

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

Danielle da Silva Almeida

**ESTABILIDADE DA VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA): UMA
AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA APÓS SUA RECONSTITUIÇÃO**

Rio de Janeiro

2012

Almeida, Danielle da Silva.

Estabilidade da vacina febre amarela (atenuada): uma avaliação da potência após sua reconstituição / Danielle da Silva Almeida, Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

47 f., il., tab.

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

Orientadores: Maria Aparecida Affonso Boller e Fernando César Ferreira

1. Febre Amarela. 2. Vacinas Virais. 3. Vigilância Sanitária. 4. Estabilidade de Medicamentos. I-Título

Danielle da Silva Almeida

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA)
APÓS RECONSTITUIÇÃO

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

Orientadores: Maria Aparecida Affonso Boller
Fernando César Ferreira

Rio de Janeiro

2012

Danielle da Silva Almeida

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA)
APÓS RECONSTITUIÇÃO**

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

Aprovado em 12/ 01/ 2012

BANCA EXAMINADORA

Lúcia Maria Corrêa Werneck (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Clarice Lima do Canto Abreu (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Evanilce Ferreira (Mestre)
Instituto Tecnológico em Imunobiológicos

À minha família dedico esta monografia e
todas as vitórias em minha vida.

AGRADECIMENTO

Uma conquista verdadeira tem sabor de amizade; sem ela os caminhos ficam mais difíceis e às vezes inatingíveis. Pude contar com a colaboração de meus amigos, minha família e em especial meu marido. Sou muito grato aos meus orientadores, pois sem eles minha engrenagem lógica não partiria. Ao finalizar este trabalho, expresso meus agradecimentos sinceros àquelas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua realização e, em especial:

- A Deus, pela vida, pelos estudos, pelas grandes oportunidades.
- A Evanilce Ferreira, meus agradecimentos por ter me ajudado com valiosas sugestões para a elaboração desse projeto.
- A Maria Aparecida Affonso Boller, minha orientadora, meus agradecimentos pelas valiosas sugestões e correções durante todo o desenvolvimento do trabalho.
- Ao Fernando César Ferreira, meu orientador e chefe, meus agradecimentos pelos ensinamentos e valiosas sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho e pela compreensão nos momentos em que fiquei ausente.
- A Lilia Ribeiro Serodio pela oportunidade e confiança.
- Ao amigo Paulo Cesar Dick pelo apoio nos gráficos estatísticos.
- A minha amiga Cibele por ter perdido um domingo de sol para ficar me ajudando na elaboração do pré-projeto.
- A minha amiga Natalia por ter feito minha inscrição nesse curso.
- Aos meus amigos, Carlos José, Gabriel e Beatriz que pude contar quando estava ausente, pois seguraram todo o trabalho no SBCEL.
- A minha amiga e companheira de corrida Isabel pelo grande auxílio e ombro amigo em todos os momentos.
- A minha nova amiga Alê por ter perdido alguns dos seus preciosos dias me ajudando na finalização deste trabalho.
- Aos colegas de turma pela amizade, conversas e contribuições.
- Ao Mário, meu marido, e meus filhos Marcella e Arthur em reconhecimento pela paciência, carinho e apoio incondicional em todos os momentos.
- A minha Mãe Eliane, pelo apoio e incentivo e ao meu pai João que eternamente estará presente em minha vida, me dando sabedoria e força.
- A todos os demais que de alguma forma contribuíram com o trabalho, meus agradecimentos.

RESUMO

A febre amarela (FA) é uma doença viral aguda, transmitida por mosquitos vetores, que pode causar doença grave e morte. O vírus da FA é um membro da família *Flaviviridae* do gênero *Flavivirus*. No Brasil, todas as regiões já apresentaram casos da doença e o número de casos fatais tem aumentado. Até o presente, a vacinação é o meio mais eficaz para prevenir e controlar a febre amarela. A partir de 2011, o número de doses de vacina de febre amarela solicitado tanto pelo Ministério da Saúde quanto para exportação aumentou. Para garantir o suprimento da vacina febre amarela (atenuada) aos órgãos nacionais e internacionais em momentos de maior demanda, assim como aumentar a oferta e melhorar o aproveitamento de doses distribuídas, evitando o desperdício de uma vacina estável, estudos de estabilidade foram realizados visando à extensão do período da validade do produto reconstituído por um período de até 8 horas e mantido à temperatura de até 25 °C, condição diferente da expressa pelo produtor (até 6 horas se mantidas de 2 °C a 8 °C). Os resultados obtidos sugerem uma extensão do período da validade do produto após reconstituição de 6 para 8 horas como também a recomendação opcional da temperatura de 2 °C a 8 °C ou ambiente controlado de 25 °C, resultando em economia de recursos e melhor aproveitamento de milhares de doses do imunizante.

ABSTRACT

Yellow fever is an acute viral disease transmitted by mosquitoes, which can cause serious illness and death. The yellow fever virus is a member of the genus *Flavivirus* family *Flaviviridae*. In Brazil, all regions have had cases of the disease and the number of fatalities has increased. Until now, vaccination is the most effective means to prevent and control yellow fever. From 2011, the amount requested by both the Ministry of Health and for export increased. To guarantee supply of yellow fever vaccine (attenuated) to national and international bodies in times of high demand, as well as increase supply and improve the use of doses distributed, avoiding the loss of a stable vaccine, stability studies were performed in order to extend the period of validity of the reconstituted product for a period of up to 8 hours and kept at 25 °C, a different condition from the expressed by the producer (6 hours since kept 2°C to 8 °C). The results suggest an extension of validity period of the product after reconstitution from 6 to 8 hours as well as the optional recommendation of 2 to 8 °C or controlled environment of 25 °C, resulting in savings of resources and better use of thousands of doses of the immunizing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura do vírus da febre amarela. A. Formas extra e intracelulares do vírus. B. Forma molecular	13
Figura 2: Modelo esquemático do genoma dos flavivírus (Adaptado de RICE, 1996)	15
Figura 3: Ciclos urbano e silvestre da febre amarela (BRASIL, 2004)	16
Figura 4: Ocorrência da febre amarela no mundo	17
Figura 5: Distribuição geográfica das áreas consideradas endêmicas de febre amarela no Brasil. Em amarelo nota-se a presença do vírus nas regiões Norte, Centro-Oeste, parte do Sudeste, parte do Nordeste e partes isoladas da região Sul	18
Figura 6: Fluxograma da distribuição e conservação dos lotes da vacina febre amarela (atenuada) produzidos por BM	22
Figura 7: Esquema para realização do estudo	27
Figura 8: Títulos da vacina febre amarela (atenuada) após reconstituição	31
Figura 9: Análise estatística das vacinas VFA	33
Figura 10: Análise estatística das vacinas VFC	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema utilizado para diluição das amostras de vacina febre amarela (atenuada) para a realização do teste de potência	28
Tabela 2: Estimativa dos coeficientes e erros-padrão dos resultados de VFA pós-reconstituição e mantidas a 2 - 8 °C	35
Tabela 3: Estimativa dos coeficientes e erros-padrão dos resultados de VFA pós-reconstituição mantidas a 25 °C	35
Tabela 4: Estimativa dos coeficientes e erros-padrão dos resultados de VFC pós-reconstituição e mantidas de 2 – 8 °C	36
Tabela 5: Estimativa dos coeficientes e erros-padrão dos resultados de VFC pós-reconstituição, mantidas a 25 °C	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANCOVA	análise de covariância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BM	Bio-Manguinhos
°C	graus Celsius
CC	controle de células
CENADI	Central Nacional de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos
CO ₂	dióxido de carbono
C	capsídeo
CQ	controle da qualidade
DEQUA	Departamento de Controle de Qualidade
DEGAQ	Departamento da Garantia da Qualidade
DI	documento interno
[10 X]	dez vezes concentrado
DL	dose letal
DNA	ácido desoxirribonucleico
E	envelope
EE	estudo de estabilidade
FA	febre amarela
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IC	intervalo de confiança
ICH	<i>The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IP	intervalo preditivo
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
LD ₅₀	dose letal em 50%
LE	limite de especificação
Log 10 PFU/DH	Unidade formadora de Plaque (<i>Plaque Forming Unit</i>) em logaritmo na base 10 por dose humana

Log 10 PFU/mL	Unidade formadora de Plaque (<i>Plaque Forming Unit</i>) em logaritmo na base 10 por mililitro
MS	Ministério da Saúde
MR	material de referência
µg	microgramas
µL	microlitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PNI	Programa Nacional de Imunizações
POP	Procedimento Operacional Padronizado
Pré-M	pré-membrana
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
r-DNA	DNA recombinante
RE	Resolução Especial
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
RNC	região não codificante
SBCEL	Seção de Banco de Células
SFB	Soro Fetal Bovino
SEPOT	Seção de Potência
UFP	unidades formadoras de placas
UI	unidades internacionais
VFA	Vacina Contra Febre Amarela de 5 Doses
VFC	Vacina Contra Febre Amarela de 10 Doses
VR	vacina de referência
WFI	<i>Water for injection</i> (água para injetáveis)
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 ETIOLOGIA	13
1.2 TRANSMISSÃO	15
1.3 EPIDEMIOLOGIA	16
1.4 PATOGENIA E PATOLOGIA	18
1.5 PREVENÇÃO E CONTROLE	19
1.5.1 A vacina febre amarela (atenuada)	20
1.5.2 Distribuição da vacina febre amarela (atenuada)	22
1.5.3 Situação atual da vacina febre amarela atenuada no Brasil	22
1.6. ESTUDO DE ESTABILIDADE	23
1.6.1 Histórico da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada)	24
1.7 JUSTIFICATIVA	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 PLANO DE AMOSTRAGEM E LOTES DE VACINA UTILIZADOS NO ESTUDO	27
3.2 CULTURA DE CÉLULAS	27
3.2.1 Reconstituição da vacina	28
3.2.2 Diluição da amostras de vacinas	28
3.2.3 Inoculação e incubação das placas de 6 orifícios com células Vero	29
3.2.4 Determinação do número de UFP	29
4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A febre amarela é uma arbovirose, que tem o mosquito *Aedes aegypti* como principal vetor da doença que, por mais de 300 anos, tem sido caracterizada pela importante morbidade e alta letalidade nas regiões tropicais da África e das Américas (BENCHIMOL, 2001).

No Brasil, a febre amarela apareceu pela primeira vez em 1685, em Pernambuco, onde permaneceu durante 10 anos, chegando a Salvador no ano seguinte. Em 1691, no Recife, ocorreu o que poderia ser chamado da primeira campanha sanitária no Brasil, apoiado pelo governador Marquês de Monte Belo e, posteriormente, foi mantido um período de silêncio epidemiológico por cerca de 150 anos no país (CALHEIROS, 1988; BRASIL, 1999; BRASIL, 2010).

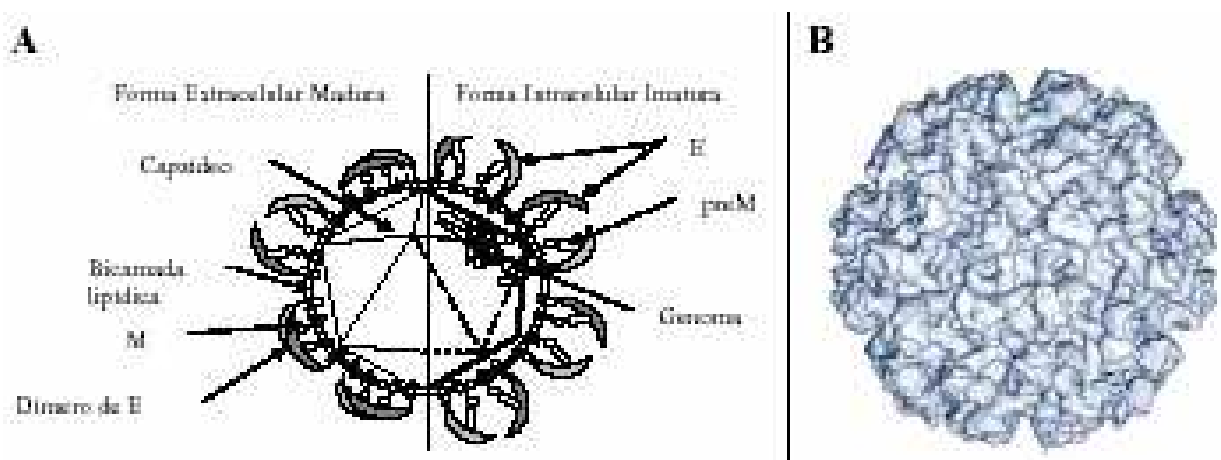
Somente em 1849 a febre amarela ressurgiu em Salvador, mesmo ano em que o *Aedes aegypti* instalou-se no Rio de Janeiro, provocando a primeira epidemia da doença nesse estado. Até 1899, o *Aedes aegypti* já tinha se propagado por todo o país, levado principalmente por navios que partiam de cidades portuárias. Entretanto, a instalação dos vetores não se limitou somente a estas cidades, difundindo-se também para o interior do Brasil, ocasionando epidemias desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (CALHEIROS, 1988; BRASIL, 1999).

Em 1901, Emílio Ribas, diretor do Serviço Sanitário do Estado de São Paulo, promoveu na cidade de Sorocaba a primeira campanha contra a febre amarela, adotando medidas específicas contra o *Aedes aegypti*. Dois anos depois, em 1903, Oswaldo Cruz foi nomeado Diretor Geral de Saúde Pública e deu início à luta contra a doença, criando o Serviço de Profilaxia da Febre Amarela. Em 1909, a febre amarela foi considerada eliminada do Rio de Janeiro, capital do país. Em 1920, foi diagnosticado o primeiro caso de febre amarela silvestre no Brasil. Mas somente em 1932 essa forma da doença foi reconhecida pela comunidade científica. A última epidemia registrada em um centro urbano ocorreu entre 1928 e 1929, no Rio de Janeiro, com a confirmação de 738 casos e 478 óbitos. A partir daí, a febre amarela urbana continuou a ocorrer de maneira pouco expressiva até 1942, quando foram registrados os três últimos casos no Acre, na cidade de Sena Madureira (BRASIL, 2004).

1.1 ETIOLOGIA

Os vírus da febre amarela são classificados como representantes da família *Flaviviridae*, gênero flavivírus (MONATH & HEINZ, 1996). São partículas esféricas, envelopadas, apresentando em sua superfície as proteínas E e M (Figura 1.A). O seu nucleocapsídeo mede 40 - 60 nm de diâmetro (BELL et al., 1985), e é formado pela proteína C, associados ao genoma viral (MURPHY, 1980).

Figura 1: Estrutura do vírus da febre amarela. A. Formas extra e intracelulares do vírus. B. Forma molecular.



Nos flavivírus, o genoma é constituído por uma única molécula de ácido ribonucléico (RNA), de polaridade positiva, que se apresenta com *cap* no terminal 5' e sem poliadenilação no terminal 3' (MURPHY, 1980). O modelo esquemático deste genoma pode ser observado na Figura 1.B.

O RNA genômico apresenta uma única sequência aberta que codifica uma poliproteína de aproximadamente 350 kDa de massa molecular, que é clivada seletivamente tanto por proteases constitutivas da própria célula hospedeira, quanto por proteases, codificadas pelo genoma viral (CHAMBERS, NESTOROWICZ & RICE, 1995; YAMSHCHIKOV & COMPANS, 1995), dando origem a três proteínas estruturais (C, PrM (M) e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (RICE et al., 1985; STOCKS & LOBIGS, 1995).

No processo de interação flavivírus–célula, verifica-se que a endocitose das partículas é mediada pela rede de proteínas conhecidas como clatrininas para formar a vesícula endocítica. À medida que a vesícula vai sendo transportada, seu interior é gradualmente acidificado. Ao atingir a faixa de pH 6,0 - 6,2 ocorre uma mudança

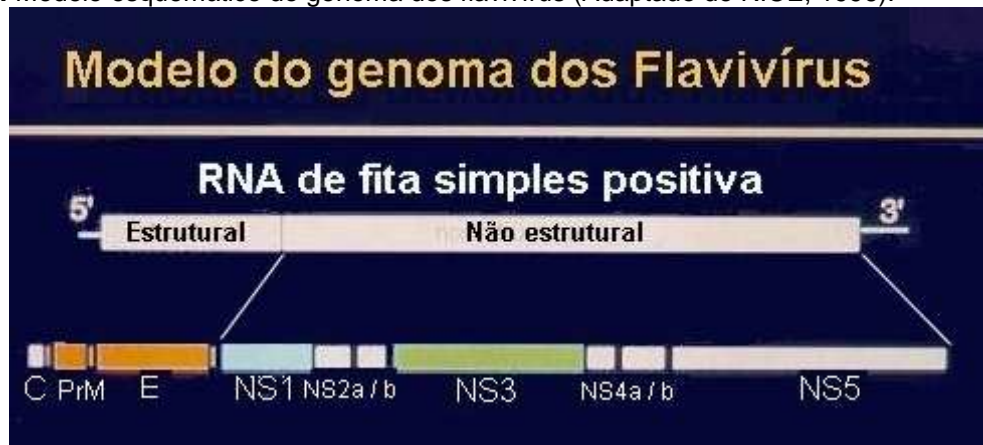
conformacional das proteínas E do envelope viral (POST, 1996). Esta modificação estrutural desencadeia o processo de fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endocítica (MONATH & HEINZ, 1996; RICE, 1996), que resulta na liberação dos nucleocapsídios no citoplasma da célula. Neste ambiente, tal como um mRNA da própria célula, o genoma viral é traduzido em uma atividade poliribossomal livre no citoplasma, dando início à síntese da proteína C.

Continuando a tradução do RNA genômico, são incorporados os aminoácidos hidrofóbicos, que constituem a sequência sinal da poliproteína. Devido à presença desta seqüência, o complexo de tradução (formado pelo mRNA, ribossoma e peptídeo nascente) é deslocado para a face citoplasmática do retículo endoplasmático. A síntese da poliproteína continua e o transporte é iniciado para o lúmen do retículo. (ALBERT et al., 1994; LEHNINGER, NELSON & COX, 1997).

As proteínas NS2B e NS3, após serem sintetizadas, formam heterodímeros com atividade de serina-protease, que promove a clivagem das proteínas sintetizadas subsequentemente (Figura 2). O término da tradução da poliproteína culmina com o aparecimento da proteína NS5. As interações das proteínas, NS2A-RNA-NS3-NS4A com a proteína NS5 promovem uma mudança conformacional nesta última (LINDENBACH & RICE, 1997), provavelmente, no sítio de interação com o RNA, originando o chamado, complexo de replicação que promove a síntese de novas moléculas de RNA (LINDENBACH & RICE, 1997; OLIVEIRA, 2004). Neste processo de formação do flavivírus, os nucleocapsídeos neoformados interagem com as espículas PrM e E, que estão inseridas na camada lipídica, com a imediata liberação das novas partículas para a luz do retículo ou do aparelho de Golgi (MACKENZIE & WESTAWAY, 2001). As proteínas PrM e E são inseridas no retículo endoplasmático sob a forma de dímeros (MURPHY, 1980.; WENGLER & WENGLER, 1989.; ALLISON et al., 1995). Quando a infecção por flavivírus ocorre em células deficientes de proteases, do tipo sinalases, as novas partículas produzidas contêm a proteína precursora PrM e, desta forma, são incapazes de desencadear a atividade fusogênica mediada pelas espículas E, quando expostas ao ambiente de pH ácido (STADLER et al., 1997; SANTOS, 2008).

As partículas recém-formadas seguem pela via de secreção das células e são liberadas por um processo semelhante a exocitose.

Figura 2: Modelo esquemático do genoma dos flavivírus (Adaptado de RICE, 1996).



1.2 TRANSMISSÃO

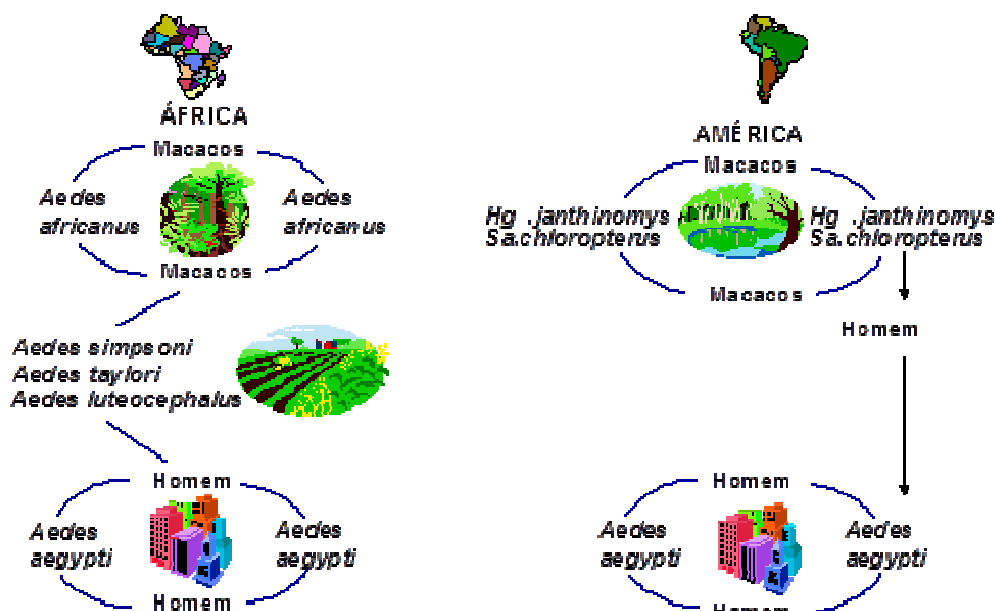
Em 1901 foi demonstrada experimentalmente que a febre amarela podia ser transmitida de uma pessoa a outra pelo mosquito *Aedes aegypti*. A divulgação da descoberta desencadeou uma série de campanhas contra o mosquito nos países onde a febre amarela era um problema de saúde pública. O vírus da febre amarela é mantido por dois ciclos básicos: um silvestre, onde os mosquitos responsáveis pela transmissão diferem na América e na África, e um ciclo urbano, onde o mosquito *Aedes aegypti* é o responsável pela disseminação nos dois continentes (Figura 3). No ciclo urbano, a transmissão pelo *Aedes aegypti* é feita diretamente ao homem passa pelo período de incubação extrínseca, tornando-se vetor infectado e irá transmitir o vírus a outras pessoas susceptíveis, iniciando o ciclo de transmissão: homem - *Aedes aegypti* - homem. O período de incubação extrínseca é o tempo em que o vetor se infectou até o momento a partir do qual ele se torna infectante. Este período leva, em média, de 9 a 12 dias e é inversamente proporcional à temperatura, isto é, tanto menor quanto maior for a temperatura (BRASIL, 2004).

Nas Américas, o ciclo silvestre é distinto do africano. Os responsáveis pela transmissão são os mosquitos do gênero *Haemagogus* (*Hg. janthinomys*, *Hg. albomaculatus* entre outros) e *Sabethes* (*Sa. chloropterus*, *Sa. Soperi* entre outros). O *Hg. janthinomys* é o principal responsável pela transmissão da febre amarela. Este mosquito apresenta a maior distribuição geográfica conhecida entre as espécies desse gênero. Ele possui hábitos exclusivamente silvestres e pica o indivíduo que se expõe na floresta. Esta espécie mostra-se em melhores condições

de transmissão do vírus amarelo, pois é extremamente suscetível ao mesmo. É primatófila, ou seja, se alimenta preferencialmente em macacos e, secundariamente, no homem, e apresenta hábitos diurnos, período no qual o homem realiza suas atividades ou incursões na mata (VASCONCELOS, 2002).

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

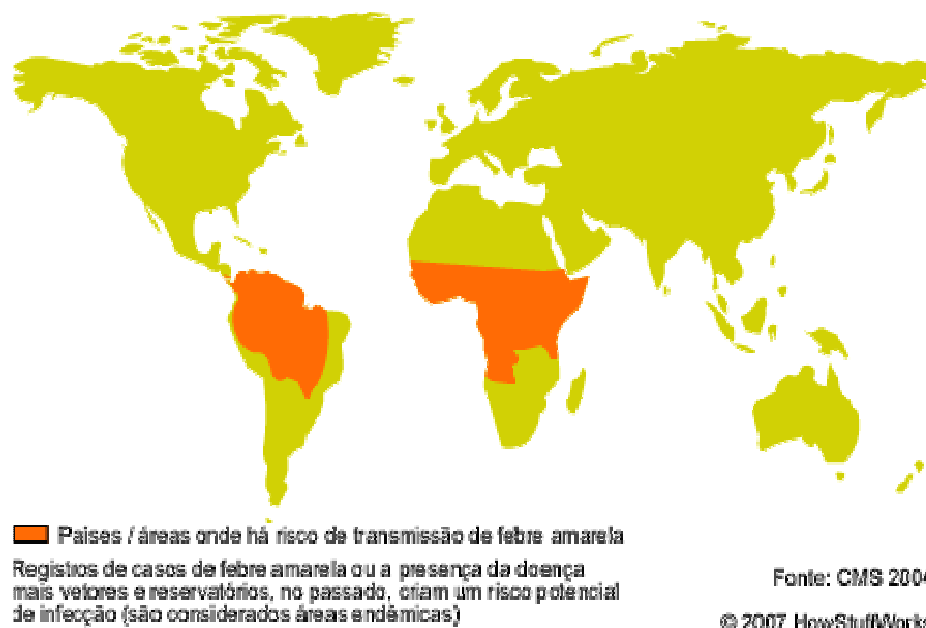
Figura 3. Ciclos urbano e silvestre da febre amarela (BRASIL, 2004)



1.3 EPIDEMIOLOGIA

Atualmente, a OMS notifica aproximadamente 90% dos casos de febre amarela na África (Figura 4), representando cerca de 5.000 casos anuais, enquanto na América do Sul estima-se a ocorrência de 300 casos anuais (VASCONCELOS, 2003).

Figura 4: Ocorrência da febre amarela no mundo.



Em alguns países da África ainda persiste a transmissão urbana da doença. A forma silvestre é endêmica nas regiões tropicais da África e das Américas. Em geral, apresenta-se sob a forma de surtos com intervalos de 5 a 7 anos, alternados por períodos com menor número de registros (BRASIL, 2009).

Nas Américas, ocorre desde a Nicarágua até o sul da Bolívia (BRASIL, 2004). No Brasil, a ressurgência da doença nos últimos anos da década de 90 e nos primeiros anos da década de 2000, fez somente incrementar as campanhas de vacinação (BARNETT, 2007).

No Brasil, área epidemiológica de risco, era no início do século, quase que totalidade do território brasileiro, mas com a erradicação da forma urbana da febre amarela foi possível delimitar 4 (quatro) áreas epidemiologicamente distintas no país: 1 - Enzoótica ou endêmica, 2 - Epizoótica ou de transição, 3 - Indene de risco potencial, 4 - Área indene (BRASIL, 2004).

Atualmente, *Aedes aegypti* infesta 3.952 municípios brasileiros e *Aedes albopictus* infesta 1.533 e a interação entre essas espécies é importante, pois se desenvolvem nos mesmos criadouros artificiais e são muito comuns em áreas de grande concentração humana (BRASIL, 2004), o que as torna áreas de risco da doença (Figura 5).

Figura 5: Distribuição geográfica das áreas consideradas endêmicas de febre amarela no Brasil, em amarelo nota-se a presença do vírus nas regiões Norte, Centro-Oeste, parte do Sudeste, parte do Nordeste e partes isoladas da região Sul.



Fonte Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde (04/04/2008 - *on line*).

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

1.4 PATOGENIA E PATOLOGIA

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

Após a inoculação pelo mosquito, o vírus da febre amarela infecta e se replica em células dendríticas epidérmicas, fibroblastos e macrófagos nos linfonodos

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

Nas formas leves e moderadas da doença, a sintomatologia é indiferenciada, não característica, e se confunde com muitas doenças comuns nas áreas endêmicas, como malária, febre tifóide, mononucleose infecciosa. Na forma moderada, o paciente pode apresentar náuseas sem vômitos, bem como, mialgias e artralgias que não incomodam o paciente e não dificultam a sua locomoção. A febre só cede mediante o uso de antitérmicos. Acompanha este quadro pelo menos um dos sintomas clássicos da doença: hematêmese (vômito negro), ictérica ou oligúria/anúria (VASCONCELOS, 2003).

1.5 PREVENÇÃO E CONTROLE

A febre amarela faz parte das doenças de notificação compulsória, e como tal qualquer caso suspeito deve ser comunicado a autoridade mais próxima. Algumas ferramentas importantes tais como erradicação dos vetores, vigilância epidemiológica e vacinação, podem ser utilizadas para dificultar a manifestação da febre amarela urbana (COLLIER, 2000; BRASIL, 2005a).

A vigilância epidemiológica tem desempenhado um papel importante na prevenção de surtos de febre amarela em humanos. Segundo a Lei 8080/1990 (BRASIL, 1990), vigilância epidemiológica é um conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou a prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva e tem a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças e agravos

(BRASIL, 1990). Faz parte da vigilância epidemiológica, a vigilância de epizootias, entomológica e de casos humanos (BRASIL, 2005c).

O controle e a prevenção da febre amarela podem ser realizados pela vacinação e pelo controle dos mosquitos vetores. A vacinação confere proteção individual e coletiva à população, bloqueia a propagação geográfica da doença, criando uma barreira de imunidade, e previne epidemias (BRASIL, 2005b). Uma vez instalada a doença, o tratamento é somente sintomático, pois não existe nenhum tratamento específico e efetivo contra a doença febre amarela (WHO, 2000).

O controle dos mosquitos vetores pode ser realizado utilizando medidas para sua eliminação. Entre as medidas utilizadas, pode-se citar a eliminação de criadouros tendo como método de primeira escolha o controle mecânico como remoção e destruição; aplicação de larvicidas autorizados como medida complementar; o uso de repelentes e telas protetoras por parte da população; além da orientação da população com relação aos meios de evitar a proliferação dos vetores (BRASIL, 2001).

1.5.1 A vacina febre amarela (atenuada)

A vacina febre amarela (atenuada) foi inicialmente desenvolvida nos Estados Unidos, em 1936, por meio da adaptação à passagem seriada do vírus selvagem em embriões de camundongos e ovos de galinha embrionados, dando origem à cepa 17D.

O vírus da febre amarela 17 D originou-se do primeiro isolado em 1926 de um jovem africano de nome Asibi por passagem em macaco Rhesus (STOKES et al 1928). Entre 1935 e 1937, a cepa selvagem denominada Asibi, sofreu adaptação através de numerosas passagens em cultura de embrião de camundongo, de embrião de galinha e posteriormente em cultura de embrião de galinha sem tecido do sistema nervoso central (THEILER & SMITH, 1937). Nesta fase, a cepa passou a ser denominada 17 D. Em 1936, a cepa 17 D, de passagem 227^a, foi usada pela primeira vez como vacina em Nova York.

Na Fundação Oswaldo Cruz, esta cepa foi subcultivada até a passagem 243^a em ovos embrionados, passando a ser designada 17 DD (SOPPER, 1937). Objetivando a manutenção da integridade e propriedade viral, Bio-Manguinhos (BM) adotou o sistema de lote semente primária, e a partir deste, por passagem em ovos

embrionados, originaram vários lotes sementes secundárias, os quais estão liofilizados e estocados à -70°C . A massa viral (originário do lote semente secundário) que hoje é obtida para produção de lotes de vacinas contra febre amarela em BM, corresponde à passagem de número 286^a a partir da amostra atenuada original 17 D. Portanto, a vacina contra a febre amarela é a primeira no mundo a usar o sistema de lotes-sementes, isto é, os lotes originais do vírus atenuado são submetidos a uma nova passagem em ovos embrionados, dando origem a lotes secundários que servirão de fonte para a produção do imunizante (BIO-MANGUINHOS, 2002; BIO-MANGUINHOS 2004).

O Brasil é o único país, que por mais de sete décadas utiliza a cepa 17 DD na produção de vacina 5, 10 e 50 doses (POST et al., 2001) que recentemente teve seu produto incluído no Expanded Program on Immunization (EPI) em países da África.

Desde o final da década de 30, a vacina febre amarela (atenuada) constituiu a linha de produção mais bem sucedida da Fundação Oswaldo Cruz (BENCHIMOL, 2001). Eles produziam o equivalente a 80% da produção mundial, suprimindo não somente às necessidades nacionais, como também às de outros países suscetíveis. Em 1976, criou-se o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos em BM que seria responsável pela produção de vacinas bacterianas e virais e que assumiu a tarefa de continuar a produção da vacina para febre amarela (BENCHIMOL, 2001).

Bio-Manguinhos é o único produtor nacional que, além de suprir a demanda do Programa Nacional de Imunização (PNI), exporta o excedente para governos e instituições públicas estrangeiras. Em 2001, após a pré-qualificação da vacina pela Organização Mundial da Saúde (OMS), passou a deter o direito de fornecê-la para as agências das Nações Unidas. Nestes últimos trinta anos, participou ativamente para aperfeiçoar tanto o processo de produção quanto o desenvolvimento tecnológico da vacina (BENCHIMOL, 2001).

A vacina febre amarela (atenuada) é considerada altamente imunogênica, segura, efetiva e está indicada em indivíduos com mais de seis meses de idade, sendo ministrados em dose única e com reforço a cada dez anos. Esta vacina é rotineira no PNI do Ministério da Saúde (PNI/MS), criado em 1986, nas zonas endêmicas, de transição e de risco potencial, sendo recomendada a todas as pessoas que se deslocam à zona endêmica (FIGUEIREDO, 2007).

1.5.2 Distribuição da vacina febre amarela (atenuada)

As vacinas demandadas pelo PNI são produzidas em BM são transportadas em caminhões frigoríficos para a Central Nacional de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos (CENADI), local em que permanecem em câmaras frias até a aprovação dos lotes de vacinas e diluentes pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Uma vez liberados, a CENADI envia lotes em caixas térmicas para as Coordenações Estaduais, onde são conservados em câmaras frias. Desta mesma forma, é feito o transporte para as Centrais Regionais, onde as vacinas também ficam armazenadas. Nas centrais regionais, os representantes dos postos de vacinação retiram a quantidade de vacinas necessárias por um determinado período de tempo para a área onde atuam (Figura 6).

Figura 6: Fluxograma da distribuição e conservação dos lotes da vacina febre amarela (atenuada) produzidos por BM



1.5.3 Situação atual da vacina febre amarela (atenuada) no Brasil

Bio-Manguinhos é reconhecido internacionalmente como fabricante da vacina febre amarela (atenuada). Desde 1937, as preparações vacinais são obtidas em seus laboratórios a partir da cepa atenuada 17DD do vírus da febre amarela (atenuada), cultivada em ovos embrionados de galinha livres de agentes

patogênicos, de acordo com as normas estabelecidas pela OMS (BIO-MANGUINHOS, 2002).

As vacinas produzidas em BM têm a sua qualidade garantida por um processo produtivo onde cada etapa é monitorada segundo as regras do mais atualizado sistema de garantia da qualidade, de forma a garantir a rastreabilidade dos resultados de cada ação (BIO-MANGUINHOS, 2002).

No Laboratório de Controle Microbiológico, a vacina febre amarela (atenuada) é submetida aos testes de Endotoxina (LAL), Ovoalbumina, Esterilidade, Potência, Termoestabilidade, Identidade, perda do título na termoestabilidade e estudo de estabilidade (DIAS, 2003).

Atualmente a vacina febre amarela (atenuada) é fornecida nas apresentações de 5 e 10 doses para assegurar o atendimento da demanda nacional e internacional.

1.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Estabilidade é a capacidade de o produto de manter suas propriedades químicas, físicas, biológicas e microbiológicas dentro dos limites especificados durante seu prazo de validade. A estabilidade das vacinas tem um grande impacto no sucesso dos programas de imunização em todo o mundo. Portanto, a avaliação da estabilidade é um ponto chave para garantir a qualidade e eficácia de todos os produtos farmacêuticos, em especial as vacinas (WHO, 2006a).

Os estudos de estabilidade são realizados com a finalidade de fornecer evidências de como a qualidade do produto em questão varia com o tempo (ICH 2003). Historicamente, os testes de estabilidade das vacinas eram baseados somente na sensibilidade destes produtos à temperatura (JADHAV et al., 2009). Atualmente, a influência de outros fatores ambientais como umidade e luz, também pode ser avaliada. Além disso, os fatores relacionados ao próprio produto, como as propriedades físicas e químicas das substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica, composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, também devem ser considerados na avaliação final (ICH, 2003 ; BRASIL, 2005a).

Os estudos de estabilidade podem ser divididos em prazo de validade provisório (teste de estabilidade acelerado), prazo de validade definitivo (teste de estabilidade de longa duração), período de utilização (teste de estabilidade de longa

duração) e estabilidade de acompanhamento (teste de estabilidade de longa duração) (ICH, 1995, BRASIL, 2005a ; WHO, 2006a).

1.6.1 Histórico da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada)

Há anos, numerosos estudos demonstraram pouca estabilidade das vacinas febre amarela (atenuada) preparada sem estabilizadores, perdendo sua atividade quando armazenada a - 20 °C ou + 5 °C por seis meses, deterioram-se muito rapidamente a altas temperaturas (LOPES, 1987; LOPES, 1988; ISHAK, 1990; SOOD, 1993).

Visando resolver e/ou evitar o problema da perda da potência das vacinas, vários fabricantes têm introduzido vacinas com estabilidade acentuada. Meios como a lactose, sorbitol, histidina e alanina, gelatina hidrolizada, entre outros, têm promovido consideravelmente a estabilidade ao calor da vacina liofilizada 17D, demonstrando com isso, que vacinas estabilizadas podem ser usadas com mais segurança em diferentes condições ambientais (LOPES, 1987; LOPES, 1988; ISHAK, 1990; SOOD, 1993).

A introdução de estabilizadores melhorou consideravelmente a estabilidade térmica das vacinas liofilizadas. Contudo, existem declínios similares na titulação quando a vacina estabilizada é mantida continuamente a 37 °C e quando é submetida alternadamente a 37 °C e 4 °C (WHO, 2006a).

Como norma estabelecida pela WHO, a vacina contra a febre amarela (atenuada) após os testes de termoestabilidade (37 °C por 2 semanas) deve reter um título de 1000 LD₅₀ (teste em camundongos) e a perda do título da vacina estocada - 20 °C ou 2 - 8 °C, comparada ao da termoestabilidade (37 °C por 2 semanas), não deve ser maior que 1 log₁₀.

Cada produtor deve estabelecer uma relação entre as metodologias LD₅₀ e UFP. Nesse sentido, estudos internos (dados não apresentados) demonstraram que 0,73 log₁₀ a diferença entre as duas metodologias. Assim, as vacinas de febre amarela produzidas em BM, após os testes de termoestabilidade, devem reter um título $\geq 3,73 \log 10$ UFP por dose humana (DH).

Segundo normas, na estabilidade do produto acabado (vacina), além de estudos da avaliação de campo como: pré-clínicos e clínicos, e laboratoriais como: análises físicas, químicas e microbiológicas, o produto deve ser testado quando

reconstituído e o nível de degradação (perda de potência) quando armazenado às temperaturas de 2 °- 8 °C e – 20 °C pelo prazo de 36 meses (WHO, 2006a).

Os estudos de estabilidade são itens imprescindíveis no registro de produtos biológicos e também fazem parte das Boas Práticas de Fabricação (BPF). A legislação nacional existente que trata deste assunto é a RE 1/2005, que publicou o guia para a realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005a) e que revogou a RE 398/2004.

1.7 JUSTIFICATIVA

As vacinas produzidas em BM têm a sua qualidade garantida por um processo produtivo onde cada etapa é monitorada segundo as regras do mais atualizado sistema de garantia da qualidade, de forma a garantir a rastreabilidade dos resultados de cada ação (BIO-MANGUINHOS, 2002).

Nesse panorama, o Controle da Qualidade está inserido como uma atividade essencial em BM, onde assegura que seus produtos estejam de acordo com os padrões internacionais estabelecidos. O Departamento de Qualidade é composto por Laboratórios que analisam os produtos de acordo com as exigências preconizadas pelas Agências Regulatórias como ANVISA e OMS.

Segundo recomendações da OMS, a vacina febre amarela (atenuada) após sua reconstituição, deve ser conservada em banho de gelo (temperatura próxima de 0 °C) utilizada dentro de seis horas, e em seguida descartada. O presente estudo de estabilidade tem como finalidade verificar a estabilidade da vacina febre amarela (atenuada), após a sua reconstituição. Este estudo irá fornecer informações necessárias para os postos de saúde, quanto ao tempo de utilização da vacina, após a sua reconstituição, sem que a mesma perca a sua capacidade de imunizar o indivíduo (BIO-MANGUINHOS, 2004; WHO, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a consistência da produção da vacina de febre amarela (atenuada) em BM através do estudo de estabilidade do produto após sua reconstituição para uso dos postos de saúde.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a potência da vacina febre amarela (atenuada) em períodos de 3, 6 e 8 horas após reconstituição sob temperaturas de 2 - 8 °C, 25 °C e 37 °C.

3 METODOLOGIA

3.1 PLANO DE AMOSTRAGEM E LOTES DE VACINA UTILIZADOS NO ESTUDO

A figura 7 demonstra os 3 lotes de vacina febre amarela (atenuada) 5 doses (VFA) e os 3 lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses (VFC) utilizados no estudo. Três frascos de cada lote foram utilizados para obtenção das médias dos títulos nos respectivos tempo/temperatura.

Figura 7: Esquema para realização do estudo.

Lotes		Tempo (horas) da realização do teste após a reconstituição									
		T0		T3		T6		T8			
VFA 5 doses	093VFA023Z	Temperaturas avaliadas (°C)									
	096VFA035Z										
	096VFA037Z										
VFC 10 doses	096VFA011Z	2-8	2-8	25	37	2-8	25	37	2-8	25	37
	096VFA012Z										
	096VFA013Z										

VFA= vacina febre amarela (atenuada) 5 doses; VFC= vacina febre amarela (atenuada) 10 doses; T0= Vacina titulada logo após reconstituição; T3= Vacina titulada 3 horas após reconstituição; T6= Vacina titulada 6 horas após reconstituição; T8= Vacina titulada 8 horas após reconstituição.

3.2 CULTURA DE CÉLULAS

A metodologia de Unidade Formadora de Placas (UFP) para determinação da concentração viral (WHO, 2006) foi realizada utilizando cultura de células Vero (rim de macaco verde africano – origem *American Type Culture Collection-ATCC*).

As células foram dispersas com uma solução de tripsina-EDTA, e em seguida ressuspensas em Meio 199 Eagle Earle's (Sigma®), 5% de soro fetal bovino (Invitrogen), 5% de NaHCO₃ 4,4% e 0,1% de sulfato de gentamicina 80 mg, de modo a conter uma concentração final de 3,0 x 10⁵ células/mL, para utilização em 24 horas. Um volume de 3,0 mL desta suspensão celular foi distribuído em cada orifício de uma placa, para cultivo celular, de 6 orifícios (35 mm de diâmetro/orifício). As placas foram incubadas numa temperatura de 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa de 95%.

3.2.1 Reconstituição da vacina

O diluente que acompanha cada apresentação da vacina febre amarela (atenuada) (água para injetáveis para 5 e 10 doses) deve estar entre 2 °C e 8 °C. Para a reconstituição da vacina, juntar lentamente, com auxílio de uma seringa e agulha estéreis, o volume do diluente gelado (2,5 mL para 5 doses, 5 mL para 10 doses) ao frasco de cada vacina liofilizada. O frasco da vacina deve ser agitado suavemente para evitar a formação de espuma, de maneira a obter uma suspensão uniforme.

3.2.2 Diluição das amostras de vacinas

A diluição da vacina reconstituída foi realizada através de diluição seriada (fator 4) em tubo de hemólise contendo 1,5 mL de meio-199, conforme disposição na tabela 1.

Tabela 1: Esquema utilizado para diluição das amostras de vacina febre amarela (atenuada) para a realização do teste de potência.

Volume (vacina)	Diluente*	Diluição
0,5 mL	1,5 mL	1:4
0,5 mL de 1:4	1,5 mL	1:16
0,5 mL de 1:16	1,5 mL	1:64
0,5 mL de 1:64	1,5 mL	1:256
0,5 mL de 1:256	1,5 mL	1:1024
0,5 mL de 1:1024	1,5 mL	1:4096

*diluente: Meio-199 + 5% de SFB

Uma alíquota de 0,5 mL da vacina reconstituída foi adicionada ao primeiro tubo de hemólise contendo 1,5 mL (meio de diluição). Após homogeneização e trocar a ponteira, foi retirado 0,5 mL dessa primeira diluição e adicionado ao segundo tubo. O procedimento foi repetido até ao último tubo de cada fila.

Nota: O processo foi realizado em cabine de segurança biológica-CSB; os tubos foram mantidos em banho de gelo; troca de ponteira foi realizada a cada diluição; uma vacina de febre amarela (material de referência – MR) foi utilizada para controle do teste em cada ensaio.

3.2.3 Inoculação e incubação das placas de 6 orifícios com células Vero

As placas contendo monocamada confluyente de células Vero foram numeradas em ordem crescente e devidamente identificadas (número da passagem, data de preparo, diluição utilizada, número do lote e frasco da vacina em estudo).

No momento do teste, o meio-199 das células Vero foi aspirado dos orifícios das placas e uma alíquota de 0,2 mL da vacina previamente diluída (1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 e 4096) em meio-199 (para diluição), foi inoculado em cada 3 orifícios da placa por diluição. Após adsorção de 1 hora em estufa a 37 °C com 5% CO₂ (homogeneizado a cada 15 minutos), o inóculo foi aspirado e 3 mL de *overlay* de Carboximetilcelulose a 3% foi adicionado em cada orifício da placa.

As placas foram incubadas em estufa à 38 °C com 5% de CO₂ durante 7 dias. A vacina de referência (VR) e uma placa de controle de células – CC (meio-199 como inóculo) foram utilizadas simultaneamente para controle dos testes.

3.2.4 Determinação do número de UFP

Após os 7 dias de incubação, as células foram fixadas com 2% de formaldeído por 1 hora e coradas com solução de cristal violeta a 0,1% por 10 minutos. Os plaques contados (com auxílio de negatoscópico) em cada diluição foram multiplicados pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos em log₁₀ UFP/DH.

Nota: Como normas do procedimento interno, foram consideradas as diluições que apresentaram entre 10 e 60 UFP.

4 RESULTADOS

Os resultados apresentados (Figura 8), correspondem a média dos 3 frascos utilizados em cada teste de potência com os lotes de vacina febre amarela (atenuada) 17 DD produzidos durante o ano de 2009 e mantidos à 2 - 8 °C .

As denominações T0, T3, T6 e T8, referem-se aos períodos (horas) em que os testes foram realizados, totalizando 4 momentos, após a reconstituição dos frascos contendo a vacina liofilizada.

Os títulos nos testes em T0 (momento logo após reconstituição) nos 6 lotes analisados (3 lotes VFA= 093VFA023Z, 096VFA035Z e 096VFA037Z e 3 lotes VFC= 096VFC011Z, 096VFC012Z e 096VFC013Z) apresentaram resultados homogêneos, com pouca variação e dentro da especificação, quando comparados ao momento da liberação do lote comercial (Figura 8).

A vacina (MR), estocada à - 20 °C, utilizada como controle nos testes de potência dos 3 lotes VFA e 3 lotes VFC, demonstrou considerável consistência de títulos obtidos nos 4 momentos (T0, T3, T6 e T8).

Os resultados demonstraram consistências, com pouca ou nenhuma perda dos títulos nos lotes das vacinas VFA e VFC após reconstituição e mantidos em temperatura de 2 °C - 8 °C e 25 °C até o momento T8. No entanto, o lote VFC 012Z apresentou uma perda de 0,47 log de 10 em T8/25°C.

Embora o lote 096VFC012Z em questão tenha apresentado uma perda maior, 0,47 log 10, em relação ao T0, o lote manteve um título de 4,62 log 10 UFP/DH em T8/25 °C, ou seja, bem acima do mínimo exigido pelo produtor que é de 3,73 log 10 UFP/DH.

Os testes com os lotes submetidos a 37 °C apresentaram perda gradativa de títulos em T3 e T6, e apenas os lotes VFA 037Z e o VFC 013Z apresentaram títulos 4,0 e 4,11 log 10 UFP/DH, respectivamente, acima do mínimo (3,73 log 10 UFP/DH), no entanto, os respectivos lotes, juntamente com os demais em estudo, apresentaram queda acentuada após T3/37°C, deixando bem claro, com isso, a extrema sensibilidade das vacinas reconstituídas mantidas em temperaturas 37 °C e tempo prolongado.

Figura 8: Títulos da vacina febre amarela (atenuada) após reconstituição.

APRESENTAÇÃO	Lotes Utilizados	Título da vacina no momento da liberação	Nº Frasco Utilizado / Média	Títulos da Vacina contra Febre Amarela Após Reconstituição											
				Resultados em log 10 UFP/DH											
				T0	T3		T6			T8					
2-8 °C	2-8 °C	25 °C	37 °C	2-8 °C	25 °C	37 °C	2-8 °C	25 °C	37 °C						
VFA	093VFA023Z	37 °C 4,51	Frasco	5,03	5,08	5,10	4,01	5,18	5,24	2,60	5,30	5,32			
		2-8 °C 4,91	Frasco	5,12	5,10	5,15	3,92	5,25	5,29	2,45	5,37	5,27			
	Frasco		<u>5,09</u>	<u>5,00</u>	<u>5,12</u>	<u>3,97</u>	<u>5,25</u>	<u>5,26</u>	<u>2,30</u>	<u>5,25</u>	<u>5,32</u>				
	096VFA035Z	37 °C 4,82	Frasco	5,15	5,33	5,29	4,98	5,55	5,41	3,10	5,58	5,09			
		2-8 °C 5,11	Frasco	5,21	5,17	5,19	4,99	5,37	5,40	3,10	5,63	5,25			
	Frasco		<u>5,21</u>	<u>5,27</u>	<u>5,36</u>	<u>4,99</u>	<u>5,44</u>	<u>5,16</u>	<u>3,99</u>	<u>5,67</u>	<u>5,32</u>				
	096VFA037Z	37 °C 4,83	Frasco	5,10	5,20	5,37	5,16	5,65	5,26	4,10	5,49	5,43			
		2-8 °C 5,20	Frasco	5,20	5,26	5,07	5,16	5,65	5,35	3,90	5,53	5,58			
	Frasco		<u>5,26</u>	<u>5,21</u>	<u>5,28</u>	<u>5,14</u>	<u>5,44</u>	<u>5,30</u>	<u>4,00</u>	<u>5,65</u>	<u>5,62</u>				
Frasco	5,19	5,22	5,24	5,16	5,58	5,30	4,00	5,56	5,54						
MR (Ref. Interno)			5,0	5,0			5,05		5,11						
VFC	096VFC011Z	37 °C 4,42	Frasco	4,80	4,68	5,02	4,73	4,78	5,02	3,05	5,12	5,14			
		2-8 °C 4,78	Frasco	4,86	4,6	5,17	4,68	4,66	4,93	3,08	4,86	4,85			
	Frasco		<u>4,67</u>	<u>4</u>	<u>4,93</u>	<u>4,63</u>	<u>4,84</u>	<u>4,81</u>	<u>2,76</u>	<u>4,95</u>	<u>5,09</u>				
	Frasco	4,78	4,76	5,04	4,68	4,76	4,92	2,96	4,98	5,03					
	096VFC012Z	37 °C 4,63	Frasco	5,17	5,18	4,93	4,18	5,10	4,52	2,61	5,13	4,59			
		2-8 °C 4,94	Frasco	5,02	5,10	4,64	4,36	5,06	4,51	2,68	5,11	4,58			
	Frasco		<u>5,09</u>	<u>5,01</u>	<u>4,81</u>	<u>4,49</u>	<u>5,03</u>	<u>4,46</u>	<u>2,45</u>	<u>5,16</u>	<u>4,69</u>				
	Frasco	5,09	5,10	4,79	4,34	5,06	4,50	2,58	5,13	4,62					
	096VFC013Z	37 °C 4,73	Frasco	5,11	5,21	5,16	4,74	5,28	5,07	4,24	5,43	5,12			
2-8 °C 4,93		Frasco	5,19	5,23	5,03	4,47	5,11	4,86	3,80	5,27	5,19				
	Frasco	<u>5,36</u>	<u>5,20</u>	<u>5,21</u>	<u>4,89</u>	<u>5,12</u>	<u>4,89</u>	<u>4,28</u>	<u>5,39</u>	<u>5,08</u>					
Frasco	5,22	5,22	5,13	4,70	5,17	4,94	4,11	5,36	5,12						
MR (Ref. Interno)			5,05	4,89			5,02		5,15						

MR (Material de referência interno); - = Não apresentou plaques no ensaio; T0, T3, T6 e T8 = Tempo em que as vacinas foram tituladas após a reconstituição.

Para avaliação de dados de estabilidade e sugerida pela FDA, inclui análise de covariância (ANCOVA) e regressão linear. A ANCOVA é utilizada para testar se as retas a serem ajustadas para descrever a tendência dos lotes apresentam diferenças significativas entre as inclinações e os interceptos. O nível de significância a ser usado é $\alpha = 0,25$, conforme sugestão do guia do FDA, pela pequena quantidade de lotes usada em estudos de estabilidade, o que torna o poder do teste relativamente baixo.

De acordo com os resultados obtidos na ANCOVA, três possibilidades de modelagem da tendência foram observadas:

- Diferença significativa entre inclinações — três retas concorrentes;
- Diferença significativa entre interceptos, mas sem diferença significativa entre inclinações — três retas paralelas;
- Sem diferença significativa tanto para inclinações quanto para interceptos — reta única.

O intervalo de 95% de confiança (IC95%) unilateral para a média foi empregado para avaliar se os resultados estão em um nível aceitável em relação ao limite de especificação. O prazo de validade é estimado como o tempo onde ocorre o intercepto entre o IC95% e o limite de especificação. Uma abordagem mais interessante envolveu também o uso do intervalo preditivo 95% (IP95%), envolvendo o erro do modelo ajustado e o erro possível de outras observações (dentro do período de estudo).

Os gráficos 1-10 (figuras 9 e 10) abaixo foram obtidos utilizando o programa R versão 2.11.1 (2010-05-31), The *R Foundation for Statistical Computing*, conforme títulos de VFA e VFC da figura 8.

Figura 9: Análise estatística dos lotes de VFA.

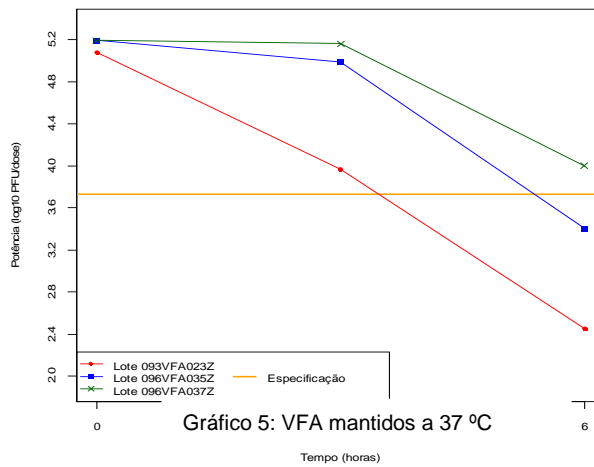
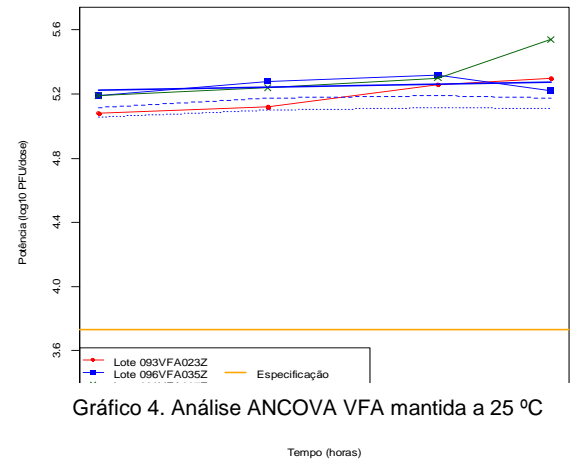
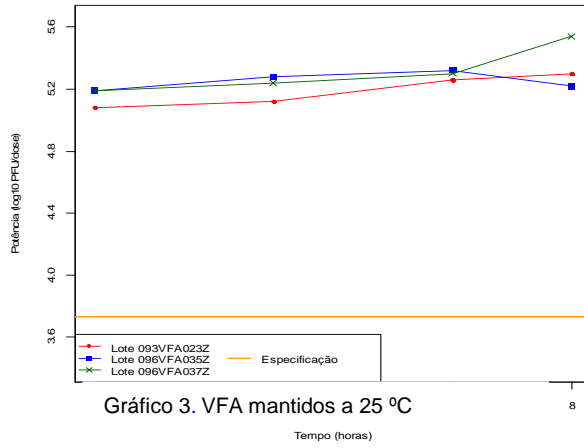
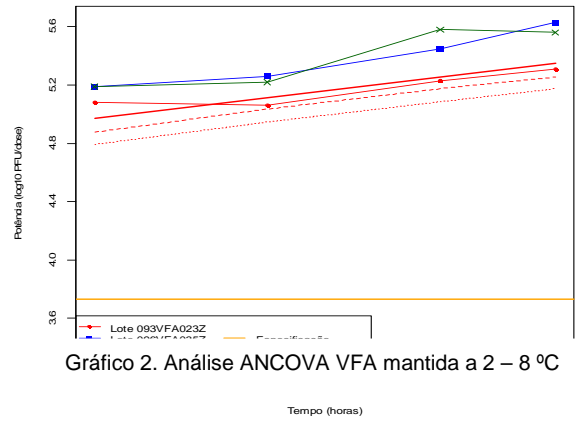
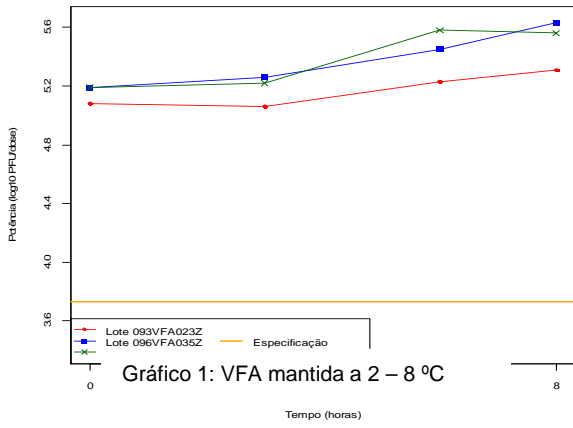


Figura 10: Análise estatística dos lotes de VFC

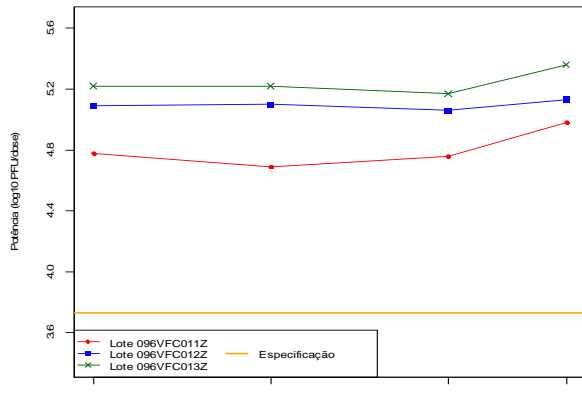


Gráfico 6: VFC mantida a 2 – 8 °C

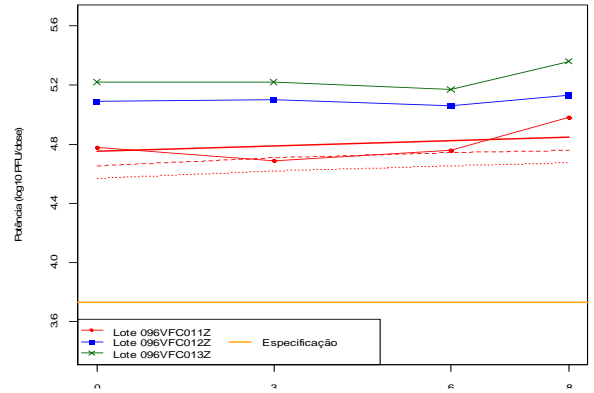


Gráfico 7: Análise ANCOVA VFC mantida a 2 – 8 °C

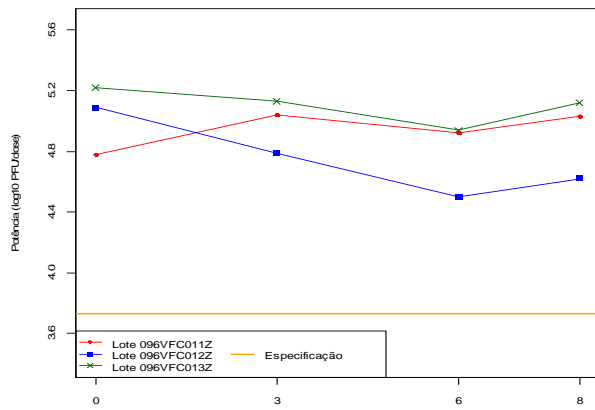


Gráfico 8: VFC mantidos a 25 °C

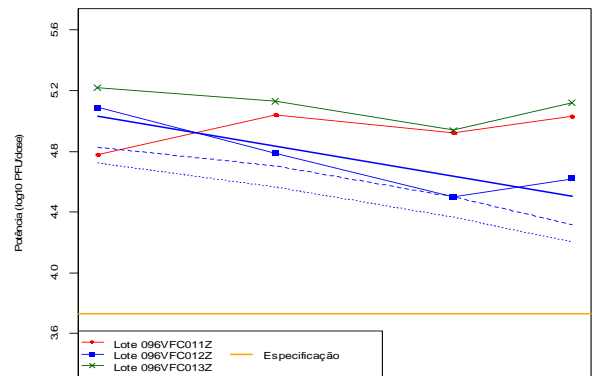


Gráfico 9: Análise ANCOVA VFC mantida a 25 °C

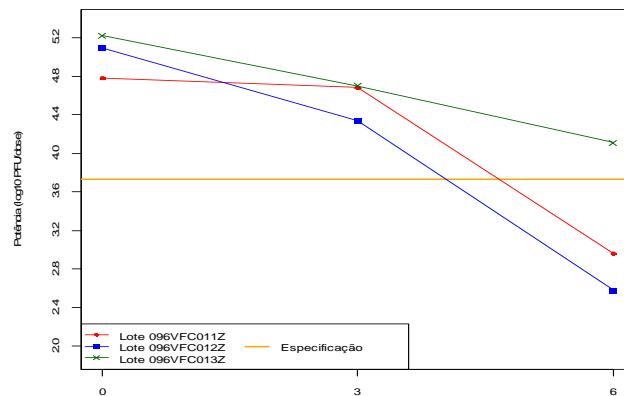


Gráfico 10: VFC mantida a 37 °C

Na avaliação dos resultados VFA pós-reconstituição mantidos a 2 – 8 °C pode-se notar que até 8 horas a potência é crescente, de maneira aproximadamente linear (Gráfico 1).

Pela ANCOVA, as inclinações não apresentaram diferença significativa ($p=0,376$) e os interceptos apresentaram diferença significativa ($p=0,012$). Desta forma, a modelagem apresentou três retas paralelas (Gráfico 2). As estimativas dos coeficientes do modelo e seus erros-padrão estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Estimativa dos coeficientes e erros-padrão dos resultados de VFA pós-reconstituição mantidas a 2 – 8 °C

	<i>Estimativa</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>p-valor</i>
Intercepto (lote VFA 023Z)	4,9695	0,0508	< 0,001
Diferença lote VFA 035Z em relação ao VFA 023Z	0,2125	0,05584	0,005
Diferença lote VFA 037Z em relação ao VFA 023Z	0,2175	0,05584	0,004
Inclinação	0,0472	0,0075	< 0,001

O lote 093VFA023Z (Gráfico 2) é o que apresenta menor nível médio de potência entre os três, mas ainda assim apresenta resultados bem acima do limite de especificação ($3,73 \log_{10}$ PFU/dose). Os intervalos de confiança e preditivo passam bem longe do limite de especificação, dando suporte estatístico ao fato de que, até o tempo 8 horas, o produto mantém uma potência dentro das especificações.

Os três lotes VFA mantidos a 25 °C (Gráfico 3) apresentaram diferença significativa entre inclinações ($p=0,166$) e também diferença significativa entre interceptos ($p=0,088$). As estimativas dos coeficientes do modelo e seus erros-padrão estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Estimativa dos coeficientes e erros-padrão dos resultados de VFA pós-reconstituição mantidas a 25 °C.

	<i>Estimativa</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>p-valor</i>
Intercepto (VFA 023Z)	5,0639	0,056676	< 0,001
Diferença lote VFA 035Z em relação ao VFA 023Z	0,1622	0,080152	0,089
Diferença lote VFA 037Z em relação ao VFA 023Z	0,0867	0,080152	0,321
Inclinação (VFA 023Z)	0,0297	0,010857	0,034
Diferença inclinação lote VFA 035Z em relação ao VFA 23Z	- 0,0235	0,015354	0,177
Diferença inclinação lote VFA 037Z em relação ao VFA 023Z	0,0096	0,015354	0,555

Os intervalos de confiança e preditivo são construídos com base no lote que apresenta os resultados menos favoráveis, que no caso é o lote VFA 035Z, pois, além de apresentar a menor inclinação, no tempo 8 horas este é o que apresenta a reta em uma posição mais próxima do limite de especificação (Gráfico 4).

Já a avaliação dos resultados de VFA mantidos a 37 °C (Gráfico 5), os títulos apresentam queda forte e instável a 37 °C, e já caem abaixo da especificação antes de 6 horas, logo não se recomenda o uso do produto sob esta condição de uso.

Os lotes de VFC mantidos a 2 – 8 °C (Gráfico 6 e 7) não apresentaram diferença significativa entre inclinações ($p=0,630$), no entanto, apresentaram diferenças significativas entre interceptos ($p=0,001$). Nesse caso, o modelo usado foi de 3 retas paralelas (Gráfico 7). As estimativas dos coeficientes do modelo e seus erros-padrão estão descritos na tabela 4

Tabela 4: Estimativa dos coeficientes e erros-padrão dos resultados de VFC pós-reconstituição mantidas a 2 – 8 °C.

	<i>Estimativa</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>p-valor</i>
Intercepto (lote VFC 011Z)	4,7505	0,0521	< 0,001
Diferença lote VFC 012Z em relação ao VFC 011Z	0,2925	0,0573	< 0,001
Diferença lote VFC 013Z em relação ao VFC 011Z	0,44	0,0573	< 0,001
Inclinação	0,0122	0,0077	0,151

Na avaliação dos resultados VFC mantidos a 25 °C, diferença significativa entre inclinações ($p=0,052$) e significativa entre interceptos ($p=0,017$), foram observadas (Gráfico 8). As estimativas dos coeficientes do modelo e seus erros-padrão estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Estimativa dos coeficientes e erros-padrão dos resultados de VFC pós-reconstituição mantidas a 25 °C.

	<i>Estimativa</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>p-valor</i>
Intercepto (VFC 011Z)	4,8433	0,1038	< 0,001
Diferença lote VFC012Z em relação ao VFC 011Z	0,1865	0,1468	0,251
Diferença lote VFC 013Z em relação ao VFC 011Z	0,3417	0,1468	0,056
Inclinação (VFC 011Z)	0,0233	0,0199	0,285
Diferença inclinação lote VFC 012Z em relação ao VFC 011Z	- 0,0892	0,0281	0,019
Diferença inclinação lote VFC 013Z em relação ao VFC 011Z	- 0,0438	0,0281	0,170

O pior lote nesse caso foi o lote VFC 012Z, como se percebe prontamente pelo gráfico 9. Mas este lote ainda apresenta resultados satisfatórios em relação ao limite de especificação.

Os resultados de VFC mantidos a 37 °C (Gráfico 10), apresentaram similaridade aos resultados de VFA (Gráfico 5), com queda de títulos em 6 horas

após reconstituição, logo não se recomenda o uso do produto sob esta condição de uso.

5 DISCUSSÃO

Os estudos de estabilidade permitem indicar o prazo de validade de um produto, além das condições ideais de armazenamento e de uso e são imprescindíveis para garantir eficácia e segurança. Além disso, segundo a RDC 315/2005 (BRASIL, 2005b) e a RDC 55/2010 (BRASIL, 2010), o relatório de estudos de estabilidade é um dos documentos indispensáveis que compõem o processo de registro do produto junto a ANVISA.

A estabilidade das vacinas utilizando diferentes estabilizadores, destacando a lactose, sorbitol, histidina e alanina, gelatina hidrolizada, entre outros, são de grande importância para os produtores evitando maiores perdas de potência nos preparados vacinais mesmo quando armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (LOPES, 1987; LOPES, 1988; ISHAK, 1990; SOOD, 1993; WHO, 2006).

Segundo o produtor, a vacina após reconstituição deve ser mantida refrigerada, a temperaturas comprovadamente entre $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$, conservada em banho de gelo ou gelo reciclável e ser utilizada dentro de 6 horas, adotando também, cuidados que evitem a sua contaminação.

Análises de resultados dos lotes de vacina de febre amarela 5 doses e de 10 doses demonstram o comportamento com títulos bastante satisfatórios em todos os momentos analisados nas temperaturas de $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. No entanto, o rápido decréscimo de título a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em todos os lotes serve como alerta para que a vacina após reconstituição não deve ser mantida na respectiva condição.

Bio-Manguinhos obteve crescentes melhorias na estabilidade das vacinas de febre amarela (atenuada) através da combinação de diferentes estabilizadores e ajustes no ciclo de liofilização.

Estudos de **dose-resposta** (dose mínima suficiente para imunização individual) e a **purificação da vacina com sulfato de protamina** são propostas de BM para minimizar os raros casos de efeitos adversos causados pela vacinação e a purificação do produto, respectivamente. Todos os projetos seguem conforme normas e recomendações WHO e ANVISA e tem foco na qualidade e custo do produto.

Embora seja necessária a implementação de mais ensaios envolvendo um número maior de lotes/frascos, acompanhados dos testes de esterilidade (não avaliados no presente estudo) em condições idênticas aos testes de potência em

questão (tempo e temperatura), verificou-se que as vacinas se mantêm em condições de uso por até 8 horas se mantidas em temperatura de até 25 °C.

Nesse mesmo sentido, a consistência dos títulos dos lotes de VFA e VFC após reconstituição, demonstrados nesse estudo, serve como estímulo para novos estudos para confirmações dos dados, os quais servirão como proposta tanto para extensão do período de validade da vacina de 6 para 8 horas, quanto de sua condição de armazenamento após reconstituição.

6 CONCLUSÃO

A análise e avaliação do estudo de estabilidade com diferentes lotes da vacina febre amarela (atenuada) sugerem que a potência do imunizante mantém-se estável após reconstituição mesmo quando mantido a temperaturas 2 – 8 °C e 25 °C por até 8 horas.

Os testes com os lotes submetidos a 37 °C apresentaram perda de títulos a partir do tempo T3, mostrando com isso a extrema sensibilidade das vacinas após reconstituição mantidas fora das condições estabelecidas pelo produtor.

Embora o teste de esterilidade não tenha sido realizado no estudo, os resultados de potência obtidos nos lotes VFA e VFC sugerem continuidade do estudo visando a extensão do período de validade do produto após reconstituição de 6 para 8 horas, como também a recomendação opcional da temperatura de 2 °C – 8 °C ou ambiente de 25 °C.

REFERÊNCIAS

ALBERT, B.; BRAY D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the cell**. 3rd edition. New York. Garland Publishing 1994.

ALLISON, S. L.; STADLER, K.; MANDL, C. W.; KUNZ, C.; HEINZ, F. X. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. **Journal of Virology**, v. 69, n. 9, p. 5816-5820, set. 1995.

BARNETT, E. D. Yellow Fever: epidemiology and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 850-856, mar. 2007.

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

BELL, J. R.; KINNEY, R. M.; TRENT, D. W.; DALGANO, L.; STRAUSS, J.H. Amino terminal sequences of structural proteins of three flaviviruses. **Virology**, v. 143, n.1, p.224-229, may.1985.

BIOMANGUINHOS, 2002. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br>>. Acesso em: 30 jul.2011.

BIOMANGUINHOS, 2004. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br>>. Acesso em: 30 jul.2011.

BRASIL. Lei n.º 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 20 set. 1990; Seção 1, n.182, p.1. Disponível em: <http://www010.dataprev.gov.br/sislex/paginas/42/1990/8080.htm>. Acesso em: 22 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela**. Brasília, Ministério da Saúde, 1999. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_feam.pdf> Acesso em: 1 ago.2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de normas Técnicas Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor**. Brasília. 3ª ed Ministério da Saúde. 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>. Acesso em: 10 ago.2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**: Brasília, Ministério da Saúde, 2004. Disponível

em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_pos-acinacao.pdf>. Acesso em: 5 ago.2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n.º 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza *ad referendum*, a publicação do guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 1º ago. 2005a; Seção 1, n.146, p.119. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf>. Acesso em: 20 out.2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 315, de 23 de outubro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de registro, alterações pós-registro e revalidação de registro de produtos biológicos terminados. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 31 out. 2005b; Suplemento ANVISA – DOU1, n.209, p.58. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/.../2005/res0315_26_10_2005.ht>. Acesso em: 23 out.2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. 1ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005c. 56 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/epizootias.pdf>>. Acesso em: 29 set.2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>. Acesso em: 20 out.2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 17 dez. 2010c; Seção 1, n.241, p.110. Disponível em:<http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl_1307385325.pdf>. Acesso em: 23 jul.2011.

CALHEIROS, L.B. A febre amarela no Brasil - Cinqüentenário da introdução da cepa 17D no Brasil. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE FEBRE AMARELA E DENGUE**, n. 15-19, p. 74-85. Rio de Janeiro: FIOCRUZ / Bio-Manguinhos; 1988

CHAMBERS, T. J.; NESTOROWICZ, A.; RICE, C. M. Mutagenesis of the YF virus NS2B/3 cleavage site: determination of cleavage site specificity and effects on polyprotein processing and viral replication. **Journal of Virology**, v.69, n.3, p.1600-1605, mar. 1995.

COLLIER, L.; OXFORD, J. **Human Virology**. 2^a. ed. São Paulo: Oxford University Press, 2000.

DEGROOT, M. H.; SCHERVISH, M. J. **Probability and Statistics**. 2.ed. London: Addison Wesley, 2002.

DIAS, C.M.A.S.O. **Controle Estatístico de Processo Aplicado ao Teste de Potência da Vacina contra Febre Amarela**. 2003. 96 f. Tese (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos)- Instituto Tecnológico em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent Arboviruses in Brazil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 40, n.2, p.224 -229, mar-abr. 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Q1A (R2):** Stability Testing of New Drug Substances and Products. v. 4, 2003. Disponível em: <[http:// www.ema.europa.eu/pdfs/human/.../273699en.p](http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/.../273699en.p)>. Acesso em: 20 jul.2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Q5C:** Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products.v.4,1995. Disponível em: <[http:// www.ich.org/.../Quality/Q5C/.../Q5C_Guideline](http://www.ich.org/.../Quality/Q5C/.../Q5C_Guideline)>. Acesso em: 9 out.2011.

ISHAK, R.; HOWARD, C. R. The termal stability of Yellow Fever Vaccines, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.85, n.3, p.339-345, jul/sep 1990.

JADHAV, SS.; DOGAR, V.; GAUTAM, M,; GAIROLA, S. Stability testing of vaccines: Developing Countries Vaccine Manufacturers' Network (DCVMN) perspective. **Biologicals**, Maharashtra, v.37, n.6, p.360-363, nov.2009

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 2.ed. New York: Savier, 1997.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Trans- complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **Journal of Virology**, Washington, v.71, n.12, p.9608-9617, 1997.

LOPES, OS.; GUIMARÃES, S. S. D. A.; CARVALHO, R. Studies on yellow fever vaccine. I Quality-control parameter. **J Biol Stand**, Rio de Janeiro, v.15, n.4, p.323-329, 1987.

LOPES, O. S.; GUIMARÃES, SS. D. A.; CARVALHO, R. Studies on yellow fever vaccine. II Stability of the reconstituted product. **J Biol Stand**, Rio de Janeiro, v.16, p.71-76, 1988a.

MACKENZIE, J. M.; WESTAWAY, E. G. Assembly and maturation of the flavivirus kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of Virology**, Washington, v.75, n.22, p.10787-10799, 2001.

MONATH, T. P; HEINZ, F. X. Flaviviruses. In: B. N. FIELDS, B.N; KNIPE, D.M. **Fields Virology** V.1. 3rd ed. Philadelphia: Raven Publisher, 1996; P. 961-1034.

MURPHY, F. A. **Togavirus: Morphology and Morphogenesis**. 2.ed. New York: Academic Press, 1980.

OLIVEIRA, B.C.E.P.D. **Análise funcional da quimera viral: Flavivírus – Mixovírus**. 2004.150f. Tese (Doutorado em Ciências Microbiológicas)- Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Série de Registros Técnicos **N.º 872**, 1998.

POST, P. R. **Biologia molecular do vírus da Febre Amarela**. 1996. 196f. Tese (Doutorado em Ciências Microbiológicas)- Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.

POST PR, CARVALHO R, FREIRE MS, GALLER R. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.6, p.849-857, 2001.

RICE, C. M.; LENCHES, E. M.; EDDY, S. R.; SHIN, S. J.; SHEETS, R. L.; STRAUSS, J. H. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, Washington, V.229, N.4715, P.728-733, Aug.1985.

RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. In **Fields Virology**. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher, 1996. P.931-959.

R VERSION 2.11.1. **ISBN 3-900051-07-0**: The R Foundation for Statistical Computing, 2010.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução a Virologia Humana**. 2^a ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008.

SOOD, D. K., AGGARWAL, R. K., SHARMA, S. B., SOKHEY, J.; SINGH, H. Study on the stability of 17D-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. **Vaccine**, v.11, n.11, p.1124-1128, 1993.

SOPPER, F. L. Vacinação contra Febre Amarela no Brasil, de 1930 a 1937. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v.7, n.2, p.379-390, Nov.1937.

STADLER, K.; ALLISON, S. L.; SCHALICH, J.; HEINZ, F. X. Proteolytic activation of Tick-Borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology**, Washington, v.71, n.11, p.8475-8481, 1997.

STOCKS, C. E.; LOBIGS, M. Posttranslational signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction in vitro. **Journal of Virology**, Washington, v.69, n.12, p.8123-8126, 1995.

STOCKES, A.; BAUER, J. H.; HUDSON, N. P. Transmission of yellow fever to *macacus rhesus*, a preliminary note. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.90, n.4, p.253-254, 1928.

THEILER, M., SMITH, H. H. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.65, n.6, p.767 – 786, 1937.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.36, n. 2, p.275 -293, mar./abr. 2003.

WENGLER, G.; WENGLER, G. Cell associated West Nile flavivirus is covered with E + PreM protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. **Journal of Virology**, Washington, v.63, n.6, p.2521-2526, june. 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Yellow Fever**. Geneva, 2000. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/Yellow_fever.pdf> Acesso em: 19 set.2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Temperature Sensitivity of Vaccine – Immunization, Vaccines and Biological** Ordering code: WHO/IVB/06.10 - Printed: August 2006. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.10_eng.pdf >. Acesso em: 10 out.2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on stability evaluation of vaccines**. Geneva, 2006a. Disponível em: <<http://www.who.int/.../vaccines/stability/Microsoft%20>>. Acesso em: 12 out.2011.

YAMSHCHIKOV, V. F.; COMPANS, R. W. Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, n. 4, p. 1995-2003, april. 1995.