas sem o componente HBsAg (lotes 785/12 – DTP + HIB e 1325/12 – DTP) e dois lotes com o componente HBsAg (lotes 1623/12 e 4181/12).

4.2 Kits comerciais utilizados na avaliação da potência pela metodologia *in vitro* e *in vivo*

Para a avaliação da potência dos componentes HBsAg nas amostras de vacinas pentavalente foram realizados ensaios do tipo ELISA. Foram selecionados três kits comerciais, sendo dois kits para detecção do antígeno HBsAg através da metodologia *in vitro* e um kit para detecção do anticorpo contra o HBsAg usando o soro dos camundongos inoculados com as vacinas, pela metodologia *in vivo*.

4.2.1 Metodologia *in vitro*

a) Kit comercial Murex HBsAg versão 3 – Laboratório ABBOTT

O kit comercial murex contém microplacas de 96 poços revestidas com anticorpos monoclonais de camundongo e anticorpo de cabra para HBsAg marcado com peroxidase de rábano (conjugado).

b) Kit comercial Enzygnost HBsAg – Laboratório DADE BHERING

O kit comercial enzygnost contém microplacas de 96 poços revestidas com uma mistura de anticorpos policlonais de ovelha, anti - HBs monoclonal conjugado com Biotina (conjugado 1) e estreptavidina conjugada com peroxidase (conjugado 2).

4.2.2 Metodologia *in vivo***a) Kit comercial Enzygnost Anti – HBS II**

O kit comercial Anti-HBS II para detecção do anticorpo anti-HBsAg contém microplaca de 96 poços revestidas com HBsAg inativado (subtipo ad e ay) isolado de sangue humano.

4.3 Padronização da potência do componente da hepatite B (HBsAg) pela metodologia *in vitro*

Para padronização dos ensaios de potência dos componentes HBsAg nas amostras de vacinas pentavalente selecionadas foram desenvolvidos protocolos com diferentes parâmetros de avaliações, conforme Anexo 1.

4.3.1 Avaliação da interferência do adjuvante fosfato de alumínio na avaliação da potência

Para avaliação da possível interferência do adjuvante fosfato de alumínio na avaliação da potência, lotes de vacinas do produtor A foram submetidos inicialmente ao pré-tratamento de dissociação do adjuvante fosfato de alumínio.

4.3.1.1 Pré-tratamento das amostras para dissociação do adjuvante fosfato de alumínio

Foram utilizadas soluções de Dietanolamina (DEA), Triton X-100 e PBS e Solução Citrato de Sódio a 20% para a dissociação do adjuvante fosfato de alumínio nas amostras de vacinas do **Produtor A**, como segue:

a) Solução Dietanolamina (DEA), Triton X-100 e Tampão fosfato salino (PBS)

Em tubos do tipo eppendorf foram feitas misturas de volumes iguais de 500 μ L de amostras de vacinas selecionadas e soluções de dissociação do fosfato de alumínio. As misturas foram incubadas à temperatura ambiente, por trinta minutos e centrifugadas por 10 segundos a 231x g, para precipitação do alumínio dissociado. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados de 2°C a 8°C, para uso posterior (Anexo 1, protocolo 2).

b) Solução Citrato de Sódio à 20%

Em tubos do tipo eppendorf foram feitas misturas de volumes iguais de 300 μ L de amostras de vacinas selecionadas e solução de dissociação do fosfato de alumínio. As misturas foram incubadas a temperatura de 37°C por uma noite. Após a incubação, as amostras foram agitadas e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, para precipitação do alumínio dissociado. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados de 2°C a 8°C, para uso posterior (Anexo 1, protocolo 3).

4.3.1.2 Diluição das amostras de vacinas após dissociação do adjuvante fosfato de alumínio

Os sobrenadantes das amostras de vacinas pentavalente obtidos após a dissociação do fosfato de alumínio foram usados separadamente para as diferentes diluições. Resumidamente, em um tubo do tipo eppendorf foram adicionados 100 μ L do sobrenadante e 900 μ L do diluente da amostra (PBS com adição de 0,2% de Soro albumina bovina- BSA) para obter uma solução de 1 μ g/mL. Em outro tubo do mesmo tipo foram adicionados 20 μ L da solução de 1 μ g/mL e 980 μ L de diluente da amostra (PBS/ BSA 0,2%) para obter uma solução de 20 ng/mL. A partir da concentração de 20 ng/mL as amostras foram diluídas, em triplicatas, para obter as concentrações (0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL) para as vacinas em análise

e nas concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ng/mL) para a vacina de referência interna selecionada.

4.3.2 Diluições das amostras de vacinas sem dissociação do adjuvante fosfato de alumínio

Para as diluições das amostras de vacinas sem a dissociação do fosfato de alumínio foram adicionados 50 µL da vacina homogeneizada e 950 µL do diluente da amostra em tubos do tipo eppendorf para obter uma solução de 1 µg/mL. Em outro tubo do mesmo tipo foram adicionados 20 µL da solução de 1 µg/mL e 980 µL diluente da amostra (PBS/ BSA 0,2%) para obter uma concentração de 20 ng/mL. A partir da concentração de 20 ng/mL as amostras foram diluídas, em triplicatas, nas concentrações (0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL) para as vacinas em análise e nas concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ng/mL) para a vacina de referência interna.

4.4 Eleição dos lotes de referência interna das vacinas pentavalente dos produtores A e B

Inicialmente foi utilizado um lote de vacina monovalente (3529/01) produzida em levedura *Hansenula polymorpha* com concentração de 20 µg/ml, para selecionar os lotes de vacinas de referência interna para os produtores A e B, conforme descrito no item 4.1.4. A curva de concentração das amostras utilizada nos kits murex e enzygnost foram às mesmas descritas na metodologia implementada para avaliação da potência da vacina monovalente contra a hepatite B, existente no Laboratório de Vacinas Virais, INCQS- POP nº 65.3430.033.

Resumidamente, em um tubo do tipo eppendorf foi adicionado o volume de 50 µL da vacina homogeneizada e 950 µL do diluente da amostra (PBS/ BSA 0,2%) para obter uma solução de 1 µg/mL. Em outro tubo do mesmo tipo foram adicionados 20 µL da solução de 1 µg/mL e 980 µL de diluente da amostra para obter uma concentração de 20 ng/mL. A partir da concentração de 20ng/mL as amostras foram diluídas, em triplicatas, nas concentrações

(0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL) para as vacinas em pentavalente e nas concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ng/mL) para a vacina de referência interna.

4.4.1 Diluições utilizadas após eleição dos lotes de referência interna para os produtores A e B

Os lotes de vacinas eleitos como lotes de vacinas de referência interna foram os lotes 1622/12 para o **produtor A** e o lote 3032/12 para o **produtor B** que apresentaram potência para os componentes HBsAg em torno de 50 µg/mL e 35 µg/mL respectivamente.

Em função dos valores de potência encontrados para os lotes eleitos para amostras dos produtores A e B como referências interna serem acima de 20 µg/mL, foi feita uma modificação na diluição inicial descrita na metodologia do item 4.4, para obter uma concentração em 20 µg/mL, igual à concentração de uma vacina monovalente de referência interna conforme descrito a seguir:

Para as diluições da vacina eleita (lote 1622/12) do **produtor A**, foram adicionados em tubo do tipo eppendorf 20 µL da vacina homogeneizada e 980 µL do diluente da amostra para obter uma solução de 1 µg/mL. Em outro tubo foram adicionados 20 µL da solução de 1µg/mL e 980 µL de diluente da amostra para obter uma concentração de 20 ng/mL. A partir da concentração de 20 ng/mL as amostras foram diluídas, em triplicatas para uso nos diferentes kits:

- a) No **Kit Murex**, nas concentrações (0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL) para as vacinas pentavalente em análises e nas concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ng/mL) para o lote de vacina de referência interna e;
- b) no **Kit Enzygnost**, nas concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 ng/mL) para as vacinas pentavalente em análise e nas concentrações (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 ng/mL) para o lote de vacina de referência interna.

Para as diluições do lote de vacina eleita como referência interna (lote 3032/12) do **Produtor B** foi resumidamente, adicionado em tubo do tipo eppendorf, 28,6 µL da vacina eleita (lote 3032/12) do **produtor B**, após homogeneização e 971,4 µL do diluente da amostra para obter uma solução de 1µg/mL. Em outro tubo foram adicionados 20 µL da solução de 1

$\mu\text{g/mL}$ e 980 μL de diluente da amostra para obter uma concentração de 20 ng/mL . A partir da concentração de 20 ng/mL as amostras foram diluídas, em triplicatas para uso nos diferentes kits:

- a) No **Kit Murex**, nas concentrações (0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL) para as vacinas pentavalente em análise e nas concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ng/mL) para a vacina de referência interna e;
- b) no **Kit Enzygnost**, nas concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 ng/mL) para as vacinas pentavalente em análises e nas concentrações (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 ng/mL) para a vacina de referência interna.

4.5 Metodologia do kit comercial Murex HBsAg versão 3 – Laboratório ABBOTT, para detecção do componente HBsAg da vacina pentavalente

Resumidamente, foram adicionados 100 μL das amostras de vacinas pentavalente com o componente HBsAg, conforme descrito nos itens 4.3.1.2, 4.3.2, 4.4 e 4.4.1 aos poços das placas de 96 poços. As placas foram cobertas e incubadas a temperatura de 37°C por 60 minutos. Foram adicionados 50 μL do conjugado (anticorpo de cabra para HBsAg ligado à peroxidase) em cada poço e as placas incubadas por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem (Glicina/Borato) usando um lavador de placas automático ELX50 (Bio-Tek). Após a lavagem das placas foram adicionados 100 μL da mistura da solução de substrato (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) em cada poço. As placas foram cobertas e incubadas a 37°C por 30 minutos. As reações foram interrompidas com a adição de 50 μL da solução de parada (Ácido sulfúrico 2 M). As absorbâncias foram medidas a 450 nm com um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek).

4.6 Metodologia do kit comercial Enzygnost HBsAg – Laboratório DADE BHERING para detecção do componente HBsAg da vacina pentavalente

Resumidamente, foram distribuídas em cada um dos 3 (três) poços (A1, B1 e E1), 100 μL do controle negativo e em 2 poços (C1 e D1), 100 μL do controle positivo do kit e em

cada um dos poços seguintes 100 µL da amostra diluída conforme descrito nos itens 4.3.1.2, 4.3.2, 4.4 e 4.4.1. A seguir, foram distribuídos em cada poço 25 µL de conjugado 1 (anti-HBs/ biotina), as placas foram cobertas e incubadas a temperatura de 37°C por 60 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem usando um lavador de placas automático ELX50 (Bio-Tek) e foram adicionados 100 µL de conjugado 2 (estreptavidina/ POD) em cada poço. As placas foram cobertas e incubadas a 37°C por 30 minutos. Após incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem. Após a lavagem das placas foram adicionados 75 µL de solução de uso de cromógeno (substrato) em cada poço. As placas foram cobertas e incubadas durante 30 minutos ao abrigo da luz entre 15 e 25°C. As reações foram interrompidas com a adição de 75 µL da solução de bloqueio (Ácido sulfúrico 2 M). As absorbâncias foram medidas a 450 nm com um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek).

4.7 Metodologia *in vivo*, para avaliação de potência para as amostras de vacinas pentavalente dos produtores A e B

Foram realizados dois ensaios através da metodologia *in vivo*:

Um ensaio para avaliação da potência usando amostras de vacinas pentavalente do produtor A, em paralelo, a uma **amostra de referência interna monovalente (lote 3529/01)**, com concentração em torno de 20 µg/ mL (Quadro 4A) e;

O segundo ensaio usando **amostra de vacina de referência interna pentavalente do produtor A**, já eleita, na metodologia *in vitro*. Conforme mencionado no item 4.4.1, em função do valor de potência desse lote eleito ser de 50 µg/mL, a vacina foi diluída para obter a mesma curva de concentração de uma vacina que contém em torno de 20 µg/mL (Quadro 4B).

Resumidamente, as vacinas em análise e a referência foram diluídas segundo o quadro abaixo, utilizando o diluente da amostra (solução de NaCl 0,9% contendo 0,05% de gel de hidróxido de alumínio).

Quadro 4A: Diluição das amostras de vacina pentavalente

Diluição	Diluyente (mL)	Amostra (mL)	HBsAg ($\mu\text{g/mL}$)
1:4	6	2,0 da vacina	5,0
1:16	6	2,0 da dil 1:4	1,25
1:64	6	2,0 da dil 1:16	0,312
1:256	6	2,0 da dil 1:64	0,078

Quadro 4B: Diluição do lote de vacina eleita como referência interna (1622/12)

Diluição	Diluyente (mL)	Amostra (mL)	HBsAg ($\mu\text{g/mL}$)
1:10	10,8	1,2 da vacina	5,0
1:40	10,8	1,2 da dil 1:10	1,25
1:160	10,8	1,2 da dil 1:40	0,312
1:640	10,8	1,2 da dil 1:160	0,078

4.7.1 Inoculação da vacina em animais

Para a etapa da imunização foram utilizadas as diferentes diluições obtidas de acordo com os quadros 3A e 3B e camundongos BALB-c (haplotipo H-2^d) fêmeas, de 5 semanas de idade. Cada diluição foi inoculada em 6 camundongos, através da via intraperitoneal (1,0 mL/camundongo). Para o controle negativo foram utilizados 6 camundongos inoculados com o diluyente da amostra, uma solução de NaCl 0,9% contendo 0,05% de gel de hidróxido de alumínio (1,0 mL/camundongo). Após 28 dias de inoculação, os camundongos foram previamente anestesiados e sangrados. O sangue foi colocado em tubos do tipo eppendorf e incubados a temperatura ambiente para retração e coagulação. A seguir, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante (soro) coletado. O soro foi estocado à - 20°C até o momento da realização do ensaio para avaliação da presença do anticorpo anti-HBsAg nas amostras de vacinas selecionadas para o estudo *in vivo*. A licença para o uso desses animais está registrada no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ) sob o número P. 0135/02

4.7.2 Metodologia do kit comercial Enzygnost Anti-HBs II usado nas avaliações dos soros dos camundongos inoculados com as amostras de vacinas pentavalente

Foram distribuídos em cada poço 25 μ L de Anti-HBs II conjugado. Depois, foram distribuídas em cada um dos 4 poços (A1, B1, C1 e D1), 100 μ L do controle negativo e em 2 poços (E1 e H1), 100 μ L do controle positivo do kit e em cada um dos poços seguintes 100 μ L da amostra. A seguir, as placas foram cobertas e incubadas a temperatura de 37°C por 60 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem usando um lavador de placas automático ELX50 (Bio-Tek) e foram adicionados 100 μ L de solução cromogênica (substrato) em cada poço. As placas foram cobertas e incubadas durante 30 minutos ao abrigo da luz entre 15 e 25°C. As reações foram interrompidas com a adição de 100 μ L da solução de bloqueio (Ácido sulfúrico 0,25 mol/L). As absorbâncias foram medidas a 450 nm com um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek).

4.8 Avaliação estatística dos resultados obtidos com as metodologias *in vitro*

Os testes estatísticos Shapiro-Wilk (normalidade), t-Student pareado, Kruskal-Wallis (adequação de ajuste) e o programa Comostat foram utilizados para avaliação dos resultados obtidos nas metodologias *in vitro* usadas após padronização com as amostras de lotes de vacinas pentavalente dos produtores A e B.

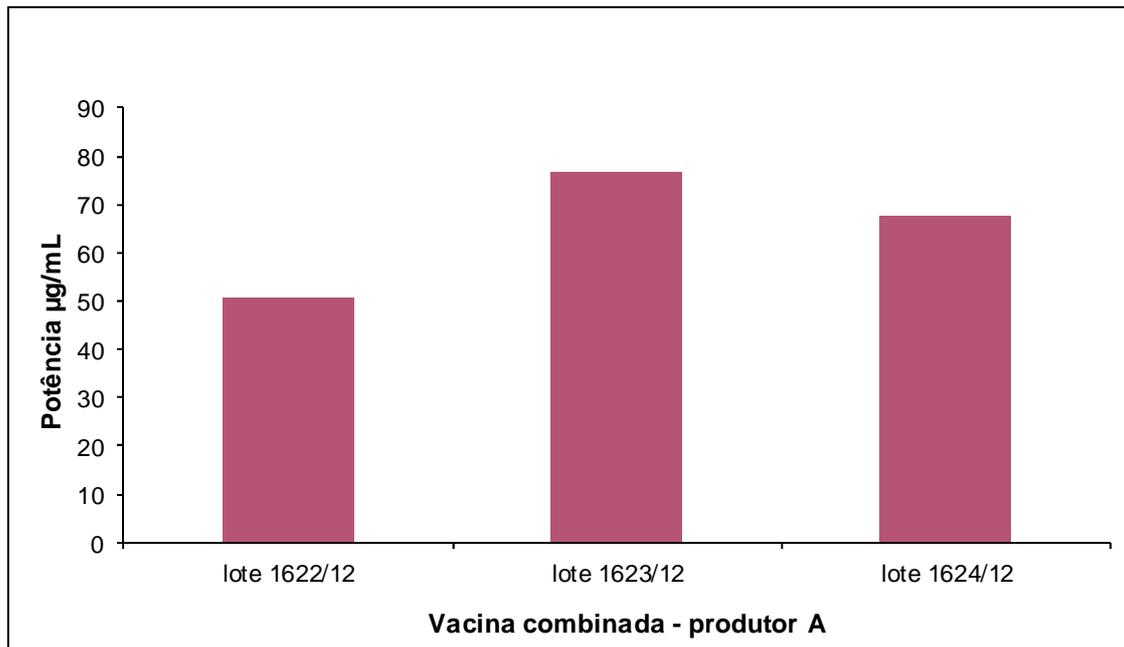
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da potência do componente HBsAg nas vacinas pentavalente pela metodologia *in vitro* usando o KIT MUREX

5.1.1 Amostras de lotes de vacina sem a dissociação do adjuvante – Produtor A

Resultados de potência obtidos com as amostras de vacinas combinadas pentavalente, lotes 1622/12 (50,5 µg/mL), 1623/12 (76,9 µg/mL) e 1624/12 (67,6 µg/mL) do produtor A foram mostrados na figura 5.

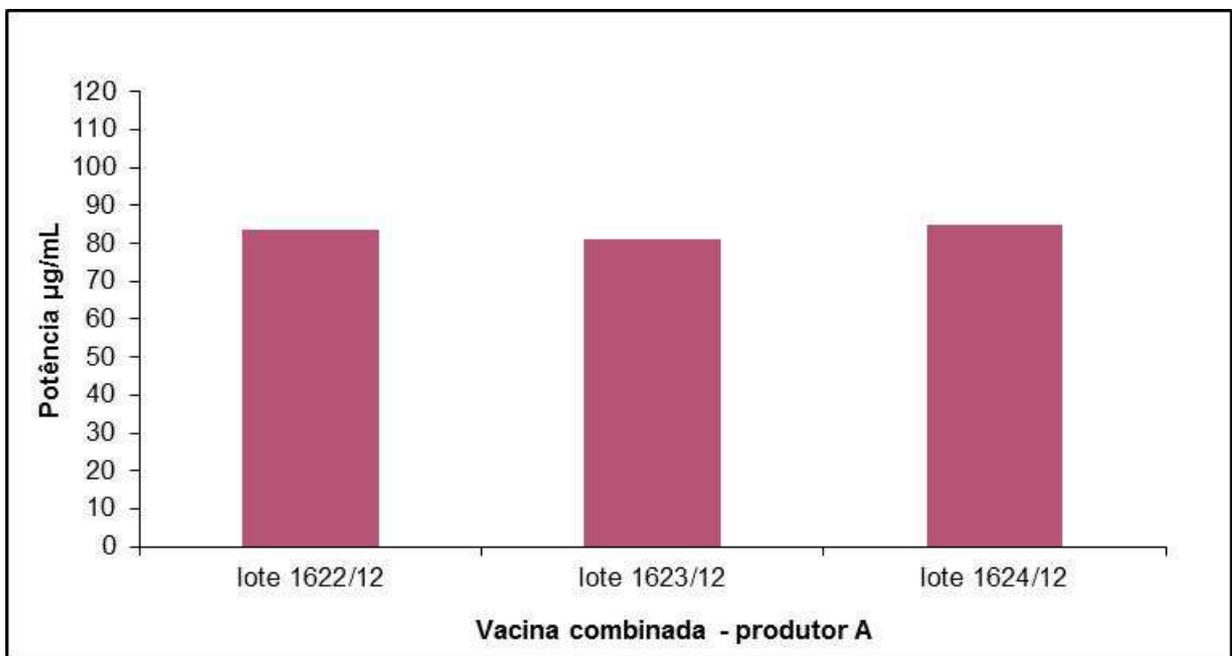
Figura 5: Resultados de potência do componente HBsAg nas vacinas combinadas pentavalente do produtor A, pelo método *in vitro*



5.1.2 Dissociação do adjuvante fosfato de alumínio utilizando solução DEA

A figura 6 representa os resultados obtidos após a dissociação do adjuvante fosfato de alumínio utilizando solução DEA, utilizando as amostras de lotes 1622/12 (83,4 µg/mL), 1623/12 (81,2 µg/mL) e 1624/12 (84,7 µg/mL), do produtor A.

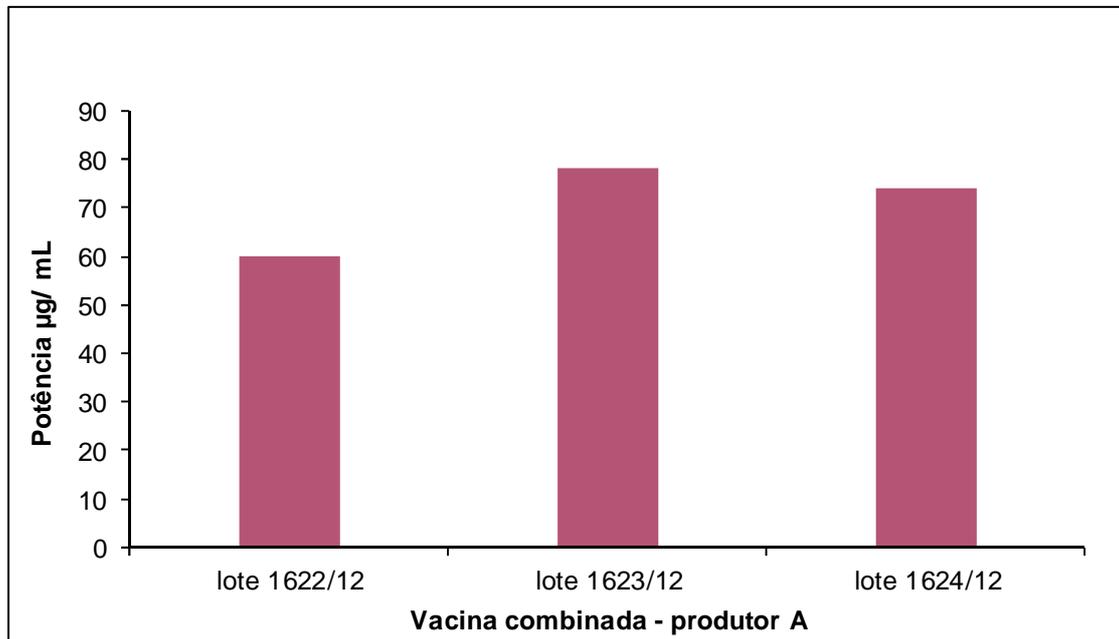
Figura 6: Resultados de potência do componente HBsAg após a dissociação do adjuvante utilizando a solução DEA para o **produtor A**



5.1.3 Dissociação do adjuvante fosfato de alumínio utilizando solução Citrato de Sódio a 20% das amostras de vacinas combinadas pentavalente do produtor A

Os resultados obtidos após a dissociação do adjuvante fosfato de alumínio usando solução de citrato de sódio a 20% para as amostras de lotes 1622/12 (59,9 µg/mL), 1623/12 (78,2 µg/mL) e 1624/12 (74,0 µg/mL) foram mostrados na figura 7.

Figura 7: Resultados de potência do componente HBsAg após a dissociação do adjuvante usando a solução Citrato de sódio a 20%, para amostras do produtor A



5.1.4 Resultados comparativos das vacinas sem a dissociação do adjuvante e com dissociação do adjuvante utilizando as soluções DEA e Citrato de Sódio nas amostras de vacinas do produtor A

A análise comparativa dos resultados de potência após a dissociação do adjuvante apresentado na tabela 1 mostraram valores superiores para as amostras tratadas com a solução de DEA, comparados com os encontrados utilizando o citrato de sódio e o sem dissociação do adjuvante.

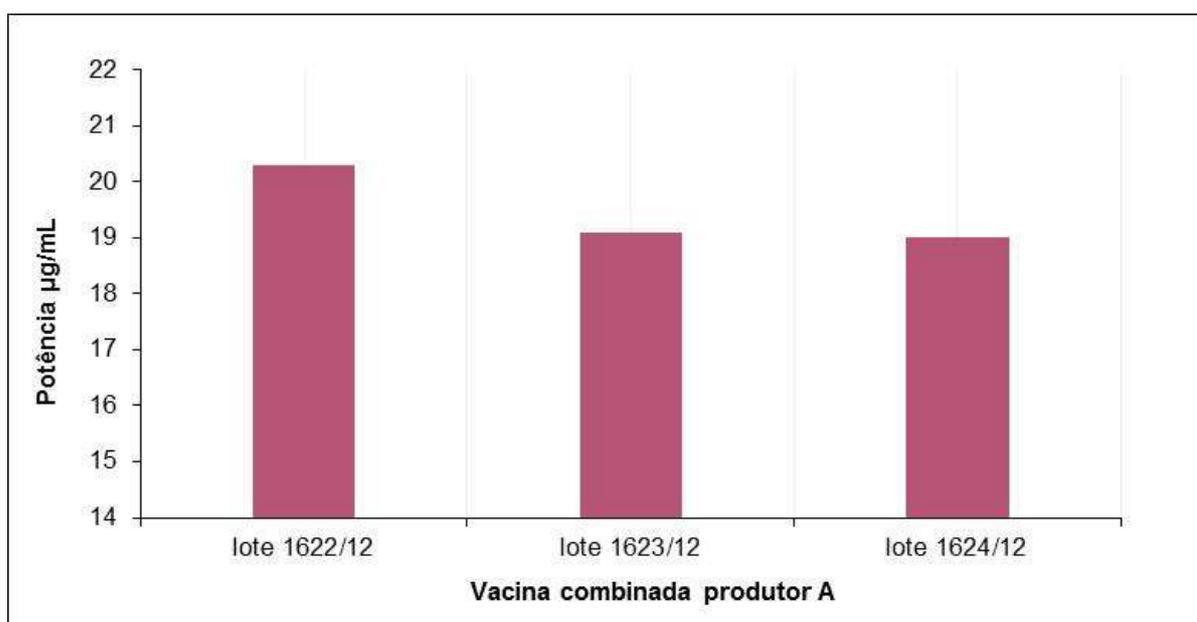
Tabela 1: Resultados comparativos de potência das vacinas sem dissociação do adjuvante e com dissociação do adjuvante com as diferentes soluções para as amostras do **produtor A**

Lotes	Dissociação do adjuvante com solução DEA ($\mu\text{g/mL}$)	Dissociação do adjuvante com solução Citrato de sódio ($\mu\text{g/mL}$)	Sem dissociação do adjuvante ($\mu\text{g/mL}$)
1622/12	83,4	59,9	50,5
1623/12	81,2	78,2	76,9
1624/12	84,7	74,0	67,6

5.1.5 Eleição do lote de vacina de referência interna para amostras do PRODUTOR A

As amostras dos lotes de vacina combinada pentavalente do produtor A usadas com finalidade de eleição do lote de referência interna foram diluídas de acordo com descrito na metodologia do item 4.4.1. Os resultados de potência encontrados para os lotes 1622/12 (20,3 $\mu\text{g/mL}$), 1623/12 (19,1 $\mu\text{g/mL}$) e 1624/12 (19,0 $\mu\text{g/mL}$), foram mostrados na figura 8A.

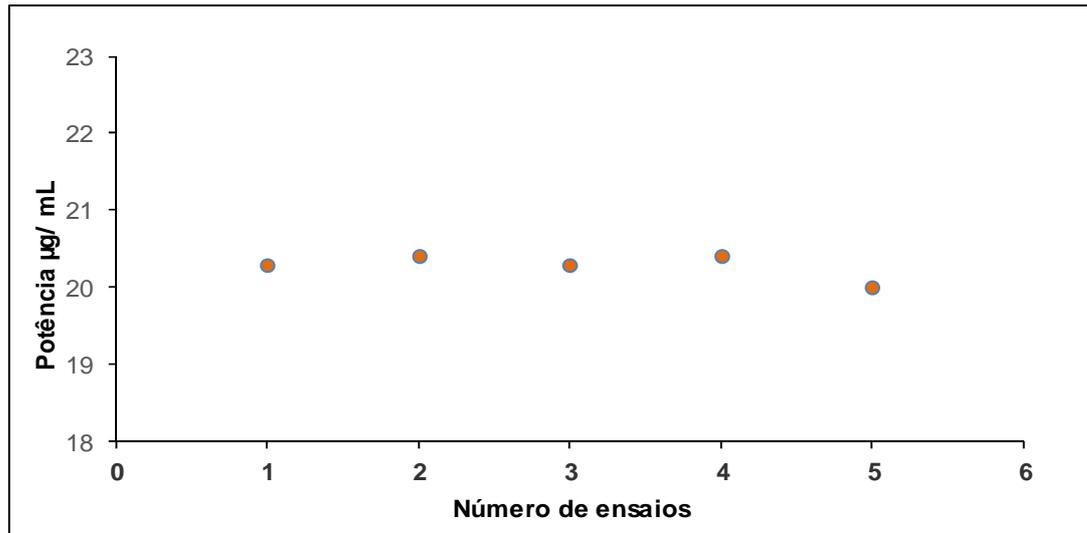
Figura 8A: Resultados de potência do componente HBsAg para eleição do lote de vacina de referência interna do **produtor A**



Após análise dos resultados encontrados na figura 8A, o lote 1622/12 foi selecionado como vacina de referência interna para as amostras do produtor A. Para tanto, foram

realizados cinco ensaios consecutivos para avaliação da repetitividade do resultado de concentração do lote eleito. Todos os resultados foram em torno de 20,3; 20,3; 20,4; 20,0 e 20,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente (Figura 8B).

Figura 8B: Avaliação da repetitividade do resultado de potência da vacina de referência interna (lote 1622/12) para o produtor A



5.1.6 Avaliação da potência da vacina combinada tetravalente DTP + Hib sem o componente da hepatite B e da vacina pentavalente DTP-HepB + Hib com o componente da hepatite B

Os valores de densidade ótica (DO) encontrados para as amostras de vacina tetravalente DTP + Hib sem o componente HBsAg foram menores que o valor do controle negativo (0,2). Entretanto, na avaliação das amostras de vacina combinada com o componente HBsAg (DTP-HepB + Hib) os resultados foram considerados positivos por estarem muito mais altos que os encontrados com as vacinas DTP + Hib ou controle negativo (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados de densidades ótica de amostras sem e com o componente HBsAg.

Amostras de vacinas sem o componente HBsAg (Média das triplicatas – DOs)				
Produto	Diluições			
	0,25	0,5	1,0	1,5
Lote 785/12 (DTP + HIB)	0,124	0,122	0,119	0,121
Lote 1325/12 (DTP)	0,124	0,124	0,126	0,125
Controle Negativo	0,200			

Amostras de vacinas com o componente HBsAg (Média das triplicatas – DOs)				
Produto	Diluições			
	0,25	0,5	1,0	1,5
Lote 1623/12 (DTP-HepB + Hib)	0,488	0,844	1,615	2,183
Lote 4181/12 (DTP-HepB + Hib)	0,470	0,826	1,390	2,050

5.1.7 Potência dos lotes de vacina do PRODUTOR A após o estabelecimento do protocolo final

Os resultados dos ensaios realizados com sete diferentes lotes de amostras de vacina combinada pentavalente, do produtor A, utilizando o lote de vacina de referência eleito (1622/12) mostraram médias variáveis em torno de 70 – 86 µg/mL, após três ensaios consecutivos (Tabela 3).

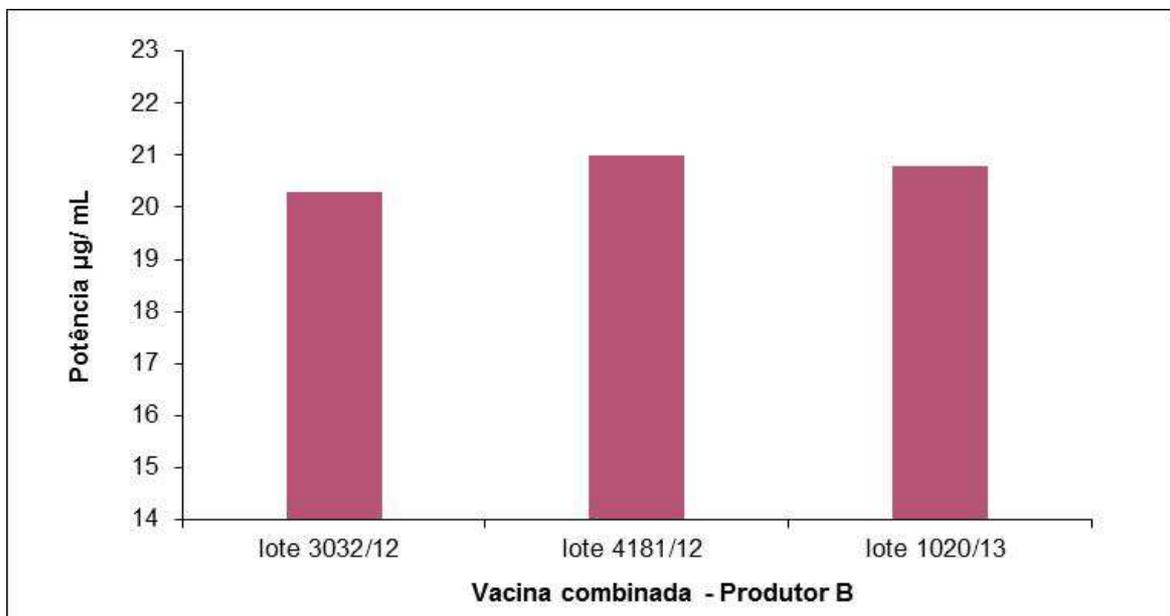
Tabela 3: Avaliação de potências dos componentes HBsAg nos diferentes lotes de vacina combinada pentavalente do produtor A

Amostras	Kit Murex			
	Resultado de potência (µg/mL)			Média (µg/mL)
1623/12	67,4	78,9	68,1	71,5
1624/12	78,4	77,7	78,8	78,3
3481/12	76,9	74,5	75,7	75,7
4176/12	79,8	83,1	80,0	81,0
4178/12	78,6	79,6	78,6	78,9
1014/13	82,6	90,4	83,7	85,6
1015/13	89,0	83,6	84,1	85,6

5.1.8 Eleição do lote de vacina de referência interna para amostras do PRODUTOR B

A eleição do lote de referência interna para avaliação das amostras de vacina combinada pentavalente do produtor B, foi realizada conforme metodologia do item 4.4.1. A figura 9A apresenta os resultados de potência obtidos para os lotes 3032/12 (20,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4181/12 (21,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 1020/13 (20,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), selecionados para a eleição.

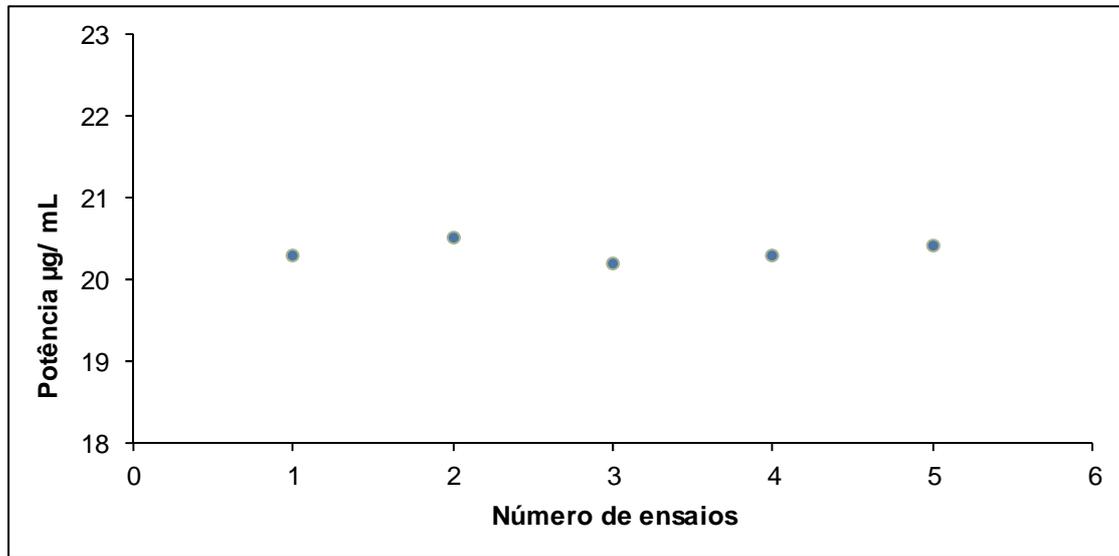
Figura 9A: Resultados de potência do componente HBsAg para eleição do lote de vacina de referência interna para amostras do **produtor B**



O lote 3032/12 apresentando concentração em torno de 20,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno HBsAg foi selecionado como amostra de vacina de referência interna do produtor B, após análise dos resultados mostrados na figura 9A.

Para avaliação da repetitividade de concentração do lote eleito (3032/12), foram realizados cinco ensaios e os resultados de concentração foram em torno de 20,3; 20,5; 20,2; 20,3 e 20,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente conforme mostrado na figura 9B.

Figura 9B: Repetitividade do resultado de potência da vacina de referência interna (lote 3032/12), para o **produtor B**



5.1.9 Potência do componente HBsAg na vacina combinada pentavalente do PRODUTOR B

A tabela 4 apresenta os resultados de potência obtidos em três ensaios com os diferentes lotes de vacina combinada pentavalente. Os valores de médias encontrados variaram de 31,0 – 41,5 µg/mL, considerando o lote de vacina de referência interna (3032/12), em torno de 20 µg/mL.

Tabela 4: Resultados de potência do componente HBsAg na vacina combinada do **produtor B**

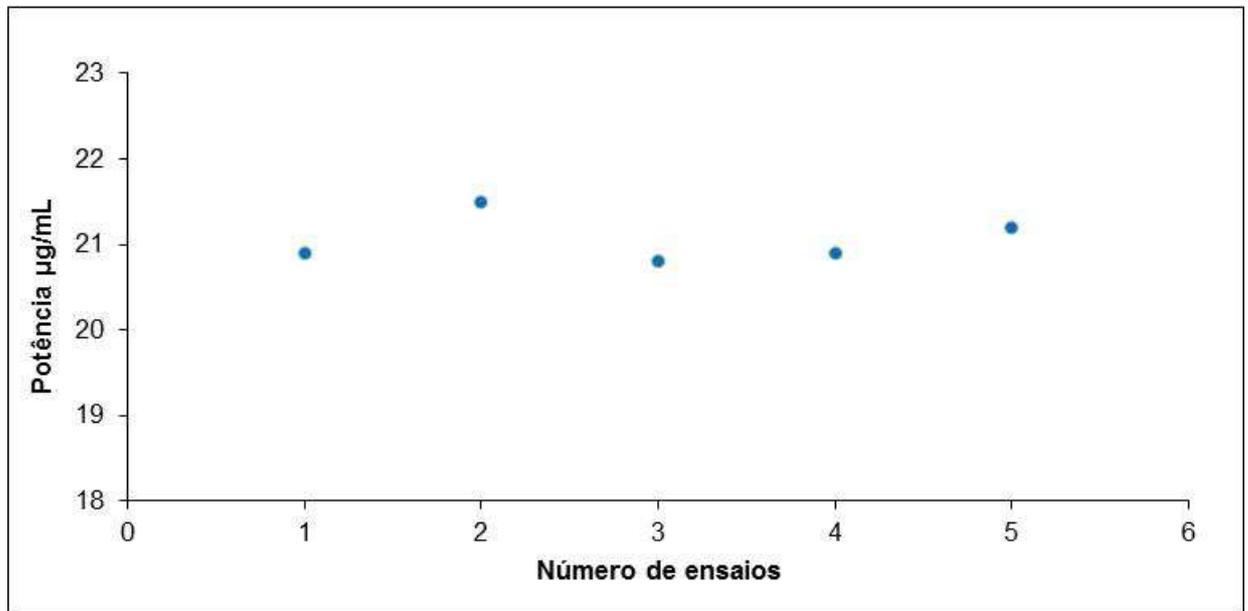
Amostras	Kit Murex			
	Resultado de potência ($\mu\text{g/mL}$)			Média ($\mu\text{g/mL}$)
3027/12	28,3	32,8	31,9	31,0
3585/12	33,1	35,4	35,2	34,6
4181/12	34,2	35,1	31,7	33,7
1020/13	35,8	36,4	36,7	36,3
1023/13	36,7	39,5	39,1	38,4
1399/13	35,5	35,5	35,7	35,6
1402/13	40,8	41,9	41,9	41,5
2152/13	41,7	40,0	40,2	40,6

5.2 Resultados de potências dos componentes HBsAg nas vacinas pentavalente dos produtores A e B pela metodologia *in vitro* usando, KIT ENZYGNOST

5.2.1 Lote de vacina de referência interna do PRODUTOR A – repetitividade

Com o lote de vacina (1622/12), eleito como referência interna foram realizados cinco ensaios consecutivos para avaliação da repetitividade da concentração da amostra. Os resultados encontrados foram (20,9; 21,5; 20,8; 20,9 e 21,2 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente (Figura 10).

Figura 10: Resultado de potência do componente HBsAg do lote de vacina de referência interna (lote 1622/12), do produtor A utilizando o Kit Enzygnost



5.2.2 Potência dos lotes de vacina do PRODUTOR A após o estabelecimento do protocolo final usando o Kit Enzygnost

Os diferentes lotes de vacina combinada pentavalente do produtor A, após três ensaios consecutivos, utilizando a vacina de referência interna 1622/12 selecionada anteriormente, mostraram resultados de médias de potência variáveis em torno de 74 – 80,1 µg/mL (Tabela 5).

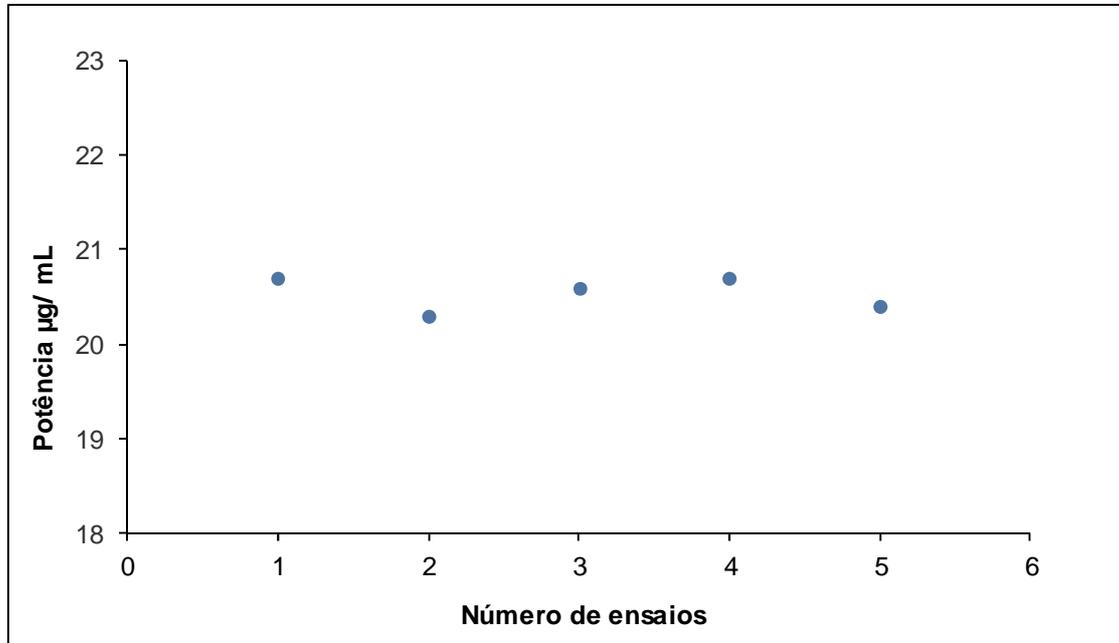
Tabela 5: Resultados de potência do componente HBsAg na vacina combinada pentavalente do produtor A

Amostras	Kit Enzygnost			Média (µg/mL)
	Resultado de potência (µg/mL)			
1623/12	74,5	80,2	79,2	78,0
1624/12	81,8	82,0	78,6	80,8
3481/12	72,0	79,3	71,1	74,1
4176/12	83,4	74,9	75,2	77,8
4178/12	80,0	79,7	80,7	80,1
1014/13	81,7	78,5	72,7	77,6
1015/13	81,9	78,0	80,4	80,1

5.2.3 Lote de vacina de referência interna do PRODUTOR B, com o Kit Enzygnost – repetitividade

Foram realizados cinco ensaios consecutivos para avaliação da repetitividade do resultado de concentração da amostra eleita como referência de interna (lote 3032/12) do produtor B. A figura 11 apresenta os resultados obtidos nos ensaios (20,7; 20,3; 20,6; 20,7 e 20,4 µg/mL), respectivamente.

Figura 11: Resultado da potência do componente HBsAg do lote de vacina de referência eleito (3032/12) do produtor B utilizando o Kit Enzygnost



5.2.4 Potência dos diferentes lotes de vacina combinada pentavalente do PRODUTOR B

Os resultados dos ensaios realizados com diferentes lotes de amostras de vacina combinada, do produtor B, utilizando o lote de vacina de referência eleita (3032/12), após padronização da metodologia mostraram médias de concentrações variáveis em torno de 29,7 – 41,9 µg/mL (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados de potência do componente HBsAg nas vacinas combinadas do **produtor B** com o uso do **Kit Enzygnost**

Amostras	Kit Enzygnost			Média (µg/mL)
	Resultado de potência (µg/mL)			
3027/12	32,1	28,3	31,3	30,6
3585/12	38,4	38,2	35,6	37,4
4181/12	28,2	28,5	32,3	29,7
1020/13	36,3	36,4	36,4	36,4
1023/13	38,9	39,0	39,1	39,0
1399/13	35,8	35,7	35,4	35,6
1402/13	42,0	41,8	42,0	41,9
2152/13	40,0	41,7	40,8	40,8

5.3 Estudo da estabilidade das amostras de vacinas combinadas mantidas a 4°C e submetidas a 60°C por 7 dias

As amostras de vacina combinada pentavalente do produtor A (lotes 1624/12 e 4178/12) e produtor B (lotes 3585/12; 3027/12 e 3032/12), mantidas a 4°C e submetidas a 60°C, por uma semana foram avaliadas através do ensaio do tipo ELISA utilizando os kits comerciais Murex e Enzygnost.

Os resultados das amostras de vacina dos dois produtores (A e B) mostraram quedas significativas nos valores de potências quando submetidas à temperatura de 60°C com uso dos diferentes kits de detecção do antígeno HBsAg.

A avaliação comparativa dos resultados encontrados com as amostras mantidas a 4°C e 60°C mostraram valores muito superiores aos obtidos com amostras a 60°C. (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados de potência das amostras de vacina combinada dos produtores A e B mantidas a 4°C e submetidas a 60°C por 7 dias

Kit Comercial Murex					
Temperatura	Produtor A		Produtor B		
	Lote 1624/12 (µg/mL)	Lote 4178/12 (µg/mL)	Lote 3027/12 (µg/mL)	Lote 3032/12 (µg/mL)	Lote 3585/12 (µg/mL)
4°C	78,3	78,9	31,0	34,7	34,6
60°C	3,4	3,5	3,9	3,5	3,6

Kit Comercial Enzygnost					
Temperatura	Produtor A		Produtor B		
	Lote 1624/12 (µg/mL)	Lote 4178/12 (µg/mL)	Lote 3027/12 (µg/mL)	Lote 3032/12 (µg/mL)	Lote 3585/12 (µg/mL)
4 °C	80,8	80,1	30,6	35,6	37,4
60 °C	3,4	3,5	3,8	3,6	3,7

5.4 Correlação dos resultados obtidos através das metodologias *in vivo* e *in vitro* com as amostras de vacinas combinadas pentavalente do produtor A

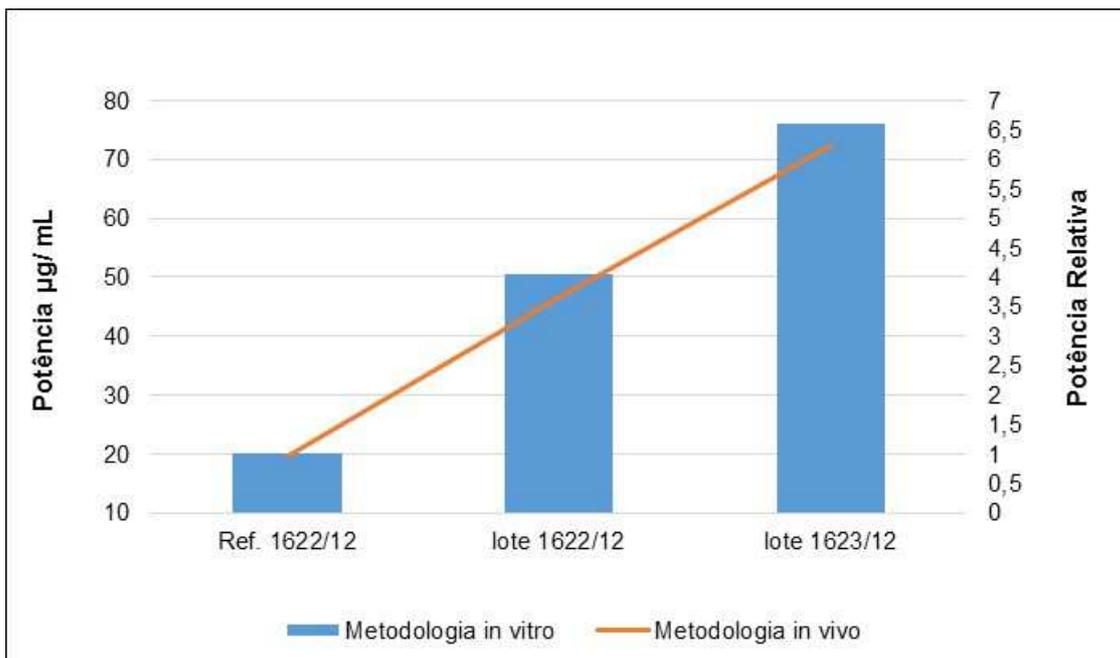
A figura 12 apresenta a correlação dos resultados obtidos pelas metodologias *in vivo* e *in vitro* utilizando as amostras de vacinas combinada pentavalente do produtor A (lotes 1622/12 e 1623/12). O lote 1622/12 foi usado como amostra e como referência interna.

Os resultados encontrados de potência relativa para as amostras avaliadas pelo método *in vivo* foram 3,65 e 6,25 para os lotes 1622/12 e 1623/12, respectivamente.

Os valores de concentrações (potência) obtidos para os mesmos lotes através do método *in vitro* foram 50,5 µg/mL (1622/12) e 76,0 µg/mL (1623/12).

O lote 1622/12 usado como referência interna apresentou resultados em torno de 20 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio *in vitro* e potência relativa de 0,98 (limite de confiança superior da potência relativa igual a 1,09) no ensaio *in vivo*.

Figura 12: Correlação dos resultados obtidos pelas metodologias *in vivo* e *in vitro* utilizando as amostras de vacinas combinadas do **produtor A**



5.5 Estatística comparativa dos resultados das amostras dos produtores A e B de vacinas combinadas pentavalente utilizando os Kits Murex e Enzygnost, pelo teste t-Student pareado

Na análise estatística foi aplicado o teste t-Student pareado para comparação dos resultados obtidos nos ensaios de potência do componente HBsAg com amostras de vacina combinada dos dois produtores, utilizando os kits comerciais Murex e Enzygnost. O resultado mostrou um p-valor maior que o nível de significância de 0,05, indicando que não se pode provar que estatisticamente o Kit Murex e o Kit Enzygnost apresentam resultados diferentes (Tabela 8).

Tabela 8: Teste t-Student pareado para comparação dos resultados de potência encontrados nos Kits Murex e Enzygnost

	valor- <i>p</i>
Produtor A	0,3974
Produtor B	0,9410

6 DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento de formulação de vacinas, o produtor deve determinar o efeito da combinação a ser realizada. A experiência tem mostrado que a combinação de vacinas monovalentes pode resultar numa nova combinação menos segura ou eficaz do que seria desejável. Por vezes, os componentes de vacinas inativadas podem atuar negativamente sobre um ou mais dos componentes ativos. Um desses casos ocorreu quando a combinação da vacina de difteria, toxoides tetânico, *pertussis* acelular (DTPaP) e vacina Hib resultou em uma resposta imune reduzida ao *Haemophilus influenzae* tipo b (ESKOLA, et. al, 1996, PICHICHERO, et al., 1997, GREENBERG, et al., 1995, SCHMITT, 1995). É de extrema importância validar a compatibilidade dos componentes combinados. O produto pode ser caracterizado e a integridade dos componentes ser avaliado através da realização de testes físico-químicos e biológicos. Para demonstrar ainda mais a compatibilidade dos componentes, recomenda-se que sejam realizados os ensaios também em um modelo animal adequado, para determinar as conseqüências de combinações de potência e imunogenicidade (GOLDENTHAL, et. al, 1995, FDA, 1997).

Da mesma forma, as características físicas, incluindo a ressuspensão e a adequação do recipiente e fechamento para a associação devem ser avaliadas. Se a combinação de vacinas de componentes resulta em um volume demasiado grande para ser seguramente administrado, o produtor pode avaliar a redução da dose de alguns ou todos os componentes e restaurar para um volume final ideal, utilizando concentrado intermediário de bulks para atingir concentrações finais iguais às vacinas de componentes monovalentes.

Na redução da variabilidade, duração e custos de testes de potência em vacinas, pela metodologia *in vivo* alguns produtores e o laboratório de controle nacional, INCQS tem desenvolvido metodologias *in vitro* baseadas em ensaio do tipo imunoenzimático – ELISA para a avaliação da potência do componente HBsAg nas vacinas monovalente e combinadas (COSTA, 2011; OMS, 2009). Esses ensaios são produto-específico, utilizando kits comerciais ou *in house* para a quantificação do HBsAg, com o uso de amostras de vacinas de lotes finais dos diferentes produtores.

Os requisitos gerais para agentes como conservantes, adjuvantes, e outros materiais constituintes que podem ser adicionados à vacina durante ou no final do processo de

produção, estão descritos nas normas oficiais (FDA, 2013b). Em uma vacina de combinação, o conservante ou um agente estabilizador numa vacina monovalente pode alterar a potência dos outros componentes. Por exemplo, o timerosal afetou a potência da vacina poliomielite inativada (IPV) na sua combinação com vacina contra difteria, tétano e pertussis. O uso de conservantes pode ser evitado se as vacinas são fornecidas em frascos de dose única. A inclusão de um conservante (timerosal) não elimina a necessidade de uma vacina de combinação ser avaliada para a potência para cada um dos componentes ativos. Não foi avaliado o conteúdo de timerosal através de ensaios devido as diversas avaliações de potência realizadas. Entretanto, foram feitas avaliações dos valores descritos nas composições das bulas das vacinas combinadas pentavalente dos produtores A e B. As vacinas contêm apenas traços de timerosal como resíduo do processo de produção da vacina ou concentração de 0,005% por dose de 0,5 mL. Valores esses correspondentes ao valor de referência preconizado nas normas oficiais para o produto que não pode ser < do que 85% e nem exceder 115% do valor rotulado do frasco da vacina (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2012).

Inicialmente foi avaliada a necessidade ou não da dissociação do adjuvante das amostras de vacinas através de soluções dissociadoras do adjuvante (fosfato de alumínio), através de duas soluções (DEA e citrato), para avaliação da potência do componente HBsAg nas vacinas selecionadas. Os resultados de concentrações em torno de 80 µg/ mL de HBsAg nas amostras, após a dissociação do adjuvante com DEA, sugere ser mais eficiente quando comparado com o uso da solução Citrato de sódio e sem a dissociação do adjuvante. Os autores não mencionam estudos de dissociação do adjuvante, entretanto, já demonstraram que em vacinas combinadas pode ocorrer diminuição da resposta de um ou mais componentes da vacina, devido à competição antigênica com o adjuvante resultando em uma alteração na proporção antígeno – adjuvante (SESARDIC, et al., 1999). No caso da combinação com vacina DTP a imunogenicidade da vacina de Hepatite B pode variar, dependendo se foi adsorvida a hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio (ELLIS, 1999). A partir dessas informações, a escolha do adjuvante na formulação da vacina deve levar em consideração as cargas superficiais do antígeno e do adjuvante (AL-SHAKHSHIR, et al., 1995). As cargas elétricas do adjuvante e do antígeno devem ser opostas para facilitar a atração eletrostática e adsorção.

A potência, tal como definido, é a capacidade específica do produto para efetuar um resultado determinado, conforme indicado por testes laboratoriais adequados ou por dados

clínicos controlados adequadamente obtidos através da administração da forma pretendida. Para um produto de combinação, a potência de cada componente para o qual é feita uma reivindicação de eficácia deve ser determinada. A potência de cada componente deve cumprir com a potência de exigência para o produto monovalente a menos que possa ser determinado que qualquer redução de potência, devida à interação com outros componentes do produto de combinação, não resulta em uma redução da eficácia em seres humanos. Os testes de potência devem detectar qualquer interação dos componentes que possam interferir no efeito do outro componente (FDA, 2013a).

No presente estudo foram realizadas etapas de avaliações de possíveis interferências dos componentes contidos nas formulações das vacinas combinadas pentavalente. Foram utilizadas amostras de vacinas combinadas sem o componente HBsAg (DTP+HIB e DTP) com o objetivo de avaliar se poderia ou não ter influência dos outros antígenos nos resultados obtidos pelo ELISA e amostra de vacina com o componente HBsAg (DTP+Hepatite B) para comprovar especificidade do kit para o antígeno da hepatite B. Os resultados de densidades óptica inferiores ao controle negativo do kit (0,2) utilizando o kit murex mostraram que o kit é específico para quantificação do HBsAg. Portanto, mostrou que não ocorreu interferência das outras proteínas na avaliação da potência do HBsAg.

Devido a diversidade na reatividade de vacinas contendo HBsAg produzidas por diferentes processos de produção em que os adjuvantes foram adicionados por meio de métodos diferentes, um único material de referência não é adequado para a normalização de vacinas contra a hepatite B, em ensaios *in vivo* ou *in vitro*. Assim, os produtores são obrigados a estabelecer uma vacina de referência do produto específico, que é feita com base no lote de vacina que demonstra ser mais eficaz nos ensaios, sendo da mesma origem das vacinas a serem testadas (OMS, 2014c).

Assim sendo, após as avaliações dos resultados de potência da dissociação ou não do adjuvante foi selecionada a metodologia sem a dissociação do HBsAg para a continuidade dos ensaios. A escolha do uso das amostras de vacina sem a dissociação foi devido ao fato da diferença encontrada para os resultados de potência não serem considerados significativos em ensaios biológicos. Inicialmente, foi utilizada a vacina monovalente (3529/01) como referência interna para eleger dois lotes de vacina combinada como referência, para os produtores A e B. Os lotes eleitos 1622/12 e 3032/12, com o uso dos kits comerciais Murex e enzygnost respectivamente, foram submetidos previamente a uma etapa de diluição para que

obtivesse a concentração de uma vacina monovalente em torno de (20 μ g/mL). De acordo com os dados da literatura essa concentração confere títulos de anticorpos em torno de 10mUI/mL, após a terceira dose da aplicação da vacina (OMS, 2014c).

Para a metodologia *in vitro* foram utilizados dois diferentes kits comerciais (Murex e Enzygnost), usando diversos parâmetros descritos no Anexo 1, com objetivo de avaliar a potência do componente HBsAg através do ensaio do tipo ELISA. Pelos resultados de potência obtidos pelos KIT MUREX e o KIT ENZYGNOST, a estimativa da potência *in vitro* da vacina contra hepatite B pode ser afetada pela metodologia utilizada. Então, foi escolhida a curva de concentração 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ng/mL para avaliação da potência utilizando o KIT MUREX e a curva 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 ng/mL para o KIT ENZYGNOST. Após o estabelecimento dos protocolos com as curvas eleitas foram feitas análise de reprodutibilidade dos resultados, usando um número maior de lotes de amostras de vacinas combinada pentavalente para os produtores A e B. Os resultados apresentados mostraram diferentes concentrações de potência entre os produtores A e B, devido à diversidade na reatividade das vacinas (OMS, 2010).

Na metodologia *in vivo* foi utilizado o Kit Enzygnost Anti-HBs II com objetivo de se obter avaliação de anti-HBsAg com as mesmas amostras selecionadas no estudo *in vitro*, para avaliação entre apresentação da vacina pentavalente com a monovalente. A não realização do ensaio *in vivo* com amostras do produtor B foi devido ao fato da proposta do estudo ser *in vitro*; e no *in vivo* necessitar de um quantitativo maior de animais. Sendo, os resultados obtidos com o produtor A considerados suficientes para abordagem do estudo da imunogenicidade.

Os resultados de potência relativa foram todos muito acima da potência relativa do lote eleito como referência interna (0,98/20 μ g/mL). O valor preconizado nas normas oficiais para o ensaio *in vivo*, na avaliação da potência relativa da vacina contra a hepatite B é o limite de confiança superior (95%) da potência relativa ser no mínimo 1,0 (FARMACOPÉIA EUROPEIA, 2012). O objetivo dos estudos de imunogenicidade comparativa deve ser descartar importantes diferenças entre a resposta à vacina combinada em comparação com a monovalente. Se os níveis de anticorpos induzidos pela vacina de combinação são mais baixos do que os que são induzidos pelas vacinas monovalentes, em tais casos, o produtor deve fornecer dados clínicos ou informações para apoiar a premissa de que a resposta mais baixa não afetará a eficácia protetora do produto.

Testes de potência quantitativos são geralmente considerados necessários para avaliar a atividade biológica de cada componente ativo de uma vacina de combinação e também podem servir como uma importante medida da estabilidade do produto. Testes de estabilidade do produto são essenciais para selecionar um período apropriado para expiração, bem como para futuras extensões do período de validade. Na maioria dos casos, os parâmetros de estabilidade (por exemplo, potência, e de esterilidade) são avaliadas através da utilização de dados em tempo real, em condições ideais de armazenamento (OMS,1998). Os estudos de estabilidade são necessários para cada apresentação do produto final, como frascos de doses múltiplas e simples e seringas pré-cheias.

Estudos demonstram que a vacina contra a hepatite B (HB) é estável durante até quatro anos a temperaturas de 2°C a 8°C, durante meses a 20°C a 25°C, durante semanas a 37°C e durante dias a 45°C. Tal como acontece com outras vacinas adsorvidas em sais de alumínio, o congelamento da vacina HB pode causar uma redução significativa da potência. O ponto de congelamento da vacina HB é de cerca de -0,5°C (OMS, 1998).

Os testes de potência *in vitro* devem ser capazes de distinguir vacinas de baixa potência. Para tanto, podem ser utilizadas amostras de vacina com potência reduzida artificialmente (OMS, 2010).

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostraram a capacidade dos kits selecionados de distinguirem os lotes de vacinas combinadas pentavalente com potência reduzida, após serem submetidos à situação de estresse (60°C/ 7 dias), quando comparados com os resultados obtidos com os mesmos lotes mantidos a 4°C.

Experimentos feitos para avaliações da termoestabilidade sugerem que o aumento ou diminuição da temperatura tem influência direta no produto. É conhecido que para aumentar a estabilidade térmica das vacinas com adjuvantes contendo alumínio, deve-se utilizar na formulação uma combinação de tampões para alterar a superfície química do adjuvante (pH) e controlar o estado de ionização das cadeias laterais dos aminoácidos do antígeno (CLAPP, 2011).

Para realização das análises estatísticas dos resultados obtidos com as amostras de vacinas combinadas pentavalente, com uso dos kits comerciais Murex e Enzygnost foram usadas os testes formais de hipóteses de equivalência. Inicialmente, para demonstrar a equivalência ou semelhança de taxas e proporções foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Para ambos os conjuntos os valores de p-

valor foram maiores que o nível de significância (0,05), confirmando que não há dados estatísticos que venham a comprovar a não normalidade dos dados.

Então, através do teste t-Student pareado observou-se que a hipótese nula foi aceita, pois não houve diferença significativa nos resultados de potência das amostras de vacina combinada utilizando os kits Murex e Enzygnost para os produtores A e B. Isto foi comprovado através do resultado do p-valor maior que o nível de significância de 5%.

Foi aplicado também um teste de adequação de ajuste chamado Kruskal-Wallis a um nível de significância de 0,05 que realiza a comparação entre duas distribuições. Como o p-valor para ambos os produtores foram maiores que o nível de significância (0,05) foi concluído que os resultados obtidos com o uso dos diferentes Kits não apresentaram distribuições estatisticamente diferentes.

7 CONCLUSÃO

- A metodologia do ensaio *in vitro* foi estabelecida para avaliação da potência das amostras de vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) dos produtores A e B;
- A dissociação do adjuvante fosfato de alumínio utilizando a solução DEA mostrou resultados superiores na quantificação do componente HBsAg. Entretanto, a escolha do uso da não retirada do adjuvante foi devido a uma diferença não significativa encontrada pela metodologia estabelecida;
- Foi possível eleger lotes de referência interna para os dois produtores, através do uso de uma vacina monovalente produzida na mesma levedura (*Hansenula polymorpha*) das amostras de vacinas selecionada para o estudo;
- Avaliação da possível interferência dos demais componentes da vacina na potência do componente HBsAg mostrou ausência de reatividade para os componentes (difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* - b);
- Os kits comerciais selecionados para detecção do HBsAg (murex e enzygnost) foram adequados para a proposta do estudo por serem específicos;
- Avaliação estatística mostrou que não houve diferença significativa nos resultados de potência das amostras de vacina combinada dos produtores A e B, utilizando os kits Murex e Enzygnost.

8 PERSPECTIVAS

- Validar o método *in vitro* para avaliação da potência do componente HBsAg nas vacinas combinadas;
- Estabelecer critérios de especificação do teste de potência com base nos resultados encontrados no estudo;
- Avaliar a potência do componente HBsAg nas vacinas combinadas pentavalente e heptavalente de outros produtores.

REFERÊNCIAS

AL-SHAKHSHIR R.H., et al. Interactions in model vaccines composed of mixtures of aluminum-containing adjuvants. **Journal of Colloid and Interface Science**, 169, p. 197- 203, 1995.

ALTWEB. 3 Rs and Alternatives Organizations. **International alternatives organizations database**. 2010. Disponível em http://caat.jhsph.edu/international_alternatives. Acesso em : 27 jan. 2014.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Report of the Committee on Infectious Diseases. **Red Book**, 25ed., 2000.

ANDRE F.E, BOOY R, BOCK HL et al. Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. **Bulletin of the World Health Organization**. 86(2), 140–146, 2008.

ARISTEGUI J, USONIS V, COOVADIA H et al. Facilitating the WHO expanded program of immunization: the clinical profile of a combined diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Haemophilus influenzae type B vaccine. **International Journal of Infectious Diseases**, v.7, n.2, p.143–151, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Hepatites virais em números**. 2013. Disponível em <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>. Acesso em: 27 jan. 2014.

_____. Informe técnico - **Introdução da vacina pentavalente**. 2012a. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tecnico_vacina_pentavalente.pdf. Acesso em: 30 out. 2012.

_____. Portal Brasil. **Casos de tétano no Brasil tem queda de 44%**. 2012b. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/10/casos-de-tetano-no-brasil-tem-queda-de-44>. Acesso em: 27 jan. 2014.

_____. Informações Técnicas. **Coqueluche**. 2012c. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31671. Acesso em: 30 out. 2012.

_____. Portaria n. 597 de 8 de abril de 2004. Institui, em todo território nacional, o calendário básico de vacinação. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, n. 69, 12 de maio de 2004. Seção 1.

_____. Ministério da Saúde. PNI 30 anos. **Programa Nacional de Imunizações**, Brasília, 2003.

CASTRO, R. S. Epidemiologia da Hepatite Vírica. **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas**, Lisboa, 2:89-99, 1999.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - Travelers' Health. Chapter 3 Infectious Diseases Related To Travel. **Hepatitis B**. 2013. Disponível em <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-b>. Acesso em: 29 jan. 2014.

_____. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable. **7th Edition** 2002a.

_____. Guidelines for Viral hepatitis Surveillance and Case Management. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta p.1-43, 2002b.

_____. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. **6th Edition**. 2000.

CLAPP T., et.al. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 388 - 401, 2011.

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

DANE, D.S.; CAMERON, C.H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis. **Lancet**, v.1, p.695-698, 1970.

DECKER MD. Principles of pediatric combination vaccines and practical issues related to use in clinical practice. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.20, n.1, supp 1, p.s10–s18, 2001.

DECKER M, BOGAERTS H, EDWARDS K. Combination vaccines. In: **Vaccines**. 5th edition. Plotkin SA, Orenstein W, Offit PA (eds). Saunders Co., PA, USA 1069–1101, 2008.

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

DUTTA AK, VERGHESE VP, PEMDE HK, MATHEW LG, ORTIZ E. Immunogenicity and safety of a pentavalent diphtheria, tetanus, acellular pertussis, inactivated poliovirus, *Haemophilus influenzae* type b conjugate combination vaccine (pentaxim) with hepatitis B vaccine. **Indian Pediatrics**, 46(11), p. 975–982, 2009.

EDWARDS KM, DECKER MD. Combination vaccines: hopes and challenges. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.13, n.5, p. 805–839, 1994.

ELLIS R.W. Development of combination vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 1635- 1642, 1999.

EMA – THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. Pharmaceutical and biological aspects of combined vaccines. **Human Medicines Evaluation Unit**. London, 23 july 1998.

ESKOLA J, OLANDER RM, HOVI T, LITMANEN L, PELTOLA S, KAYHTY H. Randomised trial of the effect of co-administration with acellular pertussis, DTP vaccine on immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. **Lancet**, v. 348, p. 1688–1692, 1996.

FARMACOPÉIA EUROPÉIA. 7.5 supplement. 2012

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CFR – Code of Federal Regulations Title 21. **CITE: 21CFR 600.3**. v. 7, 2013a. Disponível em:

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=600.3>. Acesso em: 10 mar. 2014.

_____. CFR – Code of Federal Regulations Title 21. **CITE: 21CFR 610.15**. v. 7, 2013b. Disponível em:

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=610.15>. Acesso em: 10 mar. 2014.

_____. Guidance for industry for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: production, testing and clinical studies. **Center for Biologics Evaluation and Research**, 1997.

GRANOFF, D. M.; CATES, K.L. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines. **The Journal of Pediatrics**, v. 107, n.3, p.330-336, 1985.

GREENBERG DP, WONG VK, PARTRIDGE S, HOWE BJ, JING J, WARD JI. Evaluation of a new combination vaccine that incorporates diphtheria, tetanus, acellular pertussis (DTaP), hepatitis B (HB) and *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate (PRP-T) vaccines [abstract G70]. In: Program and abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco). Washington, DC: **American Society for Microbiology**, 1995: 170

GOLDENTHAL KL, BURNS DL, MCVITTIE LD, LEWIS BP JR, WILLIAMS JC. Overview—combination vaccines and simultaneous administration: past, present and future. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1995; 754: xi–xv.

JEZEK, J. et al. A heat-stable hepatitis B vaccine formulation. **Human vaccines**, 5:8, p 529-535, 2009.

JUNIOR, J.B.S. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.22, n.1, p.7-8, Jan-mar 2013.

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

MOKROUSOV, I. *Corynebacterium diphtheriae*: genome diversity, population structure and genotyping perspectives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 1-15, Jan. 2009.

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

OBARO SK, PALMER A. Vaccines for children: policies, politics and poverty. **Vaccine**. v. 21, n.13-14, p. 1423-1431, 2003.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Immunization, Vaccines and Biologicals. **Pertussis**. 2014a. Disponível em

<http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/index.html>. Acesso em: 23 jan. 2014.

_____. Hepatitis B. **Fact Sheets 204**. 2014b. Disponível em

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> . Acesso em: 27 jan. 2014.

_____. Biologicals. **Vaccine Hepatitis B**. 2014c. Disponível em

http://www.who.int/biologicals/vaccines/Hepatitis_B/en/. Acesso em: 29 jan. 2014.

_____. Vaccine Safety Basics. **Combination Vaccines**. 2014d. Disponível em

<http://www.vaccine-safety-training.org/combination-vaccines.html>. Acesso em: 29 jan. 2014.

_____. Diseases Hepatitis B. **Surveillance and control**. 2012a. Disponível em

<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo20022/en/index4.html#incidence>.

Acesso em: 30 out. 2012.

_____. **Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of DT-Based**

Combination Vaccines. Proposed replacement of TRS 800, Annex 2. 3 rd draft version of 30 jan. 2012b.

_____. **Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines**. Proposed replacement of: TRS 786, Annex 2 and TRS 889, Annex 4. 2010.

_____. Hepatitis B Vaccines. **Weekly epidemiological record**, 84: 405-420, 2009.

_____. Guidelines on stability evaluation of vaccines. **WHO/BS/06.2049**. 2006.

_____. Global Programme for Vaccines and Immunization. **Thermostability of vaccines**. Geneva, 1998.

PICHICHERO ME. New combination vaccines. **Pediatric Clinics of North America**, v.47, n.2, p.407–426, 2000.

PICHICHERO ME, LATIOLAIS T, BERNSTEIN DI, ET AL. Vaccine antigen interactions after a combination diphtheria-tetanus toxoid-acellular pertussis/purified capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b–tetanus toxoid vaccine in two-, four- and six-month-old infants. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16, p.863–870, 1997.

POOLMAN, J. T. Polysaccharides and membrane vaccines. In: MIZRAHI, A. **Advances in Biotechnological Processes- Bacterial Vaccines**. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 57-86.

RHEE, P. et al. Tetanus and trauma: a review and recommendations. **Journal of Trauma**, v. 58, n. 5, p. 1082-1088, 2005.

ROPER, M.H.; VANDELAER, J.H.; GASSE, F.L. Maternal and neonatal tetanus. **Lancet**, v. 370, n. 9603, p. 1947–1959, December 2007.

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

SCHMITT HJ. Immunogenicity and reactogenicity of 2 Hib tetanus conjugate vaccines administered by reconstituting with DTPa or given as separate injections [abstract G63]. In: Program and abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco). Washington, DC: **American Society for Microbiology**, 1995:169.

SES-SC - SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Gerência de vigilância doenças imunopreveníveis e imunização. Informe Técnico- **Campanha nacional de multivacinação para atualização do Esquema vacinal**. Secretaria de Estado da Saúde, 2013.

SES-SP - SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. Informe Técnico- **Situação Epidemiológica da Coqueluche**. Secretaria de Estado da Saúde, 2011.

SESARDIC D., et al. Non-pertussis components of combination vaccines: problems with potency testing. **The International Association for Biologicals**. V. 27, p. 177-181, 1999.

SIMON F, FRANCOIS D, EMIROGLU G. Combined hepatitis B vaccines. **Vaccine**. v.21, n. 6, p.1310, 2003.

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

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

WONG, D.T.; NATH, N.; SNINSKY, J. J. Identification of hepatitis B virus polypeptides encoded by the entire pre-S open reading frame. **Journal of Virology**, v.55, p. 223-231, 1985.

ANEXO 1 – Padronização dos protocolos para avaliação da potência do componente da hepatite B nas vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) de diferentes produtores

Kit Murex					
Parâmetros	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo Final produtor A	Protocolo Final produtor B
Curva de concentração	0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL	0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL	0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL	0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL	0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 ng/mL
Solução para dissociação do adjuvante fosfato de alumínio	-	DHEA; Triton X-100 e PBS	Citrato de sódio à 20 %	-	-
Volume, temperatura e tempo de rotação para dissociação do adjuvante	-	500 µL; 25°C/ 30 min e 15000 rpm / 10 s	300 µL; 37°C/ 12h e 2000 rpm/ 5 min	-	-
Vacina de referência	Lote 3529/01	Lote 3529/01	Lote 3529/01	Lote 1622/12	Lote 3032/12
Vacinas com componente HBsAg do Produtor A	Lotes 1622/12; 1623/12 e 1624/12	Lotes 1622/12; 1623/12 e 1624/12	Lotes 1622/12; 1623/12 e 1624/12	Lotes 1623/12; 1624/12; 3481/12; 4176/12; 4178/12; 1014/12 e 1015/12	-
Vacinas com componente HBsAg do Produtor B	-	-	-	-	Lotes 3027/12; 3585/12; 4181/12; 1020/13; 1023/13; 1399/13; 1402/13 e 2152/13

Kit Enzygnost		
Parâmetros	Protocolo Final	Protocolo Final
	produtor A	produtor B
Curva de concentração	2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 ng/mL	2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 ng/mL
Vacina de referência	Lote 1622/12	Lote 3032/12
Vacinas com componente HBsAg do Produtor A	Lotes 1623/12; 1624/12; 3481/12; 4176/12; 4178/12; 1014/12 e 1015/12	-
Vacinas com componente HBsAg do Produtor B	-	Lotes 3032/12; 3027/12; 3585/12; 4181/12; 1020/13; 1023/13; 1399/13; 1402/13 e 2152/13