

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

Alessandra Vidal Pereira

**ANÁLISE DOS RESULTADOS DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS
DECLARADOS NOS PROTOCOLOS DE CONTROLE DA QUALIDADE DOS
FABRICANTES DAS VACINAS COVID-19 E COMPARAÇÃO COM OS
RESULTADOS OBTIDOS NO INCQS**

Rio de Janeiro

2023

Alessandra Vidal Pereira

ANÁLISE DOS RESULTADOS DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS DECLARADOS
NOS PROTOCOLOS DE CONTROLE DA QUALIDADE DOS FABRICANTES DAS
VACINAS COVID-19 E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS NO
INCQS

Monografia apresentada ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Programa do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Orientador: Magno Maciel Magalhães

Co-orientadora: Lilia Ribeiro Serodio

Rio de Janeiro

2023

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Pereira, Alessandra Vidal

Análise dos resultados de endotoxinas bacterianas declarados nos protocolos de controle da qualidade dos fabricantes das vacinas covid-19 e comparação com os resultados obtidos no INCQS. / Alessandra Vidal Pereira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2023.

46 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2023.

Orientador: Magno Maciel Magalhães.

Co-orientador: Lilia Ribeiro Serodio.

1. Emdotoxinas. 2. Controle de Qualidade. 3. Vacinas contra COVID-19. I. Título.

Analysis of the results of bacterial endotoxins declared in the quality control protocols of the manufacturers of covid-19 vaccines and comparison with the results obtained in the INCQS.

Alessandra Vidal Pereira

ANÁLISE DOS RESULTADOS DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS DECLARADOS
NOS PROTOCOLOS DE CONTROLE DA QUALIDADE DOS FABRICANTES DAS
VACINAS COVID-19 E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS NO
INCQS

Monografia apresentada ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Programa do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Wildeberg Cal Moreira

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Dr^a. Érica Louro da Fonseca

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (BioManguinhos/Fiocruz)

Dr^a. Cristiane Nogueira Caldeira

Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz)

ORIENTADORES

Me. Magno Maciel Magalhães

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) - Fiocruz

Me. Lilia Ribeiro Seródio

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fiocruz

Dedico este trabalho:

À Deus.

À meus pais e melhores amigos, Nely (*in memoriam*) e Gilson.

À minha co-orientadora Lilia Ribeiro Seródio, que sempre ilumina meu caminho quando tudo parece escuridão.

À meu orientador Magno Maciel Magalhães, que me incentivou e acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Me. Magno Maciel Magalhães, por me orientar, por sua paciência, dedicação e profissionalismo.

À minha co-orientadora Me. Lilia Ribeiro Seródio, por me ensinar, por me auxiliar, por me apoiar e por tudo o que fez por mim.

Ao meu amigo Hendro Freitas de Farias, por todo apoio, cooperação, paciência e incentivo para realização deste trabalho.

Ao meu amigo Gustavo Morais da Cruz Lopes, por todo auxílio e apoio para que este trabalho se concretizasse.

Aos meus amigos Me. Sheila Regina Albertino e Dr. Fernando Faria Fíngola, pelos métodos ensinados, pelo apoio, compreensão e cooperação para conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos do INCQS que me apoiaram e torceram por mim.

Ao chefe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS, FIOCRUZ, Fábio Coelho Amendoeira, por todo incentivo.

Aos membros da Banca que compartilharam seus conhecimentos e agregaram muito valor ao trabalho.

Ao meu Marido, Roberto Edelman de Senna Júnior, pelo incentivo e apoio sempre e ao nosso filho, Miguel Edelman de Senna Vidal, que fez minha história ganhar o melhor capítulo ao entrar na minha vida e se tornou a razão para eu lutar todos os dias para ser alguém melhor.

Ao meu pai, Gilson de Souza Pereira, por acreditar em mim, mesmo quando eu desacredito.

À minha mãe, Nely Vidal Pereira (*in memoriam*), por ter sido o ser fantástico que foi.

À Deus, sem ele nada disso seria possível.

RESUMO

O ensaio de endotoxinas bacterianas *in vitro* é preconizado pela Farmacopeia Brasileira, sendo um método para avaliar a segurança de produtos biológicos. No Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), laboratório nacional oficial de controle de qualidade de vacinas e soros para o Programa Nacional de Imunização, são utilizados os métodos de coagulação em gel e cromogênico cinético, que se baseiam no processo de coagulação ou gelificação de amebócitos retirados do sangue do *Limulus polyphemus* ao entrar em contato com endotoxinas de bactérias gram-negativas. No controle da qualidade das vacinas Covid-19 são preconizados ensaios físico-químicos, biológicos e microbiológicos. O objetivo do presente trabalho foi analisar os Protocolos de Produção e Controle da Qualidade das vacinas Covid-19 utilizadas no Brasil, verificar as especificações dos fabricantes e comparar os resultados de endotoxinas bacterianas dos lotes enviados para análises laboratoriais com aqueles obtidos pelos fabricantes. Foi realizado um levantamento dos limites máximos de endotoxinas de cada fabricante, os resultados declarados nos protocolos e realizados os ensaios de endotoxinas dos lotes que foram disponibilizados para controle pelos métodos *Gel-clot* ou cromogênico cinético. No período de Janeiro de 2021 a Agosto de 2022, as análises de protocolos de 1.077 amostras das vacinas Covid-19 demonstraram diferenças de resultados significativas, assim como de especificações. Todos os resultados declarados pelos produtores ficaram abaixo dos limites de endotoxinas bacterianas preconizados. Os resultados obtidos tanto no método *Gel-Clot*, quanto no cromogênico cinético ficaram significativamente abaixo das especificações e dos resultados dos fabricantes.

Palavras-chaves: Endotoxinas Bacterianas. Controle da Qualidade. Vacinas Covid-19.

ABSTRACT

The *in vitro* bacterial endotoxin assay is recommended by the Brazilian Pharmacopoeia, as a method to assess the safety of biological products. The National Institute for Quality Control in Health (INCQS), which is the national quality control laboratory for vaccines and serums used by the National Immunization Program, uses gel coagulation and kinetic chromogenic methods, which are based on the process of coagulation or gelation of amoebocytes taken from the blood of *Limulus polyphemus* when in contact with endotoxins from gram-negative bacteria. In quality control of Covid-19 vaccines, physical-chemical, biological and microbiological tests are recommended. The objective of the present study was to analyze the Production and Quality Control Protocols of the Covid-19 vaccines used in Brazil, verify the manufacturers' specifications and compare the results of bacterial endotoxins from the batches sent for laboratory analysis with those obtained by the manufacturers. A survey of the maximum limits of endotoxins of each manufacturer was carried out, and the results declared in the protocols and the endotoxin tests of the lots that were made available for control by the Gel-clot or kinetic chromogenic methods. From 01/2021 to 08/2022, protocol analyzes of 1,077 samples of Covid-19 vaccines showed differences in significant results, as well as in specifications. In the INCQS determinations, the results were significantly different from those of the manufacturers. All the results declared by the producers were below the recommended limits of bacterial endotoxins. The results obtained both in the Gel-Clot method and in the kinetic chromogen were significantly below the specifications and results of the manufacturers.

Key-words: Bacterial Endotoxins. Quality Control. Covid-19 Vaccines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Casos de Covid-19 detectados no Brasil em um ano.....	15
Figura 2 - Linha do tempo no desenvolvimento de vacinas.....	18
Figura 3 - Diagrama mostrando a ação da vacina Oxford Covid-19.....	21
Figura 4 - Ilustração da estrutura bioquímica do lipopolissacarídeo existente na membrana externa de bactérias Gram-negativas.....	24
Figura 5 - Esquema detalhado do ensaio de endotoxinas pelo método <i>Gel-Clot</i>	26
Figura 6 - Princípio da reação no método cromogênico cinético.....	27
Figura 7 - Comparação dos resultados de endotoxinas determinados pelo Fabricante A (N=5) e o INCQS.....	33
Figura 8 - Comparação dos resultados de endotoxinas determinados pelo Fabricante B (N=14) e o INCQS.....	35
Figura 9 - Comparação dos resultados de endotoxinas determinados pelo Fabricante C (N=7) e o INCQS.....	36
Figura 10 - Comparação dos resultados de endotoxinas determinados pelo Fabricante D (N=11) e o INCQS.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variantes do SARS-CoV-2 consideradas de interesse epidemiológicos pela OMS.....	17
Tabela 2 - Vacinas, produtores e tecnologias de fabricação das vacinas Covid-19 utilizadas no Brasil.....	22
Tabela 3 - Especificações dos fabricantes do limite máximo de endotoxinas nas vacinas Covid-19 utilizadas no Brasil.....	32
Tabela 4 - Variação das faixas de limites máximos considerados pelos fabricantes nos ensaios de endotoxinas bacterianas	33
Tabela 5 - Comparação dos resultados do Fabricante A com os resultados obtidos através da análise no INCQS.....	34
Tabela 6 - Comparação dos resultados do Fabricante B com os resultados obtidos através da análise no INCQS.....	35
Tabela 7 - Comparação dos resultados do Fabricante C com os resultados obtidos através da análise no INCQS.....	37
Tabela 8 - Comparação dos resultados do Fabricante D com os resultados obtidos através da análise no INCQS.....	38

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CLE	Concentração dos Limites de Endotoxinas
COVID	<i>Corona Virus Disease</i>
EPM	Erro Padrão da Média
EUA	Estados Unidos da América
EU	<i>Endotoxin Units</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Gel-Clot</i>	Coagulação em Gel
HBCD	2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lisate</i>
LNP	<i>Lipidic Nanoparticle</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LRW	<i>LAL Reagent Water</i>
MDV	Máxima Diluição Válida
MERS	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
(modRNA)	Ácido Ribonucleico modificado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PRPCQ	Protocolo Resumido de Produção e Controle da Qualidade
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rFC	Fator C recombinante
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SU	<i>SARS-CoV-2 Units</i>
SUS	Sistema único de Saúde

Unicef
vp

Fundo das Nações Unidas para a Infância
partículas virais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Vigilância Sanitária.	12
1.2 Programa Nacional de Imunizações (PNI)	13
1.3 Covid-19 e agente etiológico	14
1.3.1 A pandemia de Covid-19.....	14
1.3.2 Os vírus da família <i>Coronaviridae</i>	16
1.4 Vacinas contra o SARS-CoV-2.	17
1.4.1 Produção e Controle da Qualidade de Vacinas Para Uso Humano.	17
1.4.2 Vacinas Covid-19 utilizadas no Brasil.	19
1.5 Autoridades Reguladoras de Produtos Injetáveis	22
1.6 Endotoxinas Bacterianas.	23
1.6.1 Métodos para determinação de endotoxinas bacterianas.	25
1.7 Justificativa	28
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 METODOLOGIA	30
3.1 Amostras das vacinas Covid-19.	30
3.2 Concentração dos Limites de Endotoxinas (CLE).	30
3.3 Determinação da Máxima Diluição Válida (MDV)	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vigilância Sanitária

A vigilância mundial em saúde pública investiga a forma como as autoridades respondem às ameaças internacionais à saúde humana. Há uma inovação de conceitos sobre as doenças infecciosas, já que historicamente o foco do controle internacional de doenças, foi substituído pelas "emergências internacionais de saúde pública", um conceito que trouxe novas responsabilidades às autoridades de saúde pública, ajudando a moldar um novo projeto de segurança da saúde mundial. Entre 1995 e 2005, uma forma de vigilância sanitária global foi reinventada e o controle internacional de doenças transmissíveis passou a ser baseado na segurança. Questões críticas sobre os efeitos institucionais do conceito de doenças infecciosas emergentes, o papel da mídia na vigilância sanitária global e o impacto das mudanças no direito internacional da saúde levaram a Organização da Saúde para além da soberania nacional e da governança global (WEIR; MYKHALOVSKIY, 2010).

De acordo com a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, – que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde - a vigilância sanitária é entendida por:

um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde e o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo (BRASIL, 1990).

Com a reforma sanitária brasileira e o surgimento do Sistema Único de Saúde (SUS), os insumos médico-hospitalares (medicamentos, imunobiológicos, hemoderivados e equipamentos médicos) adquiriram uma importância maior ainda (ROZENFELD, 2009).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), criada em 26 de janeiro de 1999 pela Lei nº 9.782, é responsável pelo registro e garantia de que os produtos liberados para distribuição pública sejam avaliados adequadamente e atendam aos padrões internacionais de qualidade, de segurança e de eficácia, assim como pela

retirada do mercado dos produtos que não demonstrem essas referências (BRASIL, 1999).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 55, de 16 de dezembro de 2010, dispõe sobre os requisitos mínimos para o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos no país, visando garantir a qualidade, segurança e eficácia destes medicamentos (ANVISA, 2010). Através de inspeções sistemáticas, a Anvisa concede aos fabricantes o certificado de Boas Práticas de Fabricação (BPF) definidas como “parte do Gerenciamento da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, de acordo com os padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro sanitário, autorização para uso em ensaio clínico ou especificações do produto”, portanto, as BPF envolvem a fabricação e o controle da qualidade (ANVISA, 2022).

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e, desde 1981, atua nas áreas de ensino, pesquisa e de tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos às ações de vigilância sanitária. Age em estreita cooperação com a Anvisa, com as secretarias estaduais e municipais de saúde, entre outros parceiros. Além disso, como órgão de referência, reconhece as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária. Como laboratório nacional de controle, o INCQS é pré-qualificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 2014, sendo responsável pela liberação de todos os lotes de vacinas e soros hiperimunes de fabricantes nacionais e internacionais (ANVISA, 2008).

1.2 Programa Nacional de Imunizações (PNI)

Desde que foi institucionalizado, em 1975, o PNI proporcionou ações planejadas e sistematizadas no fornecimento de vacinas com qualidade a todas as crianças, adolescentes e idosos do nosso país. Na Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), braço da OMS, o PNI brasileiro é citado como referência mundial e conseguiu atingir metas significativas na eliminação do sarampo e tétano neonatal, assim como o controle de doenças imunopreveníveis, como difteria, coqueluche e tétano acidental, hepatite B, meningites, febre amarela, formas graves da tuberculose,

rubéola e caxumba em alguns estados, bem como, a manutenção da erradicação da poliomielite (BRASIL, 1976; DOMINGUES, *et al.*, 2020).

Atualmente, o PNI integra o Programa da OMS, com o apoio técnico, operacional e financeiro do Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef) e contribuições do *Rotary Internacional* e do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) e disponibiliza 21 vacinas e 12 soros hiperimunes (BRASIL, 2022).

1.3 Covid-19 e agente etiológico

1.3.1 A pandemia de Covid-19

Em dezembro de 2019 foi registrado, no escritório chinês da OMS, o primeiro caso oficial de pneumonia, ainda com causa desconhecida, em Wuhan, província de Hubei, despertando particular interesse das autoridades sanitárias (OMS, 2019). Ao final de janeiro de 2020, foi decretado estado de emergência em saúde pública por se tratar de uma calamidade com interesse internacional. Em fevereiro de 2020, a síndrome respiratória aguda grave (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*) que crescia em progressão exponencial foi nomeada pela OMS como Covid-19 e, em 11 de março de 2020, foi então caracterizada como pandemia. Até esse momento, a Covid-19 estava presente em cerca de 100 países, com mais de 100 mil casos confirmados da doença, sendo necessárias medidas específicas de identificação, prevenção e controle para o seu enfrentamento (WANG, C *et al.*, 2020; VELAVAN, *et al.*, 2020).

O termo “pandemia” se refere à distribuição geográfica de uma doença e não à sua gravidade. A designação reconhece que, no momento, existem surtos de Covid-19 em vários países e regiões do mundo. Uma pandemia é um surto de doença que se espalha por países ou continentes. Afeta mais pessoas e tira mais vidas do que uma epidemia. A OMS declarou a Covid-19 uma pandemia quando ficou claro que a doença era grave e que estava se espalhando rapidamente por uma ampla área. O sistema de alerta de pandemia da OMS varia em fases. Fase 1: Um vírus em animais não causou infecções conhecidas em humanos; Fase 2: Um vírus animal causou infecção em humanos; Fase 3: Existem casos dispersos ou pequenos grupos de doenças em humanos. Se a doença está se espalhando de humano para humano,

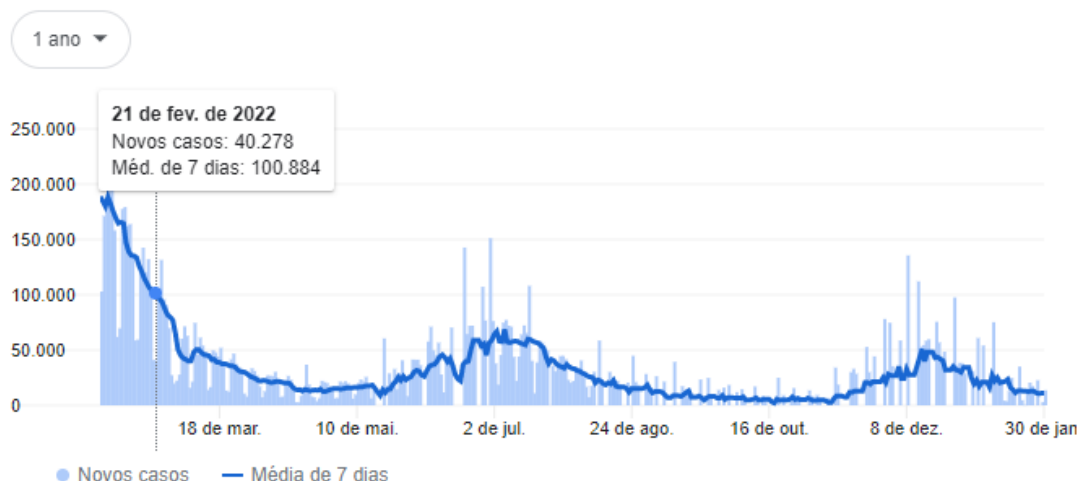
mas não é ampla o suficiente para causar surtos em nível comunitário; Fase 4: A doença está se espalhando de pessoa para pessoa com surtos confirmados em nível comunitário; Fase 5: A doença está se espalhando entre humanos em mais de um país de uma das regiões da OMS e Fase 6: Pelo menos mais de um país, em uma região diferente da Fase 5, tem surtos em nível comunitário (ROBINSON, J., 2022).

A Covid-19 é uma Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) infecciosa causada por coronavírus, mais especificamente pelo agente etiológico SARS-CoV-2. Outras epidemias já foram relatadas por agentes etiológicos semelhantes, como o SARS-CoV-1 e o MERS-CoV, entretanto nenhuma delas com tamanha magnitude. O SARS-CoV-2 apresentou uma particular rapidez e disseminação de novos casos (WANG, *et al.*, 2020).

Como toda a população é suscetível, um aumento muito rápido do número de infectados ocasionou sobrecarga de leitos, procedimentos e equipamentos hospitalares (WU, *et al.*, 2020). Quanto aos seus fatores de riscos associados à gravidade, destaca-se a idade avançada (maior que 60 anos, principalmente para o risco aumentado de mortalidade) e a presença de comorbidades (doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, hipertensão, doenças pulmonares etc.), acelerando o progresso dos sintomas com pior prognóstico (KOLIFARHOOD, *et al.*, 2020).

Segundo a OMS, até 30 de janeiro de 2023, o Brasil apresentou 36.768.677 casos de Covid confirmados e 696.603 óbitos (Figura 1) (OMS, 2023).

Figura 1 - Casos de Covid-19 detectados no Brasil em um ano



Fonte: JHU CSSE COVID-19.

1.3.2 Os vírus da família *Coronaviridae*

Ao todo, seis coronavírus humanos (HCoVs) já tinham sido identificados, e quatro deles - HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 - causam sintomas leves de gripe (CUI; LI; SHI, 2019). Os coronavírus reconhecidos como os mais patogênicos são o SARS-CoV-1, responsável pela síndrome respiratória aguda grave, surgido em 2002 e erradicado antes de se tornar uma pandemia em meados de 2003 (POON *et al.*, 2004), e o MERS-CoV, que emergiu em humanos em 2012 e é responsável pela síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*) (ZAKI *et al.*, 2012).

Os coronavírus são divididos em duas subfamílias: *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae*, e esta última possui quatro gêneros: Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus. Os dois primeiros infectam apenas mamíferos e os últimos são encontrados principalmente em aves, porém alguns podem infectar mamíferos (CUI; LI; SHI, 2019).

Embora alguns coronavírus geneticamente relacionados tenham sido isolados de morcegos *Rhinolophus*, a fonte exata do SARS-CoV-2 e a via de introdução na população humana não foi estabelecida (MACLEAN, O. A *et al.*, 2020).

Como outros vírus de RNA, o SARS-CoV-2 apresenta evolução genética com mutações ao longo do tempo. Algumas variantes do SARS-CoV-2 foram descritas durante a pandemia. A atualização epidemiológica da OMS, em 11 de dezembro de 2021, descreve cinco variantes de preocupação epidemiológica (Tabela 1).

Tabela 1 - Variantes do SARS-CoV-2 consideradas de interesse epidemiológicos pela OMS

Variante	Relato
Alfa (B.1.1.7)	primeira variante de preocupação descrita no Reino Unido (Reino Unido) no final de dezembro de 2020.
Beta (B.1.351)	relatado pela primeira vez na África do Sul em dezembro de 2020.
Gama (P.1)	relatado pela primeira vez no Brasil no início de janeiro de 2021.
Delta (B.1.617.2)	relatado pela primeira vez na Índia em dezembro de 2020.
Omicron (B.1.1.529)	relatado pela primeira vez na África do Sul em novembro de 2021.

Fonte: CASCELLA *et al.*, 2022.

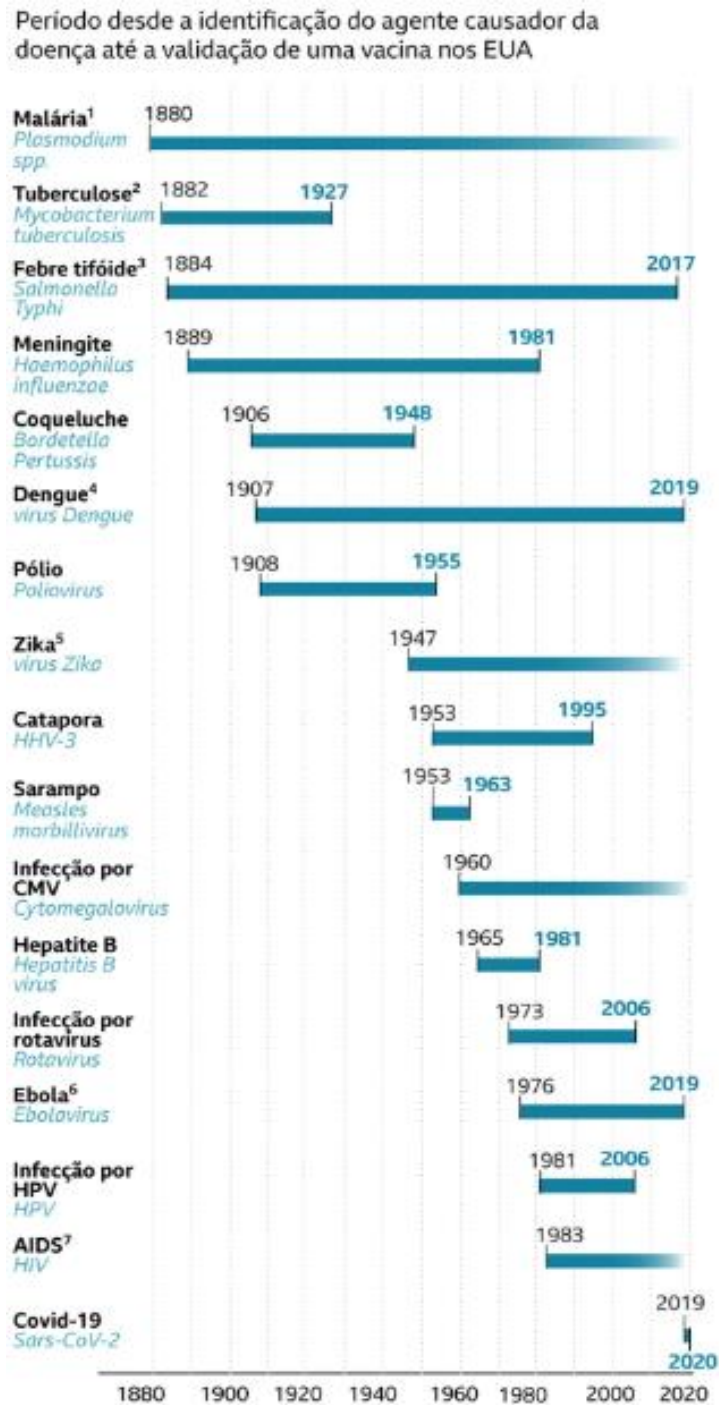
1.4 Vacinas contra o SARS-CoV-2

1.4.1 Produção e Controle da Qualidade de Vacinas Para Uso Humano

As vacinas são medicamentos biológicos profiláticos capazes de ativar uma resposta imune contra um ou mais agentes infecciosos. Podem ser constituídas por micro-organismos inativados ou atenuados, substâncias por eles produzidas e/ou frações antigênicas (ANVISA, 2019).

Desde a fase de desenvolvimento até que uma vacina seja disponibilizada no mercado podem decorrer décadas de estudos, mas com o desenvolvimento de novas tecnologias e BPF, esse tempo tem se tornado mais curto a cada nova vacina (Figura 2).

Figura 2 - Linha do tempo no desenvolvimento de vacinas



Legenda: Cada barra corresponde ao ano em que o agente etiológico foi relacionada à doença até o ano em que a vacina foi licenciada nos Estados Unidos da América.

Fonte: COSTA; TOMBESI, 2020.

Em 2020, com o surgimento da pandemia da Covid-19, os fabricantes mundiais de vacinas se mobilizaram para disponibilizar o mais rapidamente possível diferentes tipos de vacina, utilizando tecnologias novas ou tradicionais para a obtenção rápida de imunógenos contra o SARS-CoV-2. Assim, até o final de 2020, duas vacinas

baseadas na tecnologia de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) foram autorizadas para uso emergencial nos Estados Unidos da América (EUA), e uma terceira vacina foi autorizada pela *Food and Drug Administration* (FDA) no início de 2021, baseada em vetores virais (FDA, 2022).

No caso de surtos de um patógeno emergente, após a seleção de um local de teste para uma vacina, o processo de avaliação clínica deve começar na primeira oportunidade para apreender a transmissão dentro do estudo clínico da vacina. Isso requer que o estudo seja planejado com antecedência, para receber a aprovação rápida do protocolo e avaliar rapidamente a vacina para que seja utilizada naquele surto. Se uma vacina parece fornecer benefícios de saúde pública suficientes após sua avaliação, ela pode ser usada e/ou recomendada para uso antes do licenciamento (OMS, 2021).

1.4.2 Vacinas Covid-19 utilizadas no Brasil

A vacina Coronavac, produzida inicialmente pela empresa chinesa Sinovac e, em solo Nacional, pelo Instituto Butantan, é uma vacina de vírus inteiro, propagado em células Vero e inativado com β -propiolactona (WHO, 2021). A cepa de SARS-CoV-2 utilizada na produção da vacina foi isolada do lavado bronco alveolar de um paciente hospitalizado e está intimamente relacionada com a cepa 2019-nCoV-BetaCoV Wuhan/WIV04/2019. Cada dose de 0,5 mL de suspensão injetável contém 600 SARS-CoV-2 Units (SU) do antígeno do vírus inativado SARSCoV-2 e os excipientes utilizados são hidróxido de alumínio, hidrogenofosfato dissódico, di-hidrogenofosfato de sódio, cloreto de sódio e água para injetáveis (INSTITUTO BUTANTAN, 2022)

A vacina Covid-19 AstraZeneca, também conhecida como AZD1222 ou ChAdOx1-S (recombinante), foi desenvolvida pela Universidade de Oxford, Reino Unido, em parceria com a indústria farmacêutica AstraZeneca. A transferência de tecnologia dessa vacina para o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Unidade Técnico-Científica da Fiocruz, foi iniciada em 2020. Os vetores de adenovírus com deficiência de replicação contendo um transgene específico do patógeno têm sido usados como novas vacinas devido à sua capacidade de induzir fortes respostas humorais e celulares. A vacina AstraZeneca é uma vacina vetorizada de adenovírus de chimpanzé com deficiência de replicação que expressa o SARS CoV-2 o gene da glicoproteína *spike* (S) do SARS-CoV-2, imunógeno na vacina. Os adenovírus não são

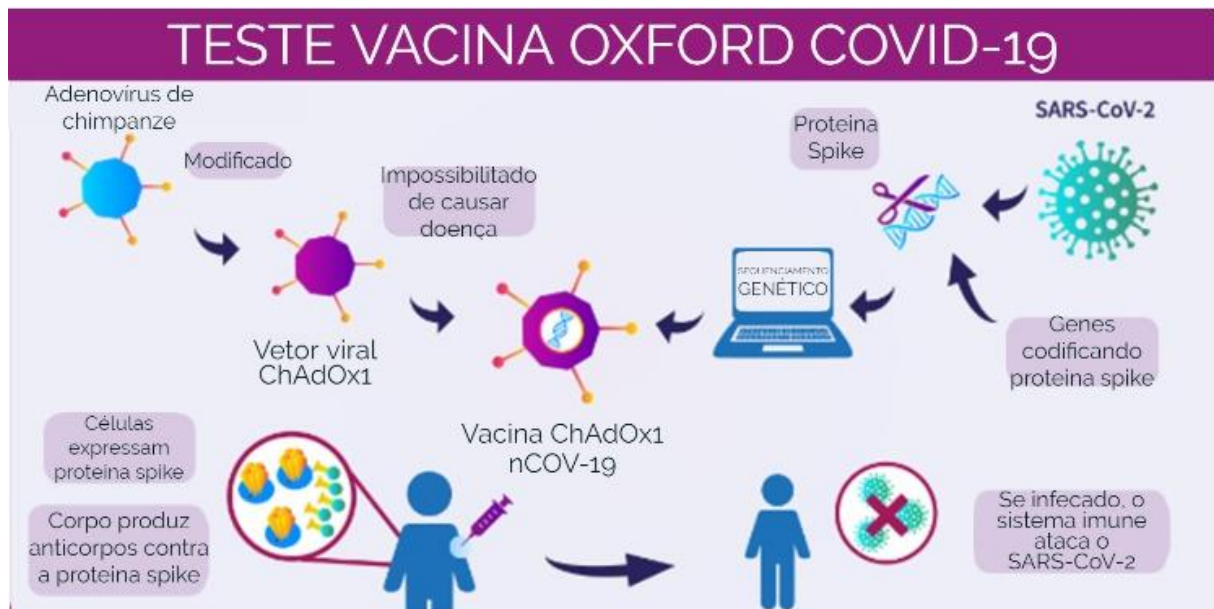
encapsulados e contêm uma única cópia do genoma de DNA de fita dupla. A expressão para a proteína S do SARS-CoV-2 fundida à sequência líder do ativador do plasminogênio tecidual usa um promotor de citomegalovírus humano modificado e uma sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino. Uma dose (0,5 ml) contém 5×10^{10} partículas virais de ChAdOx1-S (recombinante) e os excipientes L-histidina, cloridrato de L-histidina mono-hidratado, cloreto de magnésio hexa-hidratado, polissorbato 80, etanol, sacarose, cloreto de sódio, edetato dissódico dihidratado e água para injeção (OMS, 2021).

A vacina Covid-19 (recombinante) do fabricante Janssen é uma vacina monovalente vetorizada de adenovírus incompetente tipo 26 (Ad26) codificando a proteína S do SARS-CoV-2 do isolado Wuhan-Hu-1 (número de acesso GenBank MN908947), estabilizado. O vetor não pode se replicar em células humanas porque o gene E1 foi deletado do genoma. Para fabricar vacinas baseadas em vetores adenovirais incompetentes para replicação, é utilizada, para complementar o gene E1 ausente, uma linhagem celular específica derivada de uma única célula primária humana, obtida em 1985 a partir de tecido da retina fetal. Ela foi estabelecida pela transformação das células primárias usando o gene Adenovirus E1, resultando em uma linhagem celular que expressa constitutivamente E1, e que assim é capaz de complementar o vetor adenoviral, permitindo que ele se replique durante o processo de fabricação. O vetor Ad26, que expressa a proteína S, é cultivado na linhagem celular PER.C6G TetR. Após a propagação, a vacina é processada através de várias etapas de purificação, formulada com ingredientes inativos e envasada em frascos. Uma dose (0,5 ml) contém 5×10^{10} partículas virais AD26.COVS (vp) e os seguintes ingredientes inativos: ácido cítrico monohidratado, citrato trissódico dihidratado, etanol, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD), polissorbato 80, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico (OMS, 2021).

A vacina Covid-19 da Pfizer-BioNTech é uma vacina de mRNA, que tem como vantagem sua fase de desenvolvimento rápido, evita o risco de integração com o genoma da célula hospedeira e tem a capacidade de produzir proteína viral pura. O mRNA tem uma expressão transitória, permitindo que a proteína seja produzida no interior da célula. A tecnologia da vacina de mRNA é formulada com nanopartículas lipídicas (LNP), o que faz com que as informações genéticas sejam entregues, além do efeito adjuvante que confere às células apresentadoras de antígenos. O Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) da vacina Pfizer é um mRNA de fita simples com capa 5' que

é traduzido em uma proteína (PS2 - o antígeno codificado). O RNA codificador de antígeno, que é determinado pela respectiva sequência de nucleotídeos do DNA é usado como molde para transcrição de RNA *in vitro*. Além da sequência otimizada que codifica o antígeno, o RNA contém elementos estruturais comuns do vírus mediando alta estabilidade de RNA e eficiência de tradução. A vacina é formulada como uma nanopartícula lipídica contendo mRNA modificado por nucleosídeo (modRNA) e estimula uma capacidade de ativação do sensor imune inato enfraquecido, aumentando a expressão do antígeno. Durante a mistura do RNA com os lipídios dissolvidos, estes dão origem às nanopartículas que encapsulam o RNA. Após a administração da vacina, os LNPs são absorvidos pelas células e o RNA é liberado no citosol, onde é traduzido na proteína viral codificada. Em seguida, o mRNA é degradado e os peptídeos são expostos à superfície da célula, desencadeando uma resposta imune humoral mediada por células T específicas contra a proteína *spike* do SARS CoV-2 (OMS, 2021). O mecanismo de ação da vacina Oxford-Pfizer se encontra demonstrado na figura 3.

Figura 3 - Diagrama mostrando a ação da vacina Oxford Covid-19



Fonte: A autora, adaptado de UNIVERSITY OF OXFORD, 2020.

Cada dose de 0,3 mL da vacina da Pfizer (Comirnaty®), para idades acima de 12 anos, contém 30 µg da vacina Covid-19 (substância ativa. Em janeiro de 2022, o Ministério da Saúde recomendou a vacinação de crianças de 05 a 11 anos, de forma não obrigatória, com o imunizante Comirnaty® pediátrico, no Plano Nacional de

Operacionalização da Vacinação contra a Covid-19 (UNASUS.GOV, 2022). Cada dose de 0,2 mL da vacina Comirnaty® pediátrica contém 10 µg da vacina Covid-19 (substância ativa) (PFIZER, 2022).

Tabela 2 - Vacinas, produtores e tecnologias de fabricação das vacinas Covid-19 utilizadas no Brasil

VACINA	PRODUTOR	TECNOLOGIA
CORONAVAC	Sinovac – Instituto Butantan	Vírus inteiro inativado.
ChAdOx1-S	Universidade de Oxford em parceria com a AstraZeneca -> Biomanguinhos	Recombinante, vetorizada de adenovírus de chimpanzé.
Ad26.COV2.S (Janssen)	Johnson & Johnson	Recombinante, monovalente, vetorizada de adenovírus tipo 26.
COMIRNATY	Pfizer-BioNTech	mRNA com nanopartículas lipídicas.

Fonte: O autor, 2023.

1.5 Autoridades Reguladoras de Produtos Injetáveis

Embora o fabricante tenha a responsabilidade legal principal pela segurança, qualidade e eficácia dos produtos, as Autoridades Reguladoras Nacionais (ARN), em particular nos países onde as vacinas são fabricadas, desempenham um papel crítico na garantia da qualidade do produto. As ARNs (a Anvisa, no caso do Brasil), são responsáveis pela revisão dos pedidos de licenciamento, liberação de lotes e monitoramento do desempenho do produto em seu país. A competência científica e as práticas harmonizadas das ARN tornaram-se componentes essenciais da garantia de qualidade dos produtos que circulam no comércio internacional (OMS, 1992).

Como parte de seu programa de padronização biológica, a OMS documenta as práticas regulatórias atuais para tópicos gerais e específicos de produtos, para apoiar as ARNs e fabricantes, de maneira que a qualidade de todas as vacinas seja garantida. Liberar uma vacina para o público para que ela possa causar um impacto positivo na saúde pública e na vida individual é um processo complexo. O teste de controle de qualidade é fundamental em todas as etapas, desde o desenvolvimento inicial até a produção em grande escala, para garantir a eficácia e segurança das vacinas (OMS, 2022).

De acordo com a Resolução RDC Nº 658, de 30 de março de 2022, o Controle de Qualidade é a parte das BPF responsável pela amostragem durante todo o processo fabril e realização de ensaios preconizados desde as matérias-primas, de acordo com as especificações compendiais ou *in house*, quando o fabricante desenvolve o método e apresenta às autoridades regulatórias que o mesmo é válido para o que se pretende. Além disso, o controle de qualidade atua na determinação dos procedimentos de liberação que asseguram que os testes relevantes e necessários sejam executados, e que os produtos não sejam liberados para comercialização ou distribuição, até que a sua qualidade tenha sido considerada satisfatória. Desta forma, o Controle de Qualidade de uma indústria farmacêutica deve estabelecer as especificações, padronizar e validar os métodos analíticos, armazenar amostras de lotes aprovados e liberados para possíveis rastreamentos (ANVISA, 2022).

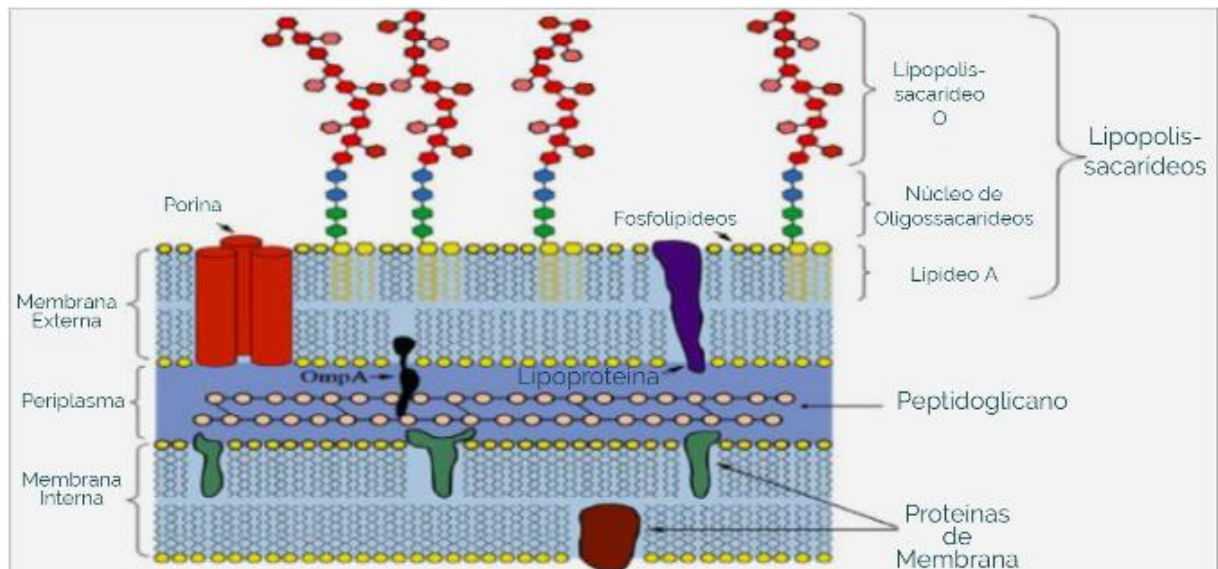
Em se tratando de saúde pública, o rigor no controle dos produtos é um fator extremamente importante para o aprimoramento tecnológico dos sistemas de produção e controle da qualidade no setor público, visto que estes contribuem para o desenvolvimento científico do país. O INCQS é o Laboratório Nacional de Controle responsável pela liberação final de todos os lotes distribuídos pelo PNI (Brasil, 2008). Portanto, todos os lotes das vacinas Covid-19 têm sido enviados para o INCQS para liberação por protocolo e/ou testes laboratoriais antes da liberação para aplicação na população.

1.6 Endotoxinas Bacterianas

No final do século XX, as propriedades químicas, físicas e as estruturas biológicas da endotoxina foram gradualmente reveladas, como resultado do uso de

equipamentos avançados e técnicas analíticas. A alta estabilidade química das moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) são liberadas para o meio ambiente com a morte das células bacterianas Gram-negativas (Figura 4). A entrada de moléculas de LPS no sangue circulante de um ser humano pode iniciar a endotoxemia, afetando diretamente a função e a estrutura das células e órgãos, começando com o aumento da temperatura corporal, seguido pela alteração das funções metabólicas e, em seguida, modificação da hemodinâmica, que pode induzir choque séptico e óbito (MOHAMED, A *et al.*, 2019).

Figura 4 - Ilustração da estrutura bioquímica do lipopolissacarídeo existente na membrana externa de bactérias Gram-negativas



Fonte: Adaptado de SANDLE, 2015.

O seu peso molecular situa-se em torno de 5000 Da, mas suas características lipídicas e hidrofóbicas permitem a formação de agregados em soluções aquosas, cujos tamanhos são dependentes do tipo de solução, podendo atingir vários milhões de Daltons e tornar-se particulado. O peso molecular também depende da estrutura química que constitui uma determinada endotoxina, da espécie de bactéria que a originou, das condições do meio de crescimento da bactéria e do método de sua extração. Por sua heterogeneidade bioquímica, as endotoxinas adsorvem-se de modo variado à maioria das superfícies, incluindo carvão ativado, resinas, vidros, plásticos e substratos de filtros (HARDING *et al.*, 1990). Para degradar quimicamente as endotoxinas, devem ser usados ácidos ou bases fortes, ou um processo físico

baseado em calor, a despirogenização a 180°C por 3 horas ou 250°C por 30 minutos (FAVERO, 1992).

Como determinado pelas agências regulatórias, que tratam das BPF, e pela dificuldade de recuperação do produto contaminado, uma das maiores preocupações dos fabricantes de medicamentos injetáveis é a contaminação LPS e, por isso, o controle de endotoxinas deve ocorrer desde a água de formulação até o produto final (ANVISA, 2022).

Todos os produtos injetáveis, como as vacinas, matérias-primas e excipientes utilizados na fabricação obrigatoriamente necessitam ser submetidos a testes de segurança, dentre os quais se inclui o teste de endotoxinas bacterianas (BRASIL, 2022).

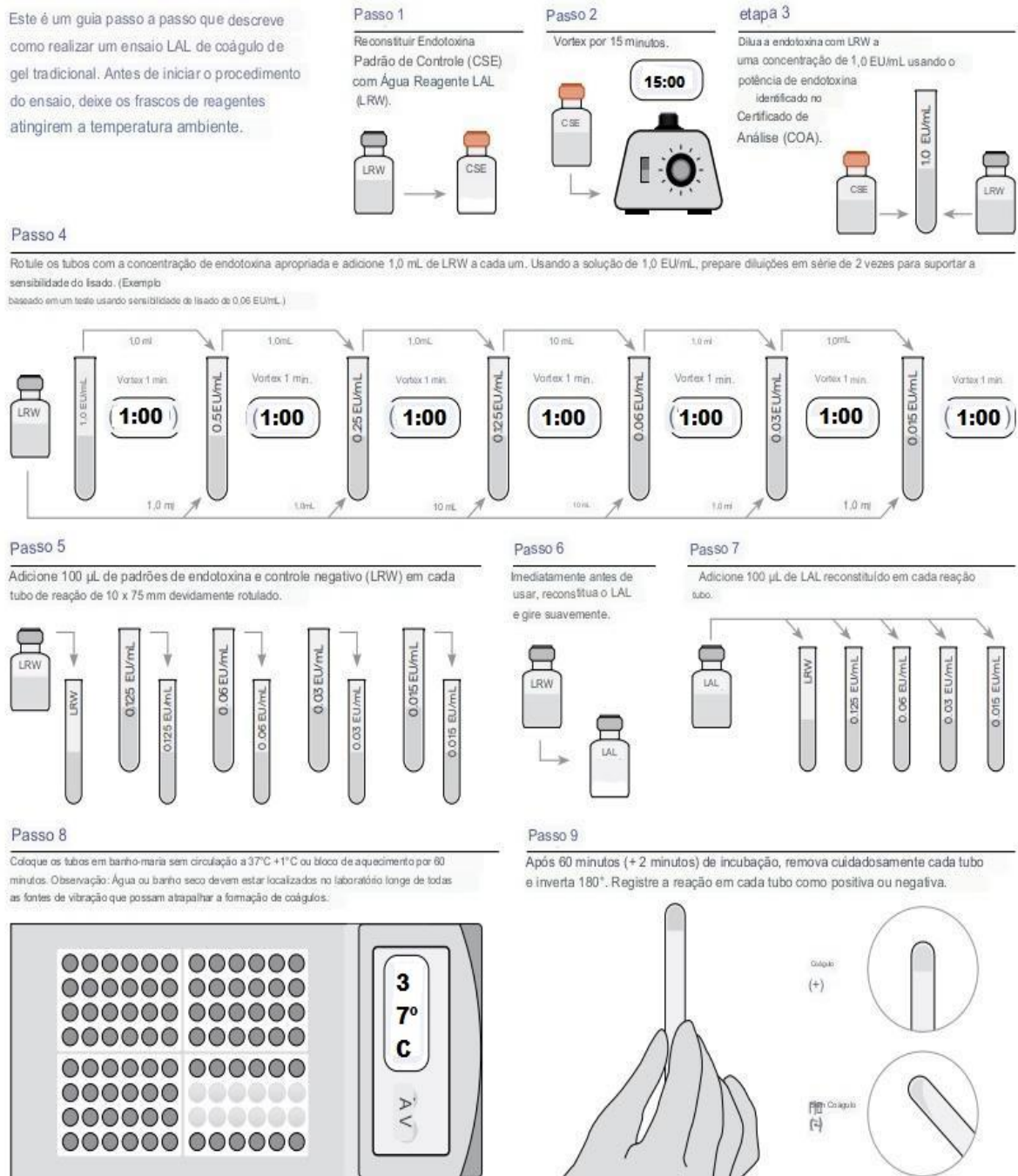
1.6.1 Métodos para determinação de endotoxinas bacterianas

O teste *in vitro* de endotoxinas bacterianas é usado para detectar ou quantificar o LPS presente em amostras para qual o teste é preconizado. Utiliza-se o extrato aquoso dos amebócitos circulantes do *Limulus polyphemus* ou do *Tachypleus tridentatus* preparado e caracterizado como reagente LAL (do inglês, *Limulus Amebocytes Lisate*) (ANVISA, 2019). Na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição são descritos: (a) método de coagulação em gel, baseado na formação de coágulo ou gel (método semi-quantitativo); (b) Método turbidimétrico, baseado no desenvolvimento de turbidez após quebra de um substrato endógeno e (c) Método cromogênico, baseado no desenvolvimento de cor após quebra de um complexo peptídeo sintético cromógeno (ANVISA, 2019).

Na Farmacopeia Europeia edição 11.0 já é descrito o método por Fator C recombinante (rFC), que é ativado pela ligação da endotoxina, e a enzima ativa então cliva um substrato sintético, resultando na geração de um composto fluorogênico. O ensaio funciona por meio de uma única etapa enzimática em comparação com o processo enzimático de várias etapas necessário para ensaios de LAL. A principal vantagem do Fator C recombinante (rFC) é que o reagente utilizado para detectar endotoxinas bacterianas em produtos farmacêuticos não é derivado de animais (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2022).

No INCQS são utilizados os métodos de Coagulação em Gel (*Gel-Clot*), um teste semiquantitativo e mais simples, baseado na formação de coágulo ou gel (Figura 5), e o Cromogênico-cinético, um ensaio quantitativo (Figura 6).

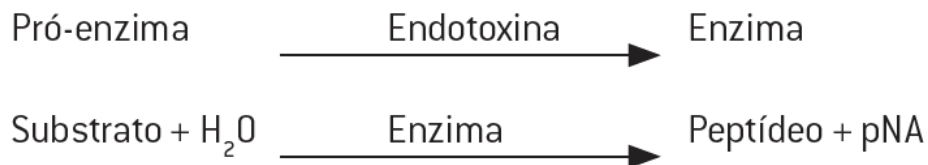
Figura 5 - Esquema detalhado do ensaio de endotoxinas pelo método *Gel-Clot*



Fonte: Adaptado de LONZA BIOSCIENCE.

Um dos produtores utiliza o método *Gel-Clot* para a determinação de endotoxinas. Onde há a mistura do reagente LAL com a amostra em tubos de ensaio que serão incubados a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $1\text{h} \pm 2\text{min}$. Após o período de incubação, o tubo é examinado para determinar se há um coágulo (ou gel) formado no fundo do tubo. Um resultado positivo é indicado pela presença de um coágulo que permanece no fundo do tubo após uma inversão suave, enquanto um resultado negativo é indicado pelo líquido fluido. Os kits utilizados pelo INCQS são da marca Bioscience Lonza®, composto pelos reagentes LAL (PYROGENT® Regent), Control Standard Endotoxin (CSE) e LAL Reagent Water (LRW). A sensibilidade do kit é de 0,125 EU/mL.

Figura 6 - Princípio da reação no método cromogênico cinético



Fonte: Adaptado de ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE.

Os três outros fabricantes utilizam o método cromogênico cinético. O ensaio se baseia na medida da cor em diferentes intervalos de tempo após a adição do substrato cromogênico (contendo o reagente LAL e o reagente cromogênico) à amostra em teste. O intervalo de tempo necessário para a mudança de cor ocorre de maneira inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente. A concentração de LPS é calculada por interpolação em uma curva padrão. A amostra sob teste é misturada com o substrato cromogênico em uma placa de 96 poços, a qual é disposta em um leitor de placas e a absorção é medida a 405 nm. Os kits utilizados pelo INCQS são da marca Bioscience Lonza®, composto pelos reagentes LAL (Kinetic-QCL® Reagent), LAL *reconstitution buffer* e água reagente para o LAL (LRW). A sensibilidade do kit utilizado é de 0,005 EU/mL e a solução teste é considerada válida se a medida da concentração de endotoxina adicionada à solução teste estiver na faixa de 50% a 200% de recuperação, após subtração de qualquer endotoxina detectada no controle negativo.

1.7 Justificativa

Atualmente, o risco de contaminações de produtos injetáveis com substâncias termogênicas é significativamente baixo, visto que as indústrias são altamente reguladas quanto ao cumprimento das normas das BPF e contam com um rígido controle da qualidade durante o processo produtivo (ANVISA, 2022).

Todas as especificações dos produtos e ensaios realizados no INCQS são baseadas ou na Farmacopeia Brasileira e/ou nas internacionais (ANVISA, 2009). O ensaio de endotoxinas bacterianas é considerado um teste de segurança do produto e os limites de tolerância são necessários para definir os protocolos do ensaio LAL, com a finalidade de assegurar a ausência de endotoxinas (WILLIAMS, 2004).

Em geral, nas Farmacopeias Brasileira e Internacionais são definidos os limites de aceitação de endotoxinas para cada vacina, mas a tendência é que as agências regulatórias considerem o histórico de resultados obtidos nos produtos durante o desenvolvimento e ensaios clínicos. No caso das vacinas Covid-19 recentemente desenvolvidas, ainda não existem legislações determinando as especificações de todos os controles laboratoriais realizados pelo produtor e as autoridades regulatórias nacionais e internacionais estão se baseando nos dossiês de produção e controle de qualidade dos fabricantes na liberação das vacinas para uso emergencial e/ou registros definitivos (ANVISA, 2020). O INCQS analisa os protocolos de produção e os resultados dos ensaios de controle de qualidade nas vacinas já aprovadas pela Anvisa para a utilização no mercado, assim como implementando as análises laboratoriais para liberação dos lotes.

No caso do ensaio LAL, cada fabricante considera um limite de aceitação, assim como utiliza métodos diferentes no ensaio, visto que as vacinas atualmente distribuídas pelo PNI são produzidas com técnicas distintas e, conseqüentemente, os limites máximos de aceitação informados podem variar, dependendo da plataforma utilizada. Portanto, é de extrema importância um estudo de tendência dos resultados do fabricante, assim como a comparação com os ensaios laboratoriais realizados no INCQS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar e comparar os resultados de endotoxinas bacterianas declarados nos protocolos de controle da qualidade dos fabricantes das vacinas Covid-19 com os obtidos no INCQS.

2.2 Objetivos específicos

- Relacionar os limites máximos de aceitação especificados por cada um dos quatro fabricantes das vacinas Covid-19 atualmente utilizadas pelo PNI.
- Averiguar os métodos utilizados para a determinação de endotoxinas e todos os resultados obtidos nos lotes das vacinas Covid-19 liberadas para o PNI.
- Realizar os ensaios pelos métodos farmacopeicos para endotoxina bacteriana, de acordo com a especificação e método dos fabricantes e comparar os resultados obtidos no INCQS.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostras das vacinas Covid-19

Foram analisadas um total de 37 amostras, sendo dois dos fabricantes nacionais e dois fabricantes estrangeiros, caracterizados como A, B, C e D.

As amostras faziam parte da rotina do laboratório de endotoxina bacteriana do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS e foram analisadas através dos métodos Gel-clot e cromogênico cinético, sendo essa escolha baseada no método utilizado por cada produtor.

A quantidade de amostras variou, pois foi descontinuada a aquisição pelo PNI das vacinas dos fabricantes A e C entre agosto de 2022 e janeiro de 2023. A partir de janeiro de 2023, somente os fabricantes B e D estão fornecendo vacinas para o PNI.

3.2 Concentração dos Limites de Endotoxinas (CLE)

Os limites máximos de aceitação especificado e os métodos utilizados para o ensaio de endotoxinas das vacinas Covid-19 de quatro diferentes fabricantes (A, B, C e D) e plataformas de produção foram verificados através de consulta aos Protocolos Resumidos de Produção e Controle da Qualidade (PRPCQ) enviados para a liberação final no INCQS de janeiro de 2021 a agosto de 2022 e os dados foram plotados no programa Excel®.

3.3 Determinação da Máxima Diluição Válida (MDV)

Como as CLE dos produtores são variáveis, foi determinada a MDV de cada vacina de acordo com a equação: $MDV = CLE / \text{sensibilidade do kit do LAL (FDA, 1987)}$.

Os testes foram realizados em alíquotas da amostra em diluições que não excediam a MDV.

As especificações dos limites máximos de endotoxinas bacterianas foram estabelecidas pelos fabricantes e as quantificações declaradas pelos mesmos nos PRPCQ foram demonstrados como média \pm erro padrão. Para isso, utilizou-se o

programa GraphPad Prism 6.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de P foi inferior a 0,05 ($P < 0,05$). Os resultados obtidos no INCQS foram comparados àqueles dos produtores e na análise estatística foi utilizado o Teste t.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro/2021 a agosto/2022, o INCQS recebeu um total de 1.077 amostras dos quatro fabricantes que forneceram vacinas Covid-19 para o PNI. Na análise dos PRPCQ dos produtores, observou-se que os limites máximos de endotoxinas são distintos, variando entre 10 EU/mL e 25 EU/mL, sendo que os produtores A e C estipulam as mesmas concentrações limites. Três produtores utilizam o método cromogênico cinético e um produtor utiliza o método *Gel-Clot* para determinação de endotoxinas (Tabelas 2 e 3).

Tabela 3 - Especificações dos fabricantes do limite máximo de endotoxinas nas vacinas Covid-19 utilizadas no Brasil

Fabricante	Método do ensaio	Limite máximo (EU/mL)
A	Coagulação em Gel	≤ 10
B	Cromogênico cinético	≤ 25
C	Cromogênico cinético	≤ 10
D	Cromogênico cinético	≤ 12,5

Fonte: O autor, 2023.

Entre os quantitativos distribuídos, o fabricante B foi o maior fornecedor, com 523 lotes, enquanto os produtores A, C e D forneceram, respectivamente, 374, 50 e 130 lotes.

Na Tabela 3, estão descritas as faixas de determinação de endotoxinas consideradas pelos fabricantes, onde se observa uma grande diferença entre os valores declarados pelos produtores nos PRPCQ. No entanto, todos os resultados se mantiveram abaixo do limite estabelecido para cada vacina.

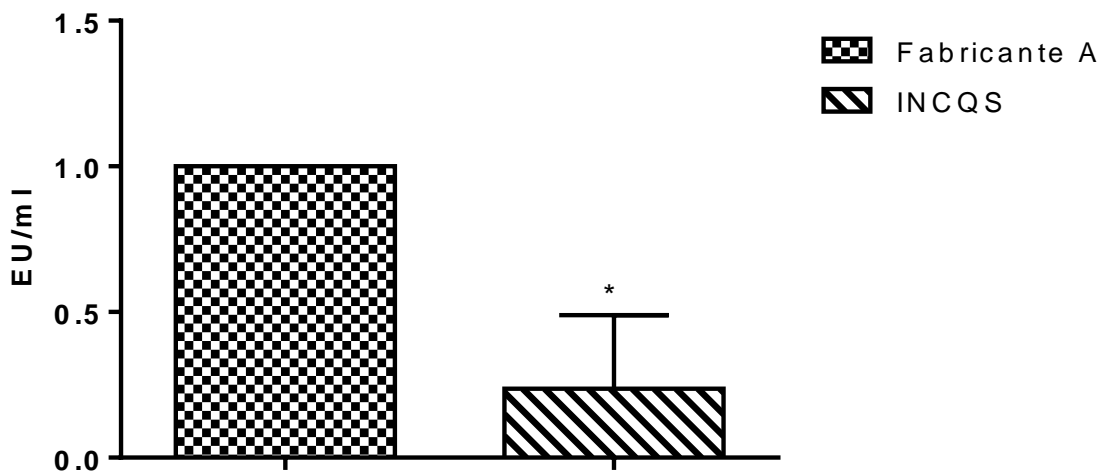
Tabela 4 - Variação das faixas de limites máximos considerados pelos fabricantes nos ensaios de endotoxinas bacterianas

Fabricante	Especificação (EU/mL)	Variação dos limites (EU/mL)
A	≤ 10	0,1250 a < 10,0000
B	≤ 25	0,2000 a 0,5946
C	≤ 10	1,0000 a 5,0000
D	$\leq 12,5$	1,5000 a < 10,0000

Fonte: O autor, 2023.

Nas amostras do Fabricante A testadas no INCQS, foi utilizado um kit LAL *Gel-Clot* de sensibilidade de 0,125 EU/mL e a MDV calculada foi de 1:80. Portanto, as diluições utilizadas no teste variaram de 1:20 a 1:80, onde foram obtidos resultados significativamente inferiores aos do fabricante (Figura 7).

Figura 7 - Comparação dos resultados de endotoxinas determinados pelo Fabricante A (N = 5) e o INCQS



Legenda: Os dados se encontram expressos como Média \pm Desvio Padrão da Média. Fabricante A: 1,0 \pm 0,0 EU/mL e INCQS: 0,2375 \pm 0,2516 EU/mL. *estatisticamente diferente ($p < 0,0001$).
Fonte: O autor, 2023.

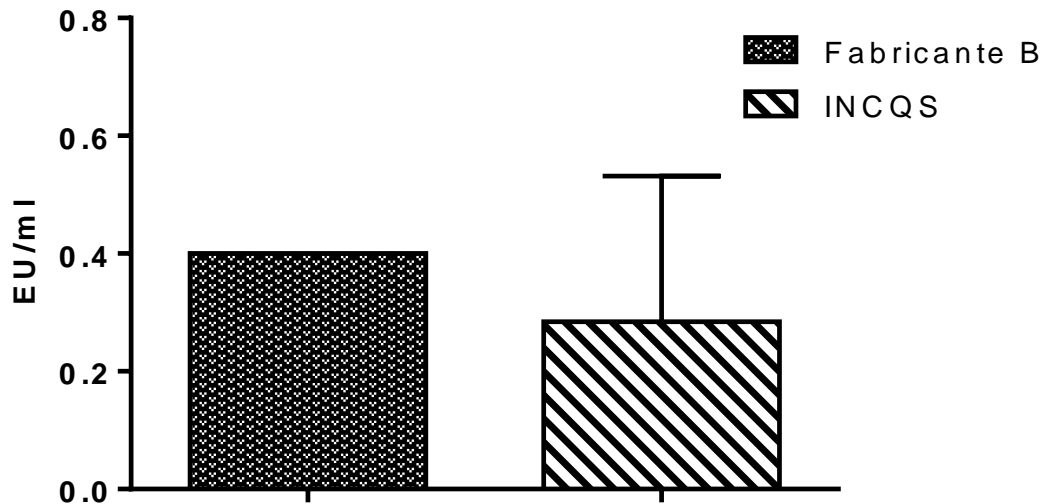
Tabela 5 - Comparação dos resultados do Fabricante A com os resultados obtidos através da análise no INCQS

Lote:	Resultados do fabricante A (EU/mL):		Resultados do INCQS (EU/mL):	
1	< 1,0000	✓	< 0,1250	✓
2	< 1,0000	✓	< 0,1250	✓
3	< 1,0000	✓	< 0,1250	✓
4	< 1,0000	✓	> 0,1250 e < 1,125	✓
5	< 1,0000	✓	< 0,1250	✓

Fonte: O autor, 2023.

Para o Fabricante B, o MDV foi de 1:5000, mas a diluição utilizada para os testes foi de 1:10, a qual não demonstrou interferentes. As amostras recebidas no INCQS deste fabricante são disponibilizadas em quantidades maiores, pois em cada cinco lotes um deles é submetido a todos os testes laboratoriais. Na figura 8, observa-se que não houve diferença significativa quando comparados os resultados do produtor com as determinações realizadas no INCQS.

Figura 8 - Comparação dos resultados de endotoxinas determinados pelo Fabricante B (N = 14) e o INCQS



Legenda: Os dados se encontram expressos como Média \pm Desvio Padrão da Média. Fabricante B: $0,40 \pm 0,0$ EU/mL e INCQS: $0,2841 \pm 0,2475$ EU/mL ($p = 0,09$).
Fonte: O autor, 2023.

Tabela 6 - Comparação dos resultados do Fabricante B com os resultados obtidos através da análise no INCQS (continua)

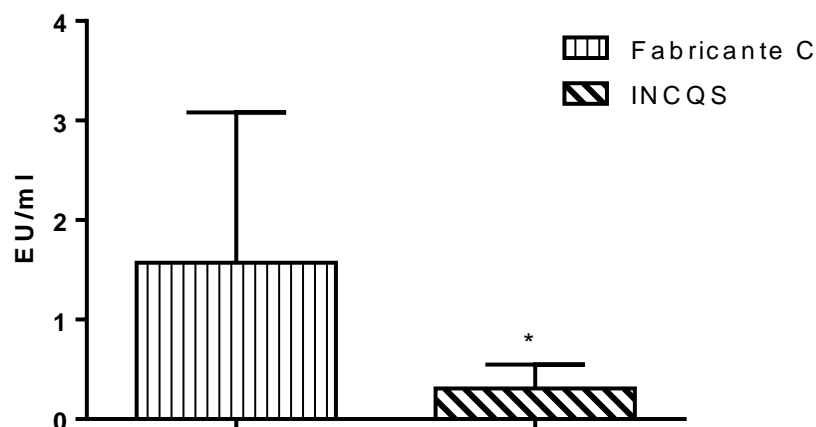
Lote:	Resultados do fabricante B (EU/mL):		Resultados do INCQS (EU/mL):	
	Resultado	Verificação	Resultado	Verificação
1	< 0,4000	✓	< 0,0500	✓
2	< 0,4000	✓	< 0,0500	✓
3	< 0,4000	✓	< 0,0500	✓
4	< 0,4000	✓	< 0,0500	✓
5	< 0,4000	✓	0,0372	✓
6	< 0,4000	✓	0,6400	✓

7	< 0,4000	✓	< 0,0500	✓
8	< 0,4000	✓	< 0,5000	✓
9	< 0,4000	✓	< 0,0500	✓
10	< 0,4000	✓	< 0,5000	✓
11	< 0,4000	✓	< 0,5000	✓
12	< 0,4000	✓	< 0,5000	✓
13	< 0,4000	✓	< 0,5000	✓
14	< 0,4000	✓	< 0,5000	✓

Fonte: O autor, 2023.

Para o Fabricante C, o MVD foi de 1:2000, no entanto, foi usada a diluição 1:100, a qual demonstrou ser livre de interferentes. Como demonstrado na Figura 9, as determinações de endotoxinas no INCQS, quando comparadas ao Fabricante C, foram significativas.

Figura 9 - Comparação dos resultados de endotoxinas determinados pelo Fabricante C (N = 7) e o INCQS



Legenda: Os dados se encontram expressos como Média \pm Desvio Padrão da Média. Fabricante C: 1,571 \pm 1,512 EU/mL e INCQS: 0,3071 \pm 0,2405 EU/mL. *estatisticamente diferente ($p < 0,0494$).

Fonte: O autor, 2023.

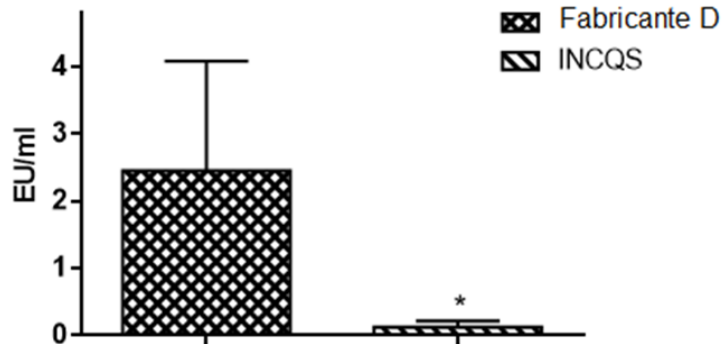
Tabela 7 - Comparação dos resultados do Fabricante C com os resultados obtidos através da análise no INCQS (continua)

Lote:	Resultados do fabricante C (EU/mL):		Resultados do INCQS (EU/mL):	
1	< 5,0000	✓	< 0,0500	✓
2	< 1,0000	✓	< 0,0500	✓
3	< 1,0000	✓	< 0,5000	✓
4	< 1,0000	✓	< 0,5000	✓
5	< 1,0000	✓	< 0,0500	✓
6	< 1,0000	✓	< 0,5000	✓
7	< 1,0000	✓	< 0,5000	✓

Fonte: O autor, 2023.

Para o Fabricante D, o MVD foi de 1:2500, no entanto, foi usada a diluição 1:10, a qual demonstrou ser livre de interferentes. Na comparação entre as determinações entre do INCQS e o Fabricante D, as concentrações de endotoxinas obtidas no INCQS foram significativamente menores (Figura 10).

Figura 10 - Comparação dos resultados de endotoxinas determinados pelo Fabricante D (N = 11) e o INCQS



Legenda: Os dados se encontram expressos como Média \pm Desvio Padrão da Média. Fabricante D: $2,455 \pm 1,635$ EU/mL e INCQS $0,1221 \pm 0,0916$ EU/mL. *estatisticamente diferente ($p < 0,0001$).
Fonte: O autor, 2023

Tabela 8 - Comparação dos resultados do Fabricante D com os resultados obtidos através da análise no INCQS

Lote:	Resultados do fabricante D (EU/mL):		Resultados do INCQS (EU/mL):	
1	< 1,5000	✓	0,0386	✓
2	< 1,5000	✓	0,0356	✓
3	< 1,5000	✓	0,2880	✓
4	< 1,5000	✓	0,2230	✓
5	< 1,5000	✓	0,2270	✓
6	< 1,5000	✓	0,1280	✓
7	< 1,5000	✓	0,0383	✓
8	< 5,0000	✓	0,0446	✓
9	< 5,0000	✓	0,1020	✓
10	< 1,5000	✓	0,1680	✓
11	< 5,0000	✓	< 0,0500	✓

Fonte: O autor, 2023.

Dentre os testes de segurança, o ensaio para detecção de endotoxinas bacterianas é fundamental e, embora o termo “pirogênio” seja geral para definir agentes indutores de febre, na indústria farmacêutica é frequentemente usado para descrever o LPS. Outras substâncias pirogênicas podem ocorrer, embora os riscos sejam menores, pois as endotoxinas são termoestáveis e não são eliminadas por processos de purificação ou filtração esterilizante (TOURS, 2008).

O fabricante A é o único que utiliza adjuvante de alumínio na composição, o qual tem a função de aumentar a imunogenicidade da vacina de vírus inteiro inativado (OMS, 2021). Portanto, pode-se imaginar que ele utiliza o método *Gel-clot*, semi-quantitativo, devido ao fato de o sal de alumínio ser um composto que pode mascarar o resultado quantitativo do produto pelo método cromogênico cinético, inibindo a formação da coloração inerente ao teste (PARK, 2004). Um outro fator observado nos protocolos é que o produtor do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) declara como resultado um valor menor ou igual a 10 EU/mL, o limite máximo considerado para a vacina, enquanto no produto final, o fabricante A executa o ensaio para um valor igual ou menor do que 1,0 EU/mL.

Os limites de endotoxinas entre os fabricantes são variáveis e, embora o fabricante B tenha estabelecido um limite maior, está de acordo com aqueles considerados para outras vacinas e com a FDA, em que é admitido um limite de até 350 EU/mL para uma vacina com dose de 0,5 mL (FDA, 1987).

No mercado existem diversos kits, os quais podem variar a técnica e a sensibilidade dos mesmos em relação à marca utilizada pelo INCQS. Nos PRPCQ dos fabricantes não é declarada a sensibilidade dos kits utilizados nem as diluições das vacinas para os ensaios. Essas informações deveriam constar dos protocolos para melhor análise na comparação dos resultados entre todos os fabricantes e o INCQS. Desta forma, pode ser que os resultados obtidos no INCQS tenham sido inferiores àqueles de todos os produtores, pois foram utilizadas sensibilidades diferentes de 0,125 EU/mL e 0,005 EU/mL, respectivamente, para os métodos Gel-Clot e cromogênico cinético, com objetivo de se obter menores concentrações possíveis.

Apesar das altas taxas de cobertura vacinal terem perdurado durante muitos anos, o país tem visto o seu desempenho declinar e doenças ressurgirem nos mais recentemente. O contexto de queda da cobertura vacinal foi consideravelmente exacerbado no Brasil e no mundo durante 2020 devido à pandemia de Covid-19 (SATO, 2018; SAXENA, 2020).

Para adquirir a confiança da população, é essencial que os laboratórios produtores tornem públicas as pesquisas e eficácia das vacinas. A partir de 2020, com o argumento da eficácia e segurança da vacina Covid-19, houve maior aceitação e disposição das pessoas em serem vacinadas (MATHIEU, *et al.*,2021).

Apesar dos compêndios Internacionais ainda não terem publicado monografia para a vacina Covid-19, alguns testes de segurança já podem ser realizados para garantir a segurança biológica do produto, como preconizados pelas monografias existentes de vacinas para uso humano (SANDEL, 2015; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2022).

5 CONCLUSÕES

As concentrações limites de endotoxinas informadas pelos Fabricantes A, B, C e D estão significativamente abaixo do que aquela estipulada pelo FDA. Os métodos utilizados pelos quatro fabricantes estão de acordo a monografia de determinação de endotoxinas bacterianas da Farmacopeia Brasileira. Todos os lotes testados no INCQS estão abaixo das especificações adotadas pelos quatro fabricantes.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 55, 16 de dezembro de 2010**. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos. Brasília, DF, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 658, 30 de março de 2022**. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília, DF, 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 73, de 21 out 2008**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. Brasília, DF, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 298, de 12 de agosto de 2019**. Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira 6ª edição. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 23 jan. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 37, 7 de julho de 2009**. Trata da admissibilidade das Farmacopéias estrangeiras. Brasília, DF, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 444, de 10 dezembro de 2020**. Estabelece a autorização temporária de uso emergencial, em caráter experimental, de vacinas Covid-19 para o enfrentamento da emergência de saúde pública de importância nacional decorrente do surto do novo coronavírus (SARS-CoV-2). Brasília, DF, 2020.

BRASIL. **Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990**. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/images/documentos/legislacao/leis/lei8080.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2022.

BRASIL. **Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Brasília, DF, 1999.

BRASIL. **Decreto nº 78.231, de 12 de agosto de 1976**. Regulamenta a Lei nº 6.259, de 30 de outubro de 1975, que dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências. Brasília, DF, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Calendário de vacinação**. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2022>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BRASIL. **Universidade Aberta do Sistema Único de Saúde (UMA-SUS)**. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/noticia/ministerio-da-saude-inclui-criancas-de-5-a-11-anos-na-campanha-de-vacinacao-contr-a-covid-19>. Acesso em: 23 jan. 2023.

CASCELLA, M. *et al.* **Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19)**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>. Acesso em: 23 jan. 2023.

COSTA, C.; TOMBESI, C. **Coronavírus**: gráfico mostra tempo que humanidade levou para criar vacinas e recorde para covid-19. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/internacional-55232520>. Acesso em: 15 jan. 2023.

CUI, J. *et al.* Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature, Reviews Microbiology**, London, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019.

DOMINGUES, C.M.A *et al.* 46 anos do Programa Nacional de Imunizações: uma história repleta de conquistas e desafios a serem superados. **Cad. Saúde Pública**, Brasília, v. 36 Sup 2, p. 1-17, abr. 2020.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 11th. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2022.

FAVERO, M. *et al.* A prospective study of pyrogenic reactions in Hemodialysis patients using bicarbonate dialysis fluids filtered to remove bacteria and endotoxin. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 3, p.1001-7,1992.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA Takes Key Action in Fight Against COVID-19 By Issuing Emergency Use Authorization for First COVID-19 Vaccine**. 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-takes-key-action-fight-against-covid-19-issuing-emergency-use-authorization-first-covid-19>. Acesso em: 20 jan. 2023.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices**. 1987.

HARDING, G. B *et al.* Endotoxin and bacterial contamination of dialysis center water and dialysate: a cross sectional survey. **The International Journal of Artificial Organs**, v.3, p. 39-43, 1990.

INSTITUTO BUTANTAN. **Bula da coronavac**. Disponível em: https://vacinacovid.butantan.gov.br/assets/arquivos/Bulas_Anvisa/2022.02.01-%20Bula%20profissional%20da%20sa%C3%BAde.pdf. Acesso em: 20 jan. 2023.

JHU CSSE. **COVID-19**. Disponível em: <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>. Acesso em: 24 jan. 2023.

KOLIFARHOOD, G. *et al.* Epidemiological and clinical aspects of COVID-19: a narrative review. **Arch Acad Emerg Med**, v. 8, p.41e, 2020.

LONZA BIOSCIENCE. **Traditional gel clot limulus amebocyte lysate (lal) assay procedure quick guide.** Disponível em: <https://bioscience.lonza.com/download/content/asset/28673>. Acesso em: 12 fev. 2023.

LONZA BIOSCIENCE. Disponível em: <https://bioscience.lonza.com>. Acesso em: 12 fev. 2023.

LI, Q. *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. **N Engl J Med**, v 382 p.1199-207, 2020.

MACLEAN, O. A. *et al.* No evidence for distinct types in the evolution of SARS-CoV-2. **Virus Evolution**, Oxford, v. 6, n. 1, jan. 2020.

MOHAMED, A. *et al.* An expert review on current approaches for endotoxin detection in various biological products. **Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**, v. 1, n. 2, p. 142-153, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease (COVID-19)**, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The current COVID-19 situation.** Disponível em: <https://www.who.int/countries/bra/>. Acesso em: 31 jan. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <https://www.webmd.com/lung/coronavirus>. Acesso em: 23 jan. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **COVID-19 vaccine trial designs in the context of authorized COVID-19 vaccines and expanding global access: ethical considerations.** 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Policy-brief-Vaccine-trial-design-2021>. Acesso em: 10 dez. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Background document to the WHO recommendations for use of the inactivated COVID-19 vaccine, CoronaVac, developed by Sinovac.** 24 maio 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Background document on the AZD1222 vaccine against COVID-19 developed by Oxford University and AstraZeneca.** 1 mar. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Background document on mRNA vaccine BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) against COVID-19.** 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Background document on the Janssen Ad26.COV2. S (COVID-19) vaccine.** 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products**. Brasília, 1992. (WHO Technical Report Series, nº 822, Annex 2).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Regulation and quality control of vaccines**. Disponível em: <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccine-standardization/regulation-and-quality-control-of-vaccines>. Acesso em: 12 jan. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Vaccination**. Brasília, 2022. Disponível em: <https://ourworldindata.org/vaccination#vaccine-innovation>. Acesso em: jan 2023.

PARK, Chul-Yong *et al.* Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide, **Biologicals**, v. 33 p. 145 – 151, 2005.

PFIZER. Disponível em: https://www.pfizer.com.br/sites/default/files/inline-files/Comirnaty_Profissional_de_Saude_36.pdf. Acesso em: 22 jan. 2023.

POON, L. L. M. *et al.* The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 4, n. 11, p. 663-671, nov. 2004.

ROBINSON, J. **Pandemics**. 2022. Disponível em: <https://www.webmd.com/cold-and-flu/what-are-epidemics-pandemics-outbreaks>. Acesso em: 21 jan. 2023.

ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2009. 301 p.

SANDEL, T. Assessing non-endotoxin microbial pyrogens in relation in pharmaceutical processing. **J. GXP Compliance**, v. 19, p.1-12, 2015.

SANDLE, T. **Pharmaceutical microbiology: essentials for quality assurance and quality control**. Sawston: Woodhead Publishing, 2015.

SATO, A. P. S. Qual a importância da hesitação vacinal na queda das coberturas vacinais no Brasil? **Revista de Saúde Pública**, v. 52, n. 96, p.1-9, 2018.

SAXENA, S. *et al.* Routine vaccination during covid-19 pandemic response. **The BMJ**, v. 368, p. 1-2, 2020.

TOURS, N; SANDLE, T. Comparison of dry-heat depyrogenation using three different types of Gram-negative bacterial endotoxin. **European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences**, v.13, n. 91, p. 17-20, 2008.

UNIVERSITY OF OXFORD. **Pfizer-BioNTech**. Oxford, 2020. Disponível em: <https://www.research.ox.ac.uk/article/2020-07-19-the-oxford-covid-19-vaccine>. Acesso em: 20 fev. 2023.

VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. The COVID-19 epidemic. **Trop Med Int Health**, v. 25, p. 278-80, 2020.

WANG, C. *et al.* A novel coronavirus outbreak of global health concern. **Lancet**, v. 395, p. 470-73, 2020.

WEIR, L.; MYKHALOVSKIY, E. Book review: global public health vigilance: creating a world on alert. **Sage Journals**, v. 16, n. 2, 2010. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1363459311418579>. Acesso em: 06 jan. 2023.

WILLIAMS, K. L. (ed.). **Endotoxins**: pyrogens, LAL testing and depyrogenation. 3. ed. [S.l.]: CRC Press, 2004.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 323, p. 1239-42, 2020.

YOUNG, N. S.; LEVIN, J. Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. **J. Clin. Invest**, v. 51, p.1790, 1972.

ZAKI, A. M *et al.* Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England journal of Medicine**, Boston, v. 367, n. 19, p. 1814-1820, nov. 2012.