

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

Karen Vasconcelos de Farias Faro

**ESTABELECIMENTO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO PARA O ENSAIO
DE POTÊNCIA DA VACINA ADSORVIDA CONTRA HEPATITE B**

Rio de Janeiro

2024

Karen Vasconcelos de Farias Faro

ESTABELECIMENTO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO PARA O ENSAIO DE
POTÊNCIA DA VACINA ADSORVIDA CONTRA HEPATITE B

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, 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 Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Dra Renata Faria de Carvalho

Preceptora: MSc Anna Christina Rosa Guimarães

Rio de Janeiro

2024

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Faro, Karen Vasconcelos de Farias

Estabelecimento de lote de referência de trabalho para o ensaio de potência da vacina adsorvida contra Hepatite B. / Karen Vasconcelos de Farias Faro. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2024.

60 f. : il. ; fig. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2024.

Tutora: Renata Faria de Carvalho

Preceptora: Anna Christina Rosa Guimarães

1. Potência de Vacina. 2. Hepatite B. 3. Controle de Qualidade. I. Título.

Establishment a working reference batch for the potency test of the adsorbed Hepatitis B vaccine

Karen Vasconcelos de Farias Faro

ESTABELECIMENTO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO PARA O ENSAIO
DE POTÊNCIA DA VACINA ADSORVIDA CONTRA HEPATITE B

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, 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 Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: 06/02/2024

BANCA EXAMINADORA

Dr. Fausto Ferraris

Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Wildeberg Cal Moreira

Fundação Oswaldo Cruz

MSc Antonio Alves Pereira Júnior

Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Renata Faria de Carvalho – (Tutora)

Fundação Oswaldo Cruz

MSc Anna Christina Rosa Guimarães – (Preceptora)

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico esse trabalho a todos aqueles que torcem por mim, em especial a minha amada mãe, que sempre está e esteve ao meu lado me incentivando a superar cada adversidade em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por me sustentar nas dificuldades e por permitir tantas pessoas do bem cruzarem o meu caminho.

À minha mãe Carmen Lucia e ao meu pai Ronei por me darem a vida e me incentivarem a trilhar a trajetória do estudo com dedicação.

À minha irmã pelo companheirismo e amizade.

Às minhas primas, tias, avós e aos meus amigos que também são família para mim.

Ao meu cachorrinho Angel por todo carinho, amor e fidelidade. Por todas as vezes em que eu estava redigindo este texto e ele esteve ali, fiel, ao meu lado, me fazendo companhia independente da hora.

À equipe maravilhosa do Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células. Obrigada por todo compartilhamento de conhecimento e de risos. Vocês tornaram esse processo mais leve e feliz.

À minha orientadora Renata Faria e à minha preceptora Anna Christina por me acolherem, orientarem e estarem sempre disponíveis e abertas.

Ao grupo do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/ Fiocruz. Ao Departamento de Imunologia e seus funcionários, por todo acolhimento e boa vivência. Aos desafios vencidos que nos tornam pessoas mais bem capacitadas intelectualmente, emocionalmente e espiritualmente.

Se você pode sonhar, você pode realizar.

Walt Disney

RESUMO

O desenvolvimento de vacinas contra Hepatite B tem sido essencial para prevenção desta doença viral que, de acordo com a OMS, em 2019 matou cerca de 820 mil indivíduos, e estima-se que, a cada ano, em torno de 1,5 milhões de novas infecções surgem em todo o mundo. No Brasil, estas vacinas são distribuídas gratuitamente pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI). Nesse contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, presente na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), é essencial, pois é a instituição responsável por realizar o controle da qualidade de todas as vacinas do PNI. As vacinas contra Hepatite B disponibilizadas pelo PNI possuem a tecnologia de DNA recombinante para expressão do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) em leveduras. Um dos ensaios realizados no INCQS, é a determinação da potência que avalia a capacidade da vacina em oferecer imunidade após sua administração. O método utilizado nesta avaliação é um ensaio imunoenzimático (ELISA), que quantifica o HBsAg presente na amostra. Um dos instrumentos críticos para o cumprimento das diretrizes de qualidade contidos na Resolução Diretoria Colegiada (RDC) 512/2021 estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade, na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 e na Farmacopeia Brasileira é o uso de controles internos durante a execução dos ensaios laboratoriais de controle, de modo a garantir a qualidade e a validade dos resultados obtidos. Neste cenário, o presente trabalho objetiva estabelecer um lote de referência de trabalho interno para o produtor LG CHEM/ Instituto Butantan, a ser utilizado nos ensaios de avaliação de potência de vacina deste mesmo produtor. Para isto, com base na análise documental dos resultados apresentados no Protocolo Resumido de Produção e Controle de Qualidade do Produto (PRPCQ), um lote de vacina candidata à referência de trabalho foi selecionado, e foram realizados quatro ensaios de potência, com dois analistas diferentes, em dias distintos. Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio de análises de “Linhas Paralelas”, que verificou desvios de linearidade e paralelismo, através do Software Combistats® v.7. Posteriormente, um gráfico de controle foi elaborado a partir dos valores de absorbância, utilizando o Software SPC Explorer RT ® v.5, estabelecendo limites máximo e mínimo aceitos. Por fim, no Software Combistats® v.7, a potência da vacina referência de trabalho foi calculada através da combinação dos resultados de potência. Todos os ensaios foram considerados satisfatórios, não exibindo desvios de linearidade

e paralelismo. Além disso, as potências estimadas foram superiores a 75% do valor rotulado pelo produtor. As absorvâncias de cada diluição se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pelo gráfico de controle. Pode-se inferir, portanto, que o lote candidato à vacina de Referência de Trabalho atendeu às condições necessárias para se tornar o novo lote de vacina de Referência de Trabalho.

Palavras-chave: Vacina. Hepatite B. Referência Interna. Determinação da Potência

ABSTRACT

The development of vaccines against Hepatitis B has been essential for the prevention of this viral disease which, according to the WHO, killed around 820,000 people in 2019, and it is estimated that around 1.5 million new infections occur worldwide each year. In Brazil, these vaccines are distributed free of charge by the National Immunization Program (PNI). In this context, the National Institute for Quality Control in Health - INCQS, which is part of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), is essential, as it is the institution responsible for carrying out quality control of all the PNI vaccines. The Hepatitis B vaccines made available by the PNI use recombinant DNA technology to express the surface antigen of the Hepatitis B virus (HBsAg) in yeast. One of the tests carried out at INCQS is the determination of potency, which aims to assess the vaccine's ability to provide immunity after administration. The method used in this evaluation is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which quantifies the HBsAg present in the sample. One of the critical instruments for compliance with the quality guidelines contained in Collegiate Board Resolution (RDC) 512/2021 established by the National Health Surveillance Agency (ANVISA), which provides for Good Practices for Quality Control Laboratories, in the ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 standard and in the Brazilian Pharmacopoeia is the use of internal controls during the execution of laboratory control tests, in order to guarantee the quality and validity of the results obtained. Against this backdrop, this study aims to establish an internal working reference batch for the producer LG CHEM/ Instituto Butantan, to be used in the vaccine potency evaluation tests of this same producer. To this end, based on a documentary analysis of the results presented in the Product Production and Quality Control Summary Protocol (PRPCQ), a batch of vaccine was selected as a candidate for the working reference, and four potency tests were carried out, with two different analysts, on different days. The results were statistically evaluated using "Parallel Lines" analysis, which checked for deviations from linearity and parallelism, using the Combistats® v.7 software. Subsequently, a control graph was drawn up from the absorbance values, using the SPC Explorer RT ® v.5 software, establishing maximum and minimum accepted limits. Finally, in Combistats® v.7, the potency of the reference vaccine was calculated by combining the potency results. All the tests were considered satisfactory, with no deviations in linearity or parallelism. In addition, the estimated potencies were higher than 75% of the value labeled by the

manufacturer. The absorbances of each dilution remained within the limits established by the control chart. It can therefore be inferred that the candidate batch for the Working Reference vaccine met the necessary conditions to become the new batch of Working Reference vaccine.

Keywords: Vaccine. Hepatitis B. Internal Reference. Potency Evaluation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelos de partículas virais do vírus da hepatite B (VHB) e subvirais não infecciosas.....	17
Figura 2 -	Representação esquemática da estrutura do vírus da hepatite B (VHB).....	18
Figura 3 -	Endemicidade global para o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HbsAg).....	19
Figura 4 -	Percentual de casos de hepatites virais notificados segundo as regiões do Brasil (2000 a 31 de dezembro de 2022).....	21
Figura 5 -	Interpretação dos resultados sorológicos para Hepatite B (HB).....	23
Figura 6 -	Pré-tratamento das amostras em paralelo.....	32
Figura 7 -	Diluição das amostras para realização do Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	33
Figura 8 -	Distribuição das triplicatas das diluições e dos controles positivo e negativo na microplaca.....	34
Figura 9 -	Representação do Ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche.....	35
Figura 10 -	Resumo dos critérios de aprovação do ensaio.....	36
Figura 11 -	Gráfico de controle para diluição de 0,25 ng/mL do lote A.....	40
Figura 12 -	Gráfico de controle para diluição de 0,50 ng/mL do lote A.....	41
Figura 13 -	Gráfico de controle para diluição de 1,0 ng/mL do lote A.....	42
Figura 14 -	Gráfico de controle para diluição de 1,50 ng/mL do lote A.....	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados dos quatro ensaios com seus respectivos analistas, datas de realização, potências estimadas do lote A (candidato à vacina de referência de trabalho) e limites de confiança mínimo e máximo.....38
- Tabela 2 - Resultados de média, desvio padrão e coeficiente de variação provenientes do cálculo de variação da potência entre os quatro ensaios do lote A (candidato à vacina de referência de trabalho).....39
- Tabela 3 - Limites máximos e mínimos e médias dos gráficos de controle para as diluições de 0,25 ng/mL; 0,50 ng/mL; 1,00 ng/mL e 1,50 ng/mL.....39

LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra HBcAg
Anti-HBe	Anticorpo contra HBeAg
Anti-HBs	Anticorpo contra HBsAg
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês: <i>Bovine Serum Albumine</i>)
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro
CV	Coefficiente de variação
DEA	Dietanolamina
DI	Departamento de Imunologia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês: <i>Linked Immunosorbent Assay</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HB	Hepatite B
HBcAg	Antígeno do core vírus da Hepatite B
HBeAg	Antígeno e do vírus da Hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HIB	<i>Haemophilus influenza</i> tipo B
HRP	Peroxidase de rábano
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LVBCC	Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células
mL	Mililitros
mUI/mL	Miliunidades Internacionais por mililitro
ng	nanogramas

nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês: <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunização
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PRPCQ	Protocolo Resumido de Produção e Controle de Qualidade
PU	Procedimento de uso
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotações por minuto
SES	Secretarias Estaduais de Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
UNICEF	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i>
VHB	Vírus da Hepatite B
VHD	Vírus da Hepatite D
VS	Vigilância Sanitária
µL	Microlitros
°C	Graus celsius
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Hepatite B	16
1.2	Agente etiológico e imunopatogenicidade	16
1.3	Epidemiologia	19
1.4	Transmissão e sintomatologia	21
1.5	Diagnóstico e tratamento	22
1.6	Prevenção	24
1.7	Vigilância Sanitária	25
1.7.1	Controle de qualidade de vacinas HB.....	27
1.8	Justificativa	28
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	METODOLOGIA	30
3.1	Amostras de lote candidato à referência de trabalho – Lote A	30
3.2	Avaliação analítica da potência das vacinas adsorvidas contra Hepatite B	30
3.2.1	Circunstâncias gerais.....	30
3.2.2	Pré-tratamento das amostras.....	31
3.2.3	Diluição das amostras de vacina.....	32
3.2.4	Metodologia do Kit Murex HBsAg Version 3®.....	33
3.3	Leitura e avaliação estatística dos resultados	35
3.4	Critérios de aprovação do ensaio	36
3.5	Garantia da validade dos resultados	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Potência estimada das vacinas contra Hepatite B	38
4.2	Variância da potência entre os ensaios	38
4.3	Estabelecimento de gráfico de controle do lote de referência de trabalho e seus limites estatísticos	39
5	DISCUSSÃO	45

6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO A – Calendário Nacional de Vacinação da Criança.....	52
ANEXO B – Calendário Nacional de Vacinação do Adolescente.....	53
ANEXO C – Calendário Nacional de Vacinação do Adulto e Idoso.....	54
ANEXO D – Calendário Nacional de Vacinação da Gestante.....	55
ANEXO E – 1º Ensaio para Avaliação de potência de lote candidato à vacina de Referência de Trabalho – Analista 1.....	56
ANEXO F – 2º Ensaio para Avaliação de potência de lote candidato à vacina de Referência de Trabalho - Analista 2.....	57
ANEXO G – 3º Ensaio para Avaliação de potência de lote candidato à vacina de Referência de Trabalho - Analista 2.....	58
ANEXO H – 4º Ensaio para Avaliação de potência de lote candidato à vacina de Referência de Trabalho - Analista 2.....	59
ANEXO I – Combinação da potência estimada e de limites de confiança mínimo e máximo dos quatro ensaios.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hepatite B

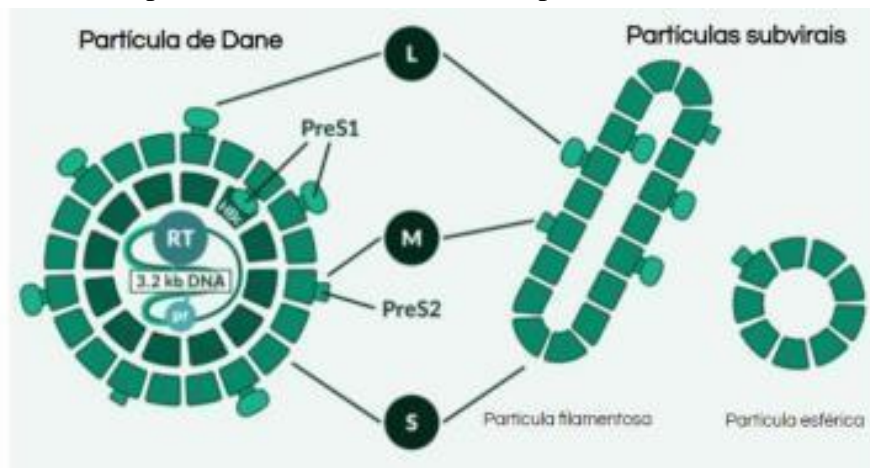
De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, cerca de 296 milhões de pessoas conviveram com a infecção crônica de Hepatite B (HB), culminando em 820 mil mortes nesse período. Estima-se que, a cada ano, em torno de 1,5 milhões de novas infecções surgem em todo o mundo. A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é uma das principais causas de doença hepática crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Nguyen *et al.*, 2020; Brasil, 2022; OMS, 2023a). No Brasil, a HB é uma doença de notificação obrigatória e passa por constante vigilância epidemiológica. Estima-se que cerca de 1 milhão de pessoas convivam com a doença no país e, destas, mais de 25% ainda não foram diagnosticadas (Brasil, 2018; Inmetro, 2023).

1.2 Agente etiológico e imunopatogenicidade

O VHB, também chamado de partícula de Dane, foi descoberto em 1960 em soro de aborígenes e por este motivo seu antígeno de superfície (HBsAg) foi nomeado antígeno Austrália. É um vírus hepatotrópico primário e oncogênico pertencente à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* e espécie *Hepatitis B virus* (Blumberg; Alter; Visnich, 1965; ICTV, 2024). No ambiente, o VHB sobrevive por pelo menos sete dias, sendo potencialmente infectante. Seu período de incubação varia de um a seis meses e pode ser detectado dentro de 30 a 60 dias após a infecção (OMS, 2023a).

No soro de indivíduos infectados podem coexistir partículas com potencial não infectivo e infectivo, as quais se apresentam no formato esférico ou filamentosas. As filamentosas e esféricas menores são não infecciosas. As filamentosas possuem cerca de 22 nanômetros (nm) de tamanho, com único envelope viral, já as esféricas menores, variam de 17 a 25 nm. As esféricas completas, chamadas de partículas de Dane, são infecciosas e possuem diâmetro de 42 nm (Brasil, 2018; Chuang; Tsai; Ou, 2022). As diferentes partículas estão representadas na Figura 1.

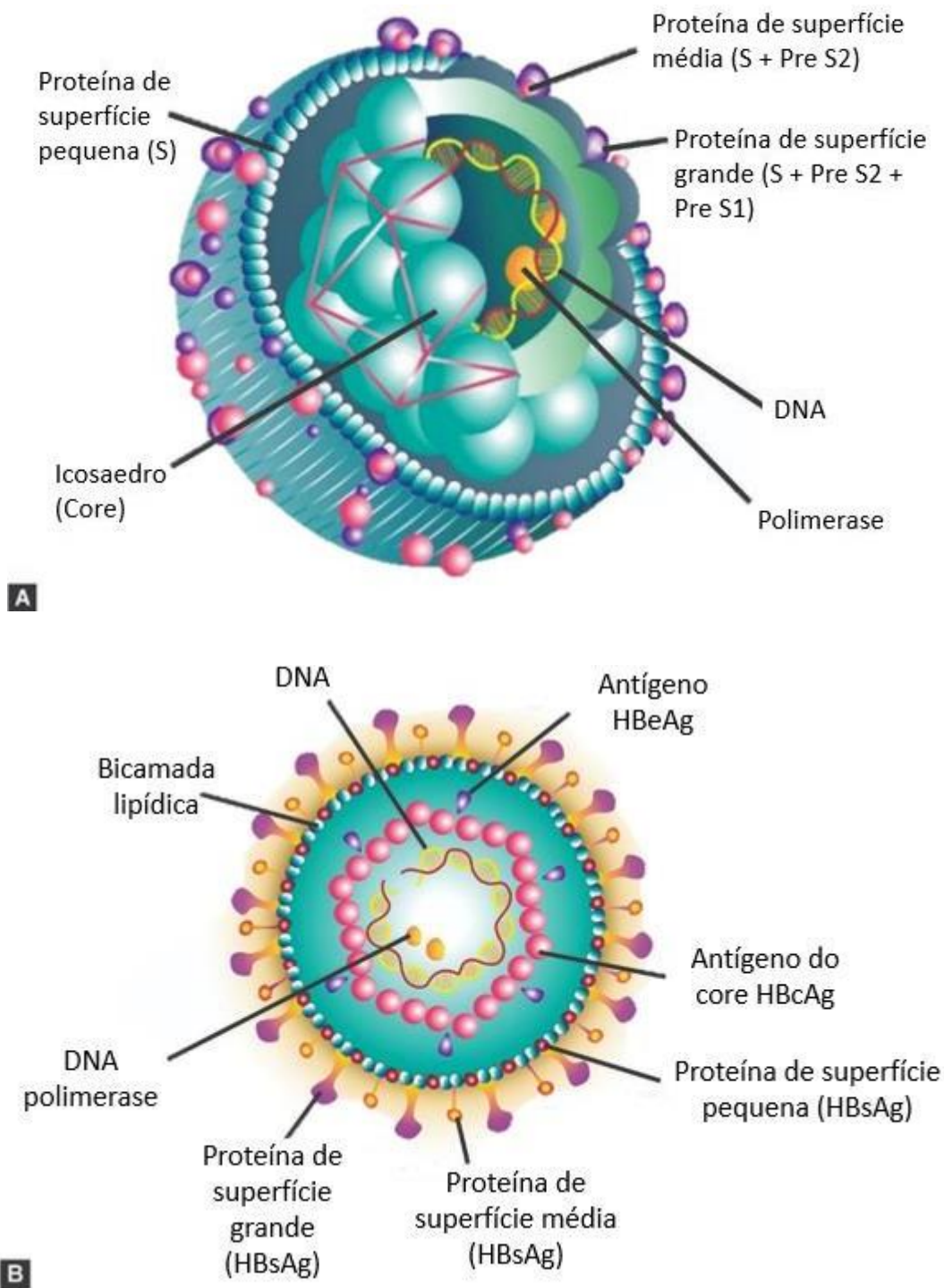
Figura 1 – Modelos de partículas virais do vírus da hepatite B (VHB) e subvirais não infecciosas



Legenda: L ou PreS1, M ou PreS2 e S representam as glicoproteínas de HBsAg: grande (L), médio (M) ou pequeno (S), respectivamente.
Fonte: Rita (2022).

O material genético do VHB é do tipo ácido desoxirribonucleico (DNA) parcialmente duplicado, com cerca de 3.200 pares de bases (3,2kb), que se encontra delimitado por uma estrutura icosaédrica formada pela união de múltiplas proteínas centrais, chamadas “proteínas do core” ou ainda de antígeno do core (HBcAg). O arranjo contendo o icosaedro e o material genético forma o nucleocapsídeo viral. Este é circundado por um envelope composto por fosfolípidos e três glicoproteínas de HBsAg que diferem entre si conforme o tamanho: grande (L), médio (M) ou pequeno (S) e que são chamadas de preS1, preS2 e S principal, respectivamente (Crowter *et al.*, 1994; Chuang; Tsai; Ou, 2022). As três proteínas em questão cumprem importante papel na infectividade e replicação viral, mediando a entrada do vírus nos hepatócitos (Le Seyek *et al.*, 1999). O HBeAg é uma proteína marcadora de replicação viral nos hepatócitos. Durante esse processo, são produzidas partículas não infecciosas constituídas apenas do antígeno HBsAg e, em menor quantidade, do antígeno e (HBeAg) (Roncato; Ballardin; Lunge, 2008; Liang, 2009). Nesse sentido, o vírus possui três antígenos principais: antígeno e (HBeAg), antígeno do core (HBcAg) e HBsAg, descritos pela primeira vez em 1970 (Dane *et al.*, 1970; Landers; Greenberg; Robinson, 1977). No interior do nucleocapsídeo viral, além do DNA, também se encontra a enzima DNA polimerase com atividade de transcriptase reversa (Brasil, 2018). A estrutura do VHB está representada na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura do vírus da Hepatite B (VHB)

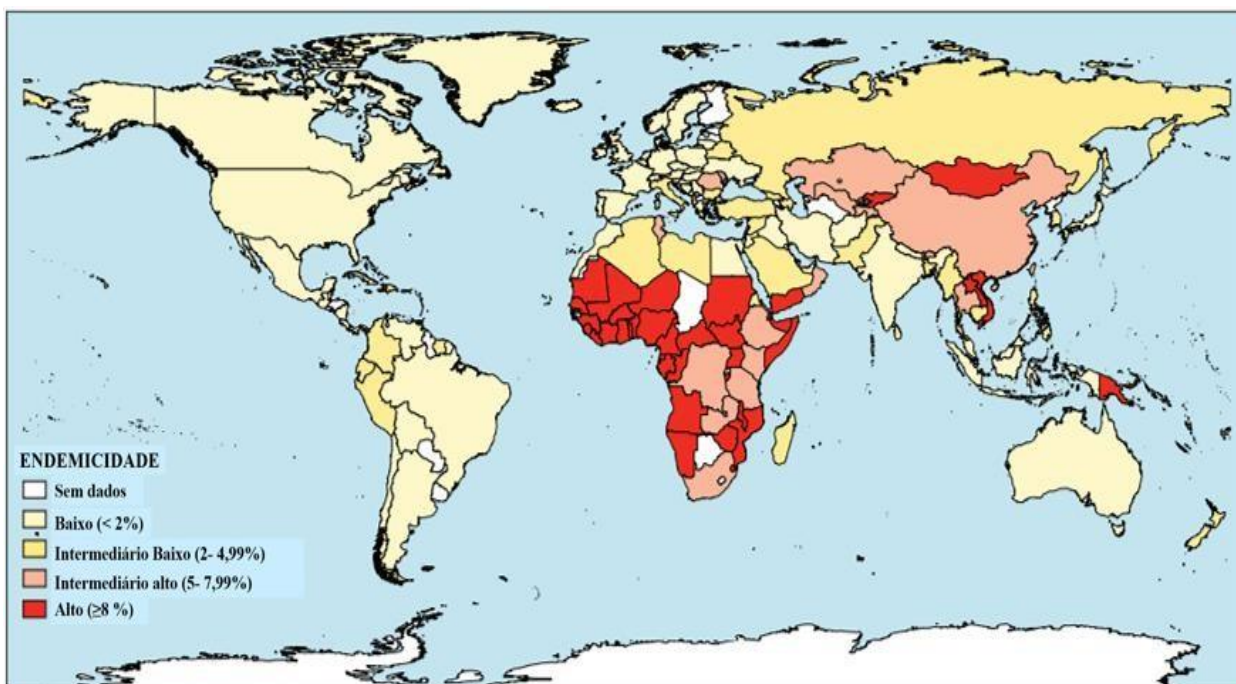


Legenda: A e B representam a estrutura geométrica e componentes da partícula de Dane.
 Fonte: Adaptado de Anand *et al.* (2022).

1.3 Epidemiologia

Schweitzer e colaboradores realizaram, em 2015, uma revisão sistemática que coletou dados de notificação de HB crônica de 161 países entre 1957 a outubro de 2013, estimando a prevalência mundial do HBsAg em 3,61%. É notória a grande disparidade no que tange a endemicidade entre diferentes regiões conforme observa-se na Figura 3. Ademais, as taxas mais elevadas concentram-se na África (8.83%) e em regiões do pacífico Ocidental (5.26%) (Schweitzer *et al.*, 2015).

Figura 3 – Endemicidade global para o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B(HBsAg) (1957-2013)



Fonte: Adaptado de Schweitzer *et al.* (2015).

Segundo dados recentes da OMS, as regiões do Pacífico Ocidental e Africana apresentam juntas 197 milhões de pessoas acometidas pela HB crônica, ao passo, que a região do Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e das Américas possuem, respectivamente, 18, 14 e 5 milhões de indivíduos cronicamente infectados (OMS, 2023a).

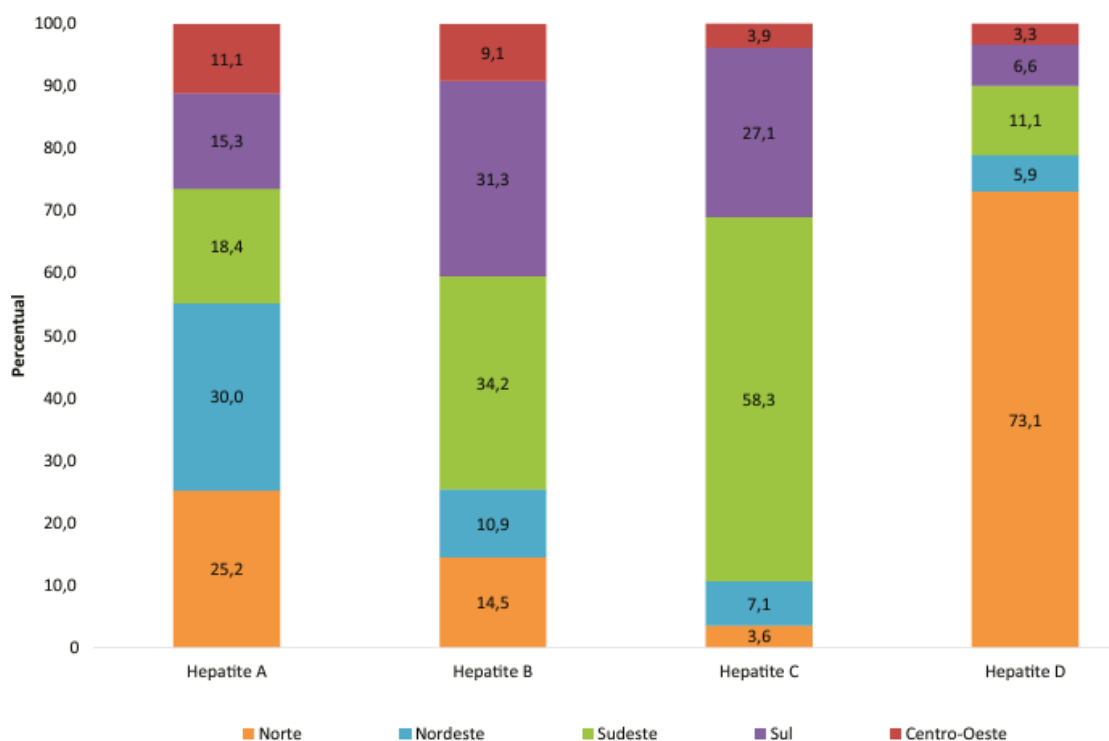
Em 2019, a proporção de crianças menores de cinco anos de idade cronicamente infectadas pelo VHB caiu para menos de 1%. Entre os anos de 1980 e o início dos anos 2000,

próximo ao surgimento da vacina, essa porcentagem era de 5%. Estima-se que 25% das crianças que adquirem o vírus nesta fase, apresentarão cirrose hepática ou câncer primário de fígado quando adultas (OMS, 2023a; Lavanchy, 2004). A vacinação infantil e proteção materna contra à HB é indispensável pois a infecção torna-se crônica em cerca de 90% dos casos adquiridos do período neonatal até os seis meses de vida. Dos seis meses aos cinco anos de idade, o risco de cronicidade é de 20 a 60%. Contudo, na fase adulta, essa taxa diminui para 5% (CDC, 2023; OMS, 2023a).

A presença do VHB no organismo é imprescindível para a replicação de outro vírus causador de danos hepáticos, o vírus da hepatite D (VHD), também chamada de Delta. Segundo a OMS, a Hepatite D (HD) afeta cerca de 5% das pessoas acometidas pela infecção crônica de HB. Além disso, a coinfeção é considerada a forma mais grave de hepatite viral crônica, sendo assim o desfecho clínico em morte é mais predominante nesses casos. Nesse contexto, a imunização contra HB previne a infecção pelo VHD (OMS, 2023b).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), de 2000 a 31 de dezembro de 2022, foram notificados 750.651 casos confirmados de hepatites virais no Brasil. Destes, a segunda maior parcela foi atribuída a HB que correspondeu a 276.646 (36,9%). Nesse período, a região com maior prevalência de HB foi Sudeste seguida da Sul, Norte, Nordeste e por fim Centro-Oeste. É fundamental atentar-se para os dados referente ao percentual de casos de HD, já que estes indiretamente representam a população infectada com o VHB. Com relação a esse grupo, foram notificados no mesmo período 4393 casos e a maior prevalência correspondeu à região Norte, conforme a Figura 4 (Inmetro, 2023).

Figura 4 – Percentual de casos de hepatites virais notificados segundo as regiões do Brasil (2000 a 31 de dezembro de 2022)



Fonte: SINAN/SVS/MS (2022).

1.4 Transmissão e sintomatologia

O perfil de transmissão da HB varia conforme a área. Em regiões endêmicas, isto é, aquelas em que a doença possui alta prevalência, é mais comum a transmissão vertical ou perinatal, ou seja, de mãe para filho durante o parto. Além desta, também é frequente a transmissão horizontal, na qual o indivíduo é exposto ao sangue infectado, primordialmente entre crianças de até os cinco anos de idade. Em pessoas não vacinadas, a transmissão sexual é prevalente. Isso se dá pelo contato direto com fluidos e secreções vaginais, menstruais, seminais, sem a utilização de preservativos (CDC, 2023; OMS, 2023a).

Além da transmissão horizontal, vertical e sexual, a infecção pelo VHB também pode ser adquirida por meio da utilização de agulhas, instrumentos médicos e odontológicos reutilizados e contaminados com sangue e saliva de indivíduos infectados. É possível também infecção através da utilização de sangue, hemoderivados ou em transplantes de órgãos positivos para HBsAg ou para DNA do vírus. Contudo, essas últimas formas de infecção são mais raras

atualmente devido aos protocolos de rastreabilidade de doadores (Trépo *et al.*, 2014; OMS, 2023a).

Normalmente durante as primeiras semanas após a infecção, ou seja, ao longo da fase aguda, a maioria dos indivíduos não apresentam sintomas. Naqueles que desenvolvem, algumas manifestações clínicas podem ser observadas: dor abdominal, náusea, escurecimento da coloração da urina (colúria), icterícia, cansaço persistente, mal-estar e vômitos frequentes. Mais raramente, falência hepática culminada em morte pode ocorrer (Nguyen *et al.*, 2020; OMS, 2023a). Contudo, a cura espontânea também pode ser um desdobramento possível (Brasil, 2018).

A HB crônica é definida pela persistência viral por mais de seis meses, a qual é evidenciada pela detecção do HBsAg ao longo desse período. Nesse quadro, complicações hepáticas como fibrose, carcinoma hepatocelular e cirrose podem ser percebidas primordialmente no período avançado da doença. Um aspecto particular da infecção viral crônica pelo VHB, que não ocorre com demais vírus causadores de hepatite, é a possibilidade de evolução para câncer hepático independentemente da ocorrência de cirrose. No entanto, é possível também que a HB crônica se apresente assintomática por muitos anos, prejudicando o diagnóstico e o tratamento precoce, e assim aumentando a morbimortalidade da doença (Brasil, 2018; Nguyen *et al.*, 2020; OMS, 2023a).

1.5 Diagnóstico e tratamento

Comumente o diagnóstico etiológico da HB é feito ao acaso por meio da realização de exames periódicos ou triagem de doadores de sangue. Quando há uma suspeita médica, a avaliação clínica é fundamental a fim de guiar o profissional de saúde na solicitação dos exames adequados, todavia a confirmação do diagnóstico da HB é basicamente laboratorial. Marcadores sorológicos como a pesquisa pelo HBsAg, Imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) anti-HBc, anticorpo contra HBsAg (anti-HBs) e HBeAg são utilizados para identificação da doença e da fase desta. Ademais, exames bioquímicos: dosagem de alanina aminotransferases (ALT), aspartato aminotransferase (AST) – que detectam dano no tecido hepático – de biologia molecular: reação em cadeia de polimerase (PCR) e carga viral; e imunoenaios como ELISA, podem ser utilizados para verificação de alterações metabólicas hepáticas, na confirmação da presença do vírus, bem como na evolução do tratamento. Exames de imagem como ultrassom e fibroscan auxiliam na

verificação do grau de fibrose hepática e monitoramento do avanço do dano hepático (Trépo *et al.*, 2014; Brasil, 2018; Jeng *et al.*, 2023; OMS, 2023a).

Durante o primeiro mês após a infecção, o DNA viral pode ser detectado por biologia molecular. Entre 10 e 15 semanas após a infecção, os níveis séricos de ALT e AST começam a se elevar (Brasil, 2018).

No que tange aos marcadores sorológicos, de maneira geral, todos devem ser avaliados conjuntamente para correta interpretação. A presença do Anti-HBc total indica contato prévio com o vírus, mas isoladamente não determina quando este contato ocorreu. O resultado positivo para HBsAg indica que o vírus está circulante no organismo, já a vacina induz apenas a produção do marcador anti-HBs. Por fim, o anti-HBc IgM presente indica infecção recente. Para confirmar a soroconversão e proteção do indivíduo após a vacinação devem ser quantificados títulos maiores de 10 mIU/ml de anti-HBs (Mcmadhon, 2009).

A Figura 5 abaixo evidencia a interpretação combinada dos resultados sorológicos possíveis para HB (Brasil, 2018).

Figura 5 – Interpretação dos resultados sorológicos para Hepatite B (HB)

Testes sorológicos	Resultado	Interpretação
HBsAg	Não reagente	Ausência de contato prévio com o HBV Susceptível à infecção pelo HBV
Anti-HBc IgM	Não reagente	
Anti-HBc total	Não reagente	
Anti-HBs	Não reagente	
HBsAg	Não reagente	Imune após infecção pelo HBV
Anti-HBc IgM	Não reagente	
Anti-HBc total	Reagente	
Anti-HBs	Reagente	
HBsAg	Não reagente	Imune após vacinação contra o HBV
Anti-HBc IgM	Não reagente	
Anti-HBc total	Não reagente	
Anti-HBs	Reagente	
HBsAg [†]	Reagente	Infecção recente pelo HBV (menos de seis meses)
Anti-HBc IgM	Reagente	
Anti-HBc total	Reagente/Não reagente	
Anti-HBs	Não reagente	
HBsAg [†]	Reagente	Infecção pelo HBV
Anti-HBc IgM	Não reagente	
Anti-HBc total	Reagente/Não reagente	
Anti-HBs	Não reagente	

Fonte: Brasil (2018).

O tratamento da HB varia conforme a fase da doença: aguda ou crônica. De maneira geral,

o tratamento do paciente portador de HB aguda é sintomatológico, de modo a prevenir vômitos, enjoo, diarreia e demais sintomas. Com relação ao paciente portador de HB crônica, alguns medicamentos estão disponíveis: entecavir e tenofovir. Estes objetivam diminuir a inflamação hepática e progressão da doença, ou seja, retardar ou reverter a cirrose e reduzir a chance de desenvolvimento de câncer. Contudo, para a grande maioria dos casos, o tratamento deve ser feito para o resto da vida. A OMS, em 2021, estimou que cerca de 12 a 25% dos indivíduos acometidos pela HB precisarão ser medicados, porém, segundo o mesmo órgão, em 2023, esta estimativa deverá aumentar (Trépo *et al.*, 2014; OMS, 2023a).

No caso de grávidas positivas para hepatite B, é fundamental o uso de medicamentos antivirais a fim de que o vírus não seja transmitido para o bebê. Estudos mostram que administração de terapia antiviral no terceiro trimestre gestacional podem prevenir falhas da imunoprofilaxia na transmissão vertical em grávidas com alta viremia (Pan; Lee, 2013). Em todos os casos, a rastreabilidade do vírus, objetivando o diagnóstico precoce, impacta totalmente a qualidade de vida do portador da doença por permitir o tratamento adequado no início, evitando complicações frequentes como cirrose e câncer (Brasil, 2018).

1.6 Prevenção

A vacina de HB é o principal mecanismo profilático contra a doença. Esta foi disponibilizada pela primeira vez em 1981 e sua recomendação mundial foi aprovada em 1992 (Wong *et al.*, 1984; OMS, 2010b; Trépo *et al.*, 2014). Ela foi produzida a partir da purificação de HBsAg presente no plasma de sujeitos portadores de infecção crônica. Em 1988 foi implementada uma nova tecnologia que possibilitou a produção de vacina por meio de técnicas de biologia molecular. Por meio da clonagem de um gene específico codificante do HBsAg, introduzido em células de levedura, o antígeno recombinante pode ser extraído e utilizado para produção vacinal. Nesse contexto, surgiu a vacina com tecnologia de DNA recombinante (Meireles; Marinho; Van Damme, 2015).

No Brasil, a recomendação do Ministério da Saúde para vacinação infantil universal iniciou em 1998. Já em 2001, a orientação foi estendida para até os 19 anos (SES-SP, 2006). A OMS indica que o recém-nascido seja vacinado com duas ou três doses de vacina contra HB. A primeira deve ser dada antes das primeiras 24 horas de vida, e as demais com intervalo de 4 semanas entre elas. Apesar dessas recomendações, dados de cobertura vacinal em todo o mundo disponibilizados

pela OMS/ *United Nations International Children's Emergency Fund* (UNICEF) demonstram, em 2022, uma cobertura vacinal global de apenas 45% dos neonatos com até 24 horas de vida. Entretanto, para o Brasil, essa taxa sobe para 82.33% nesse mesmo ano (OMS, 2022; OMS, 2023a).

As vacinas contra HB apresentam-se sobre as formas monovalentes e combinadas com hepatite A, pentavalentes: HB, difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenza* tipo B (HIB) ou hexavalentes em que, além das últimas, é adicionada proteção para poliomielite. Apresentam hidróxido de alumínio como adjuvante e podem conter ou não timerosal em sua composição. O adjuvante é utilizado para potencializar a resposta imunológica quando administrado no organismo (Farmacopeia, 2020; Instituto Butantan, 2022b). É importante salientar que de acordo com o produtor, são utilizadas diferentes espécies de leveduras para expressão do antígeno HBsAg, durante o processo produtivo da vacina (SES-SP, 2006).

Além da vacinação, a rastreabilidade de bolsas de sangue e hemoderivados, controle e profilaxia pós exposição em profissionais de saúde, campanhas de prevenção à acidentes com perfurocortantes são importantes mecanismos preventivos para infecção pelo VHB (OMS, 2010a; OMS, 2023a).

1.7 Vigilância Sanitária

De acordo com a Lei Orgânica da Saúde nº 8.080 de 1990, que criou o Sistema Único de Saúde (SUS), entende-se por Vigilância Sanitária (VS): “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”. Nesse contexto, o controle sanitário de todos os bens e serviços que possivelmente possam impactar a saúde da população é objeto de atuação da vigilância sanitária. Portanto, os imunobiológicos também são alvo deste processo (Brasil, 1990).

A VS atua de modo articulado e descentralizado conforme os princípios do SUS de descentralização e integralidade. Para isso, o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) foi criado por meio da Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999. O SNVS é executado pela administração pública direta e indireta dos entes federativos do Brasil (Brasil, 1999).

No que tange aos imunobiológicos, o Ministério da Saúde estabeleceu a Portaria Conjunta nº 92, de 9 de outubro de 2008, da Secretaria de Vigilância em Saúde, a qual articula a união entre

as esferas federais, estaduais e municipais a fim de tratar da farmacovigilância de vacinas. De acordo com o Art. 2º desta Portaria, a farmacovigilância de vacinas e outros imunobiológicos compreende-se como: “o processo de detecção, avaliação, compreensão, prevenção e comunicação de eventos adversos pós-imunização ou qualquer outro problema relacionado com a vacina ou vacinação” (Brasil, 2008a). Dessa maneira, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e as Secretarias Estaduais de Saúde (SES) se unem para regulamentar, controlar e fiscalizar a qualidade das vacinas no território brasileiro. Por meio da Resolução da Diretoria Colegiada -RDC nº 73/2008 a ANVISA delegou ao INCQS a tarefa de avaliar e emitir certificados relacionados à liberação de lotes de vacinas para consumo no país (Brasil, 2008b).

Um outro princípio do SUS é a universalização que significa estabelecer o acesso de todos à saúde. Nesse contexto, o Programa Nacional de Imunização (PNI) é protagonista a fim de tornar o acesso à vacinação universal, um objetivo possível. O PNI foi criado em 18 de setembro de 1973 e nasceu com a missão de organizar e coordenar as ações de vacinação no país. Desde então alcançou muitos êxitos e reconhecimento mundial, com apoio da UNICEF, do Rotary Internacional e do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), além de participar da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). É papel do PNI definir diretrizes e ações para imunização de toda a população brasileira independente de classe social, sendo assim estabelece o Calendário Nacional de Vacinação que, em parceria com SUS, disponibiliza atualmente 20 vacinas, dentre elas a vacina contra HB. Nesse contexto, o Brasil é um dos países que oferecem o maior número de imunobiológicos, de forma gratuita, a grupos alvo. Os calendários de vacinação disponibilizados pelo programa são divididos por faixas etárias e condições especiais: calendário da criança, do adolescente, do adulto e do idoso e de gestantes e estão reunidos nos anexos A, B, C e D. Além das vacinas, também são oferecidos soros e imunoglobulinas. O PNI realiza também a vigilância de eventos adversos às vacinas e estudos avaliativos do impacto das mesmas na morbimortalidade. O PNI estabelece que toda vacina tramitada por meio de seu sistema deva passar previamente por uma rigorosa análise de qualidade. Nesta circunstância, o INCQS/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) é essencial, pois é o órgão responsável pelo controle da qualidade das vacinas disponibilizadas pelo PNI, e conseqüentemente liberá-las ou não para uso pela população brasileira (Brasil, 1975; Brasil, 1990; Domingues; Teixeira, 2013; Júnior, 2013).

1.7.1 Controle de qualidade de vacinas HB

O controle da qualidade de lotes de vacinas HB é realizado por laboratórios do INCQS. São executadas análises documentais e testes laboratoriais que avaliam a eficácia – identidade e potência – e segurança – esterilidade e endotoxina bacteriana ou pirogênio. Este instituto possui um Sistema de Gestão da Qualidade implementado de acordo com a normas ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, a qual define requisitos gerais para atuação em laboratórios de ensaio, calibração e amostragem, objetivando garantir a competência do laboratório e a validade de seus resultados (ABNT, 2017). O Setor de Vacinas Virais II pertencente ao laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células (LVVBCC) localizado no Departamento de Imunologia (DI) do INCQS/Fiocruz, realiza os ensaios laboratoriais de potência e as análises documentais do Protocolo Resumido de Produção e Controle de Qualidade (PRPCQ). A metodologia empregada nos ensaios laboratoriais é definida pela Farmacopeia Brasileira e em documentos normativos da OMS. No que diz respeito ao ensaio de potência, é possível a realização de ensaios com animais ou ainda por meio de métodos *in vitro* validados que utilizem anticorpos monoclonais específicos para HBsAg (Farmacopeia, 2020).

Levando-se em consideração o alto custo do uso de animais, o sofrimento e estresse causados a eles e a propagação de ideias que buscam a minimização de seu uso em testes científicos, o Setor de Vacinas Virais II validou, no passado, o ensaio *in vitro* imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, que vem sendo utilizado nos procedimentos de verificação de potência de vacinas adsorvidas HB. Dentre as principais ideias contrárias ao uso de animais para fins científicos, tem-se o conceito dos “3Rs”. Este surgiu mediante a publicação do artigo “The Principles of Humane Experimental Technique” de W. M. S. Russell e R. L. Burch, há pouco mais de 60 anos. O nome “3Rs” provém do inglês para abreviação de *Replacement* (substituição), *Reduction* (redução) e *Refinement* (refinamento). A substituição visa a utilização de metodologias alternativas aos testes *in vivo* quando possível. A redução significa o uso do menor número possível de animais, caso não haja maneiras alternativas. Por fim, o refinamento correlaciona-se com a inovação científica por meio da minimização do sofrimento animal com o aprimoramento de formas de redução de dor ou ainda na busca por melhorias na eficiência do trabalho científico (Russel; Burch, 1959; Meyer, 2003; Challenger, 2020).

Um dos instrumentos críticos para o cumprimento das diretrizes de qualidade contidos na

RDC 512/2021 estabelecida pela ANVISA, que dispõe sobre as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade, na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 e na Farmacopeia Brasileira é o uso de controles internos durante a execução dos ensaios laboratoriais de controle de qualidade de imunobiológicos, de modo a garantir a qualidade e a validade dos resultados obtidos. Um desses controles internos é o uso de lote de referência para cada um dos produtores de vacina. Isso decorre do fato de que cada produtor utiliza um tipo de cepa de levedura específica (ABNT, 2017; Farmacopeia, 2020; Brasil, 2021). Nesse contexto, o ensaio de potência de vacinas HB é realizado por meio de um ELISA do tipo sanduíche para a quantificação do HBsAg. Em paralelo à vacina analisada, utiliza-se uma vacina de Referência de Trabalho, para cada produtor, conforme especificado pela Farmacopeia Brasileira. Algumas vacinas, como a HB do fabricante LG CHEM Ltd/Instituto Butantan apresentam hidróxido de alumínio como adjuvante em sua composição, o qual é um interferente na quantificação do HBsAg por meio do ELISA sanduíche. Nesse contexto, para realização da metodologia, é necessário que as amostras passem por um pré-tratamento antes da realização do ensaio, a fim de dissociar esse composto químico da amostra em análise. É importante salientar a metodologia utilizada para determinação da potência de vacinas adsorvidas contra HB é acreditada pela Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro (CGCRE), único organismo de acreditação reconhecido pelo Governo Brasileiro para acreditar Organismos de Avaliação da Conformidade (Inmetro, 2023).

1.8 Justificativa

A vacinação é o principal instrumento profilático contra a HB. O ensaio de potência é um mecanismo de controle de qualidade da vacina, e para realizá-lo é necessário que a cada ensaio, seja utilizada em paralelo, uma vacina de referência, do mesmo produtor, previamente estabelecida. O lote de referência funciona como um controle interno do ensaio e deve satisfazer os critérios de aprovação, que incluem a reprodutibilidade e repetibilidade. O estabelecimento deste lote é renovado conforme termina-se a validade do último lote de referência. Sendo assim, este trabalho é fundamental para continuação das análises de controle de qualidade das vacinas de HB do produtor LG CHEM/ Instituto Butantan, que posteriormente serão disponibilizadas para imunização da população brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer um lote controle de referência de trabalho interno para o produtor LG CHEM/ Instituto Butantan de vacina adsorvida de Hepatite B, a ser utilizado nos ensaios de avaliação de potência de vacina deste mesmo produtor.

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar um lote de vacina como possível candidata à referência de trabalho;
- b) Realizar ensaios para avaliação da potência do lote da vacina candidata;
- c) Determinar o coeficiente de variação da potência entre os ensaios;
- d) Elaborar gráfico de controle para análise de tendências a partir dos valores de absorvância obtidos nos ensaios, utilizando o *software* SPC Explorer RT® v. 05.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostras de lote candidato à referência de trabalho – Lote A

As amostras utilizadas correspondem à vacina adsorvida HB (recombinante) fabricadas pela empresa LG CHEM Ltd, e importadas, distribuídas e registradas pelo Instituto Butantan. Apresentam-se como suspensão injetável, cuja via de administração é intramuscular. Cada frasco contém 10 ml de solução que correspondem a 10 doses de 1 ml para adultos, contendo 20 microgramas (μg) de HBsAg. É constituída de partículas não infecciosas de HBsAg purificadas, produzida com a tecnologia deDNA recombinante em células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), adsorvidas em sais de alumínio como adjuvante e com timerosal como conservante. Quanto a conservação, deve ser armazenada em geladeira, de 2° a 8° Celsius (°C), sem congelar (Instituto Butantan, 2022a).

Para a eleição do lote candidato à vacina de referência de trabalho, foram selecionados os lotes com maior número de frascos entregues ao INCQS, e em seguida, analisados os resultados de potência apresentados pelo produtor no Protocolo Resumido de Produção e Controle de Qualidade (PRPCQ), selecionando, assim, o lote candidato à Vacina de Referência de Trabalho (INCQS, 2023).

O lote candidato foi denominado “Lote A”. Foram entregues ao laboratório 12 frascos dessa vacina, que se encontram dentro do prazo de validade de 27 de abril de 2025.

3.2 Avaliação analítica da potência das vacinas adsorvidas contra Hepatite B

A análise da potência de vacinas *in vitro* é um critério que objetiva avaliar a antigenicidade por meio da quantificação de HBsAg presente na amostra. Foi utilizado como base para realização do ensaio, o Procedimento Operacional Padrão (POP) n.º 65.3430.033 revisão 12 (INCQS, 2023), estabelecido e aprovado pelo INCQS/Fiocruz.

3.2.1 Circunstâncias gerais

As seguintes conjunturas são possíveis para eleição de um novo lote de referência:

- a) Quando se tem um lote de referência anterior que acabará a validade em breve.
- b) Quando não se tem um lote de referência anterior. Nesse caso os motivos podem ser: será o primeiro lote a ser eleito para um produtor específico ou não há mais frascos de referência anterior disponíveis para realização dos ensaios de potência das amostras que chegam ao INCQS.

Na presença de um lote de referência estabelecido previamente, o ensaio é realizado com amostra deste, paralelo a uma outra amostra candidato à referência. Na ausência de um lote de referência estabelecido previamente, pelos motivos supracitados no item b, o ensaio é realizado com o candidato à referência paralelo à ele mesmo, no entanto, uma destas amostras será considerada referência-padrão para o ensaio e, neste caso, a potência de referência-padrão para o ensaio será o valor determinado no PPRCQ pelo produtor.

No presente trabalho, não haviam amostras de lote de referência anterior, portanto cada ensaio foi realizado com a mesma amostra, chamada de lote A paralela a si mesma. O valor de referência-padrão de potência determinado no PPRCQ foi de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Foram realizados quatro ensaios de potência com o lote A, por dois analistas distintos e em dias diferentes. Os resultados foram avaliados de acordo com critérios estatísticos de aceitação por meio da verificação de desvios de linearidade e paralelismo. O lote candidato só pode ser utilizado caso os valores de potência observados se mantiverem dentro dos limites de aceitação e se na variação da potência entre os ensaios o coeficiente de variação (CV) for menor que 32%. Para aceitação dos kits, os valores de absorbâncias correspondentes aos controles positivo e negativo devem estar dentro das especificações de sua bula (Diasorin, [S.d.]).

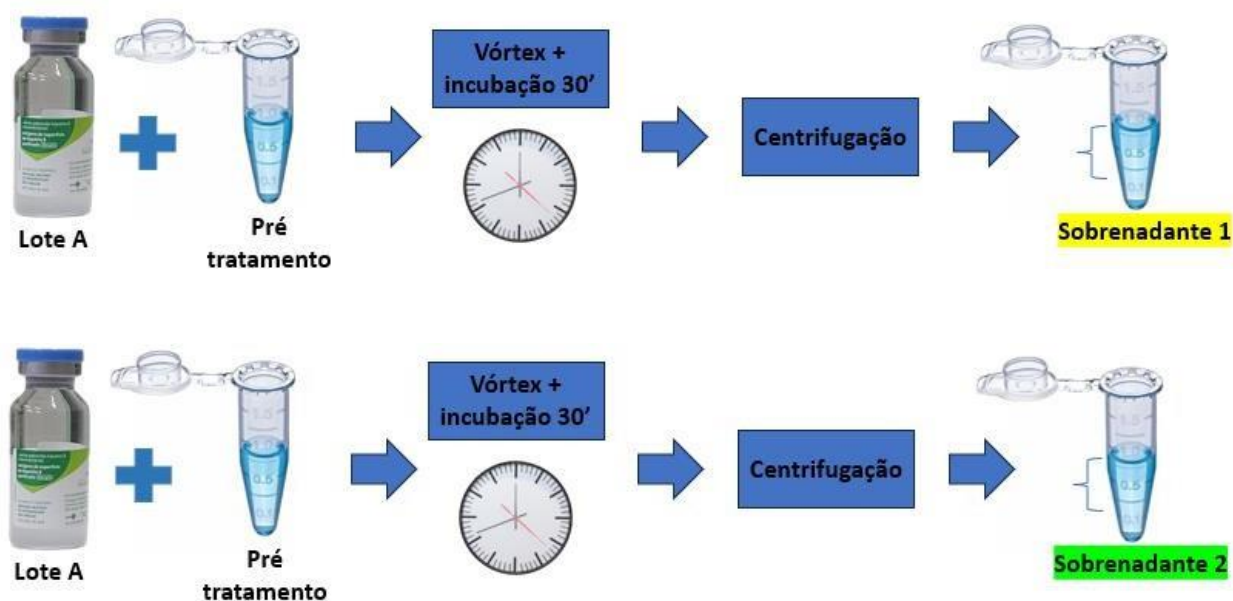
3.2.2 Pré-tratamento das amostras

Como a vacina contra HB do produtor LG CHEM Ltd/Instituto Butantan contém hidróxido de alumínio como adjuvante em sua composição, faz-se necessário que as amostras passem por um pré-tratamento antes da realização do ensaio, a fim de dissociar esse composto químico da amostra em análise. A solução de pré-tratamento é composta por dietanolamina (DEA) a 2,5%, Triton X 100 a 0,2% e tampão fosfato-salino (PBS) (INCQS, 2023).

O processo iniciou-se com a adição de 300 microlitros (μL) da solução de pré-tratamento a

300 μ L da vacina não diluída (diluição de 1:2), para cada amostra em paralelo. Em seguida homogeneizou-se a mistura em vórtex e incubou-se em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, centrifugou-se por 60 segundos a 15.000 rotações por minuto (rpm), a fim de precipitar o hidróxido de alumínio dissociado, conforme ilustrado na Figura 6. Por fim, utilizou-se os sobrenadantes para etapa seguinte correspondente as diluições da vacina (INCQS, 2023).

Figura 6 – Pré-tratamento das amostras em paralelo



Fonte: A autora (2024).

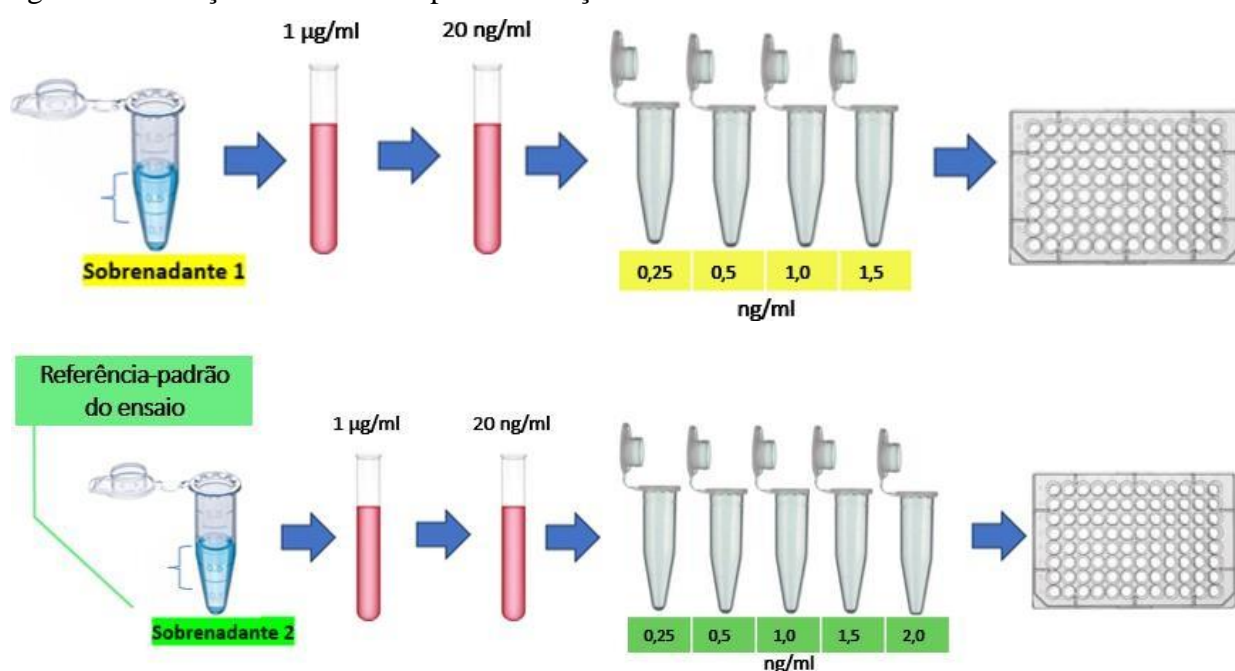
3.2.3 Diluição das amostras de vacina

A partir dos sobrenadantes realizou-se uma pré-diluição com PBS acrescido de 0,2% de albumina sérica bovina (BSA) para obter uma solução de aproximadamente 1 μ g/ml. Considerou-se a concentração descrita no frasco, de 20 μ g/mL, diluindo-se 100 μ L do sobrenadante de vacina em 900 μ L de PBS/BSA. Em outro tubo foram adicionados 20 μ L da solução de 1 μ g/mL e 980 μ L diluente da amostra (PBS/ BSA 0,2%) para obter uma concentração de 20 ng/mL de cada vacina (INCQS, 2023).

Para diluição das amostras de vacina, considerou-se, aleatoriamente, o sobrenadante 2 como referência-padrão do ensaio. A partir da concentração de 20 ng/mL, o sobrenadante 2 foi diluído para as concentrações de 0,25 ng/mL; 0,50 ng/mL; 1,0 ng/mL; 1,5 ng/mL e 2,0 ng/mL em triplicatas

e o sobrenadante 1 nas concentrações de 0,25 ng/mL; 0,50 ng/mL; 1,0 ng/mL e 1,5 ng/mL, em triplicatas, conforme ilustrado na Figura 7. Os sobrenadantes da vacina e suas diluições foram homogeneizadas com uso de vórtex, antes de sua utilização ao longo do processo (INCQS, 2023).

Figura 7 – Diluição das amostras para realização do ELISA



Fonte: A autora (2024).

Posteriormente, as diluições foram distribuídas na placa de 96 poços contida no Kit Murex HBsAg Version 3[®], conforme descrito no item 3.2.3 a seguir.

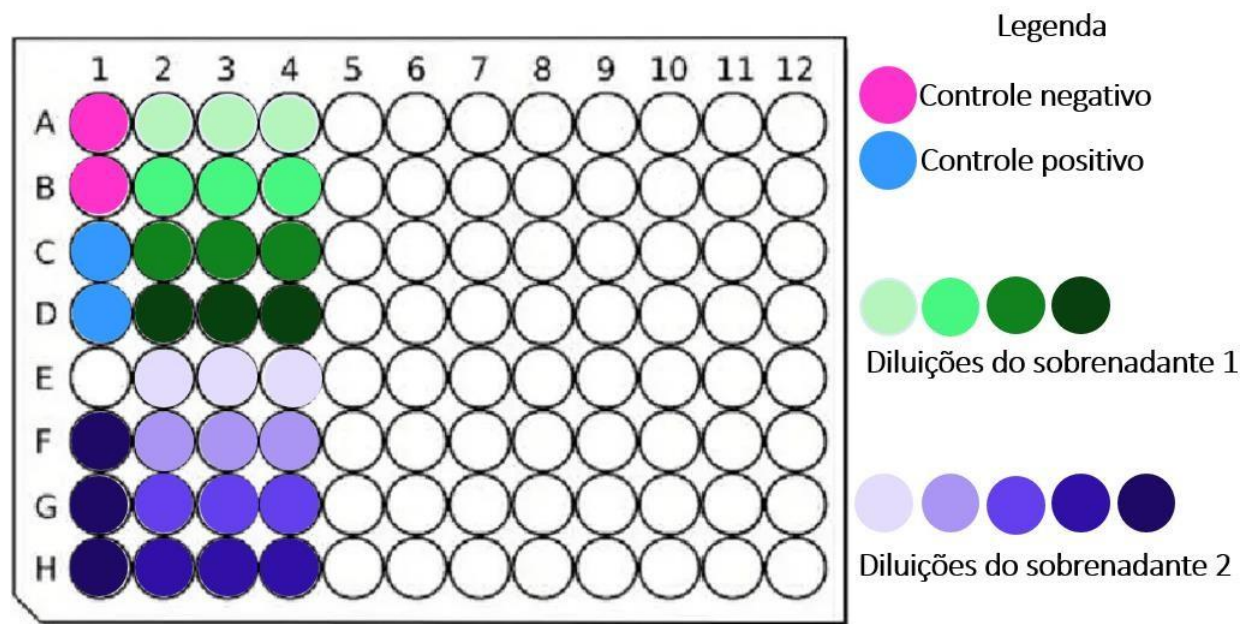
3.2.4 Metodologia do Kit Murex HBsAg Version 3[®]

A avaliação analítica da potência é realizada pelo do ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche. Para isso, utiliza-se o Kit Murex HBsAg Version 3[®] do fabricante DiaSorin. Este kit contém: a) solução de controle positivo; b) solução de controle negativo; c) microplacas com 96 poços sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para epítomos HbsAg; d) solução de conjugado, com anticorpos de cabra marcados com peroxidase de rábano (HRP) contra o HBsAg; e) solução de lavagem; f) solução de substrato, com 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio. Além do Kit, para realização do ELISA são necessários: solução de parada de reação (Ácido Sulfúrico 2 M) e os equipamentos calibrados e/ou qualificados: agitador de

microplacas, estufa à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, espectrofotômetro e micropipetas (Diasorin, [S.d.]).

Após a diluição, foram distribuídos 100 μL das triplicatas das vacinas diluídas e dos controles positivo e negativo nos poços da microplaca, conforme o esquema da Figura 8 a seguir.

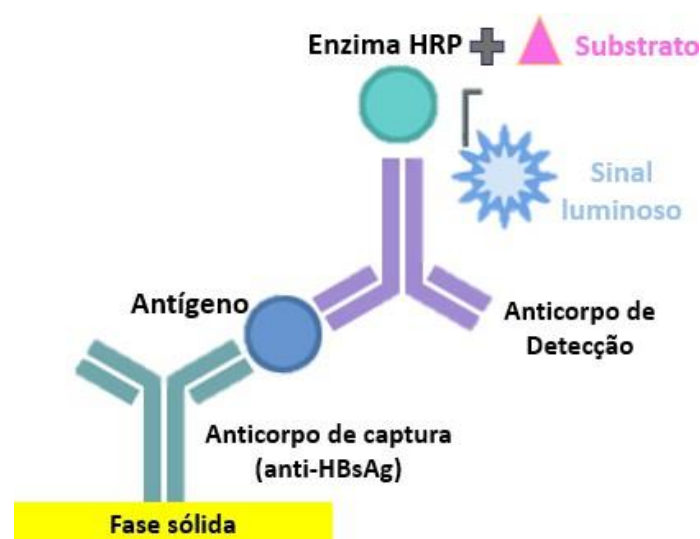
Figura 8 – Distribuição das triplicatas das diluições e dos controles positivo e negativo na microplaca



Fonte: A autora (2024).

Em seguida, a microplaca foi incubada a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante uma hora, para que ocorresse a ligação entre o antígeno HBsAg presente na vacina e os anticorpos monoclonais específicos para os diferentes epítomos do HBsAg que revestem os poços. Foram adicionados 50 μL do conjugado, contendo anticorpos de cabra marcados com a enzima HRP contra o HBsAg, e incubados novamente à mesma temperatura durante 30 minutos. Os poços foram lavados com solução de lavagem, removendo os antígenos e anticorpos que não se ligaram. Em seguida, foi adicionado 50 μL do substrato, que ao ligar-se ao conjugado, catalisou a reação e por consequência, alterando a cor para púrpura nos poços reativos. Após a incubação, adicionou-se a solução de parada de reação (Ácido sulfúrico 2M) e a placa foi lida em espectrofotômetro (BioTek, ELX 800, Estados Unidos) com absorvância de 450nm. A Figura 9 representa a formação do complexo que leva a produção do sinal luminoso.

Figura 9 - Representação do ELISA sanduíche



Legenda: Os anticorpos monoclonais presentes nos poços das microplacas se ligarão ao antígeno (HBsAg) presente na vacina. Com adição de conjugado (anticorpo de detecção) marcado com a enzima peroxidase de rábano (HRP), será formado um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo. Posteriormente, na adição do substrato, um sinal de detecção (sinal luminoso) será produzido através de reação enzimática.

Fonte: A autora (2024).

3.3 Leitura e avaliação estatística dos resultados

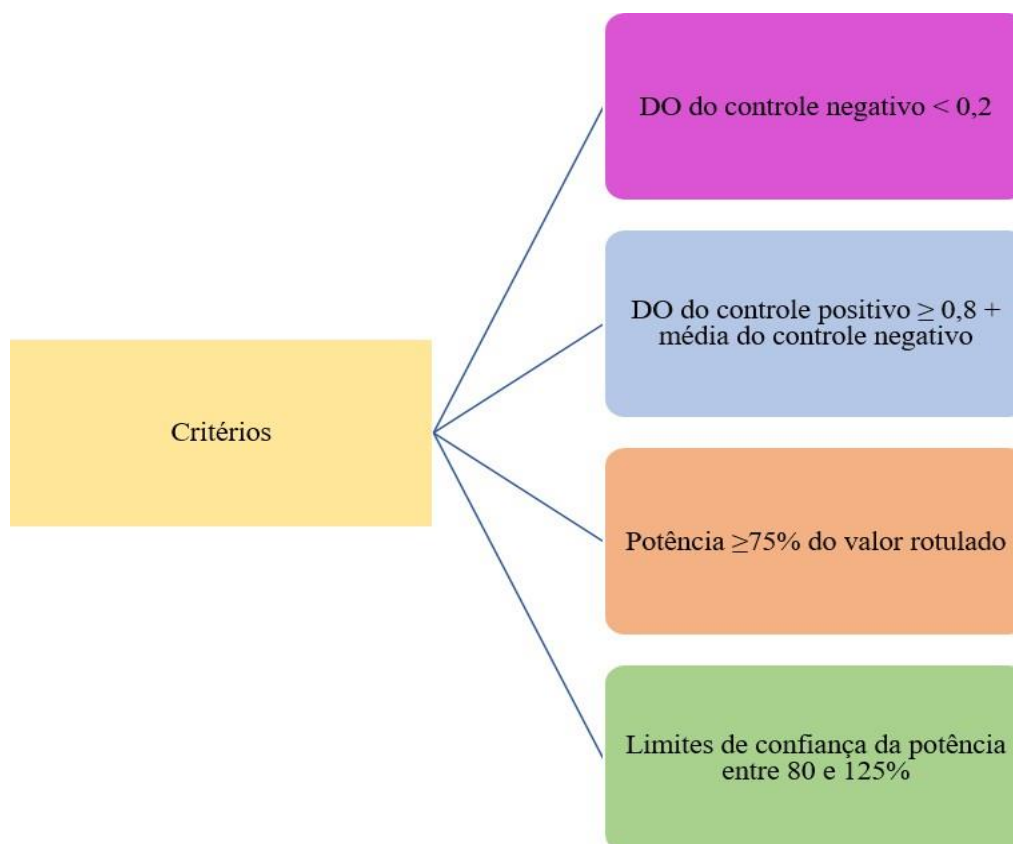
Os resultados de absorvância da leitura fotométrica das diferentes diluições das vacinas do lote A foram avaliados por meio de *software* estatístico CombiStats® v.7.0 (EDQM, Council of Europe) conforme o Procedimento de uso (PU) n.º 3400.012 rev 04 (INCQS, 2022a). Para isto foi utilizado a estatística de “linhas paralelas”, verificando-se desvios de linearidade e paralelismo, calculando, assim, a potência estimada da vacina. Na avaliação de desvios de paralelismo e ou linearidade nas curvas dose resposta, deve-se buscar o melhor ajuste. Caso observado ausência de paralelismo e linearidade entre as curvas, pode-se remover até duas diluições da vacina de referência-padrão correspondente ao sobrenadante 2 (0,25 e/ou 2,0 ng/mL) e uma da vacina referente ao sobrenadante 1 (0,25 ou 1,5 ng/mL), e/ou retirar um resultado de uma das triplicatas de cada diluição.

Os valores de absorvância de cada diluição foram incluídos em um gráfico controle para análise de tendências, utilizando o software SPC Explorer RT® v. 05 (Quality America, Texas, EUA) para estabelecer os limites máximo e mínimo aceitos para cada diluição (INCQS, 2023).

3.4 Critérios de aprovação do ensaio

Para que os testes sejam aceitos, o valor da leitura de densidade óptica (DO) do controle negativo deve ser inferior a 0,2 e o valor da DO do controle positivo deve ser 0,8 superior à média do controle negativo. Quando os resultados não atingirem estes critérios, o ensaio deve ser repetido. Além disso, a potência estimada da amostra da vacina será considerada conforme quando o valor encontrado no ensaio for maior ou igual a 75% do valor rotulado no frasco da vacina. Ademais, os limites de confiança da potência estimada devem estar entre 80 e 125% para o ensaio ser aprovado. Os critérios de aceitação dos resultados estão resumidos na Figura 10 abaixo (INCQS, 2023).

Figura 10 - Resumo dos critérios de aprovação do ensaio



Fonte: A autora (2024).

3.5 Garantia da validade dos resultados

Além de manter os equipamentos e instrumentos utilizados no ensaio corretamente monitorados, calibrados, verificados, e com a manutenção periódica, o lote da vacina de referência de trabalho estabelecido é acompanhado por intermédio do lançamento dos resultados de absorvância em gráfico de controle de valores individuais utilizando o software SPC Explorer RT®

v. 04, conforme PU 3400.011 (INCQS, 2022b) para garantir a qualidade e validade dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1 Potência estimada das vacinas contra Hepatite B

A Tabela 1 a seguir evidencia os resultados de potência estimada calculados para cada um dos quatro ensaios, com seu respectivo analista e limites de confiança.

Tabela 1 – Resultados dos quatro ensaios com seus respectivos analistas, datas de realização, potências estimadas do lote A (candidato à vacina de referência de trabalho) e limites de confiança mínimo e máximo

Ensaio	Data	Analista	Limite mínimo	Potência Estimada	Limite máximo
1	21/06/2023	1	96,3%	18,95µg/mL	103,8%
2	22/06/2023	2	93,4%	17,45µg/mL	106,9%
3	26/06/2023	2	91,9%	17,13µg/mL	108,5%
4	27/06/2023	2	92,2%	18,76µg/mL	108,2%

Fonte: A autora (2024).

Os anexos E, F, G e H apresentam os resultados gerados por meio do software estatístico CombiStats® v.7.0 (EDQM, Council of Europe) referente aos quatro ensaios realizados para eleição do novo lote de referência de trabalho.

A partir das potências estimadas de cada um dos ensaios, foram calculadas as médias de potência e de limites de confiança mínimo e máximo. Os resultados foram de potência de 18,15 µg de HBsAg por mililitro de vacina e os limites de confiança mínimo e máximo foram de 95,1% e 105,1%, respectivamente. O Anexo I apresenta esses resultados, os quais também foram gerados por meio do *software* estatístico CombiStats® v.7.0 (EDQM, Council of Europe).

4.2 Variância da potência entre os ensaios

A Tabela 2 a seguir evidencia os resultados do cálculo de variação da potência entre os ensaios através do coeficiente de variância.

Tabela 2 – Resultados de média, desvio padrão e coeficiente de variação provenientes do cálculo de variação da potência entre os quatro ensaios do lote A (candidato à vacina de referência de trabalho)

Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variância	Critério de Aceitação
18,0725	0,9162	5%	32%

Fonte: A autora (2024).

4.3 Estabelecimento de gráfico de controle do lote de referência de trabalho e seus limites estatísticos

Os resultados de absorvância de cada diluição da vacina de referência foram plotados em um gráfico de análise de tendências no programa SPC Explorer RT® v. 05. Dessa forma, estabeleceu-se a média e os limites máximo e mínimo aceitos para cada diluição utilizada no ensaio de avaliação da potência da vacina contra HB, que estão representados na Tabela 3. Nesse contexto foram criados quatro gráficos para cada uma das diluições de 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5ng/mL, conforme apresentado nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

Tabela 3 – Limites máximos e mínimos e médias dos gráficos de controle para as diluições de 0,25ng/mL; 0,50ng/mL; 1,00ng/mL e 1,50ng/mL

Diluição	Média	Limite mínimo	Limite máximo
0,25	524,3	344,2	704,4
0,50	856,0	690,6	1021,4
1,00	1578,2	1047,9	2108,5
1,50	2301,2	1664,5	2937,9

Fonte: A autora (2024).

Figura 11- Gráfico de controle para diluição de 0,25 ng/mL do lote A

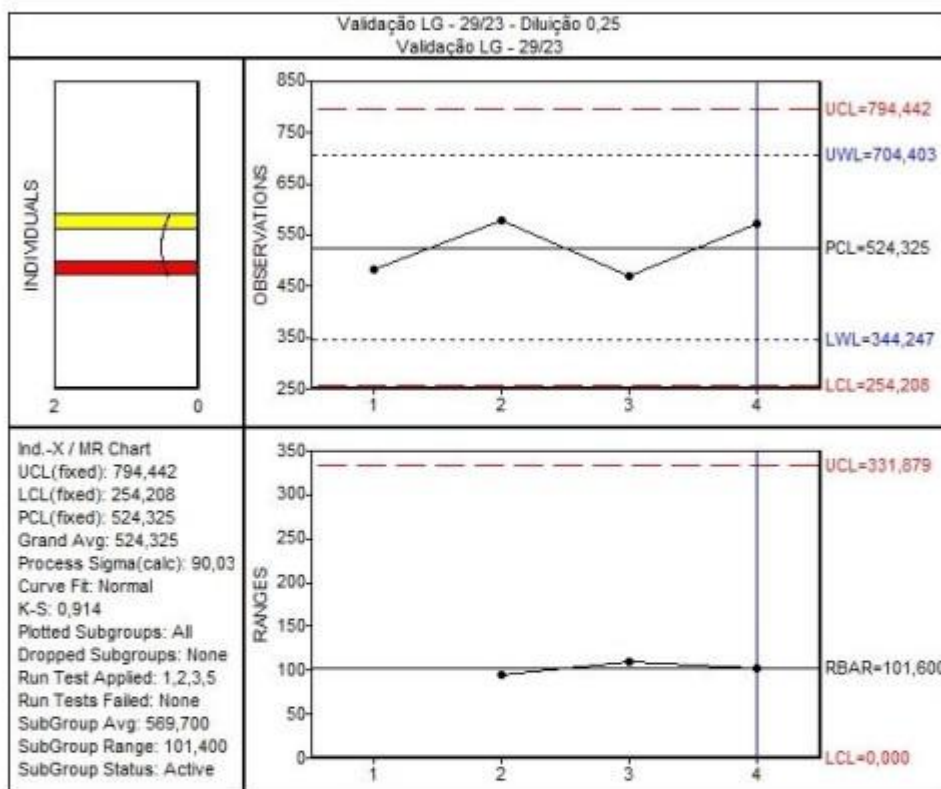


ANÁLISE DE TENDÊNCIAS/GRÁFICOS DE CONTROLE

Processo Validação LG - 29/23 .



Processo: Validação LG - 29/23	Característica: Diluição 0,25	Descrição:
Especificação superior:	Especificação inferior:	Valor alvo:



Grand Average: 524,325	Cpk:	Cp:	Cpm:
Process Sigma: 90,039	Ppk:	Pp:	Ppm:
Sample Sigma: 56,975	Skewness: -0,038	Kurtosis: -5,621	K-S: 0,914
Population Sigma: 49,342	Max Val: 577,000	Min Val: 468,300	Sum: 2097,300
Median:	Standard Error: 28,487	Sigma Level:	
Subgroups Out of Control:	Subgroups Failing Run Tests:		
Subgroups Dropped from Chart:	Subgroups Dropped from Statistics:		

Nº de ensaio	Data do ensaio	Diluição 0,25	Observação
1	21/06/2023	482,300	Ensaio frente à amostra 29/23
2	22/06/2023	577,000	Ensaio frente à amostra 29/23
3	26/06/2023	468,300	Ensaio frente à amostra 29/23
4	27/06/2023	569,700	Ensaio frente à amostra 29/23

Figura 12- Gráfico de controle para diluição de 0,5 ng/mL do lote A

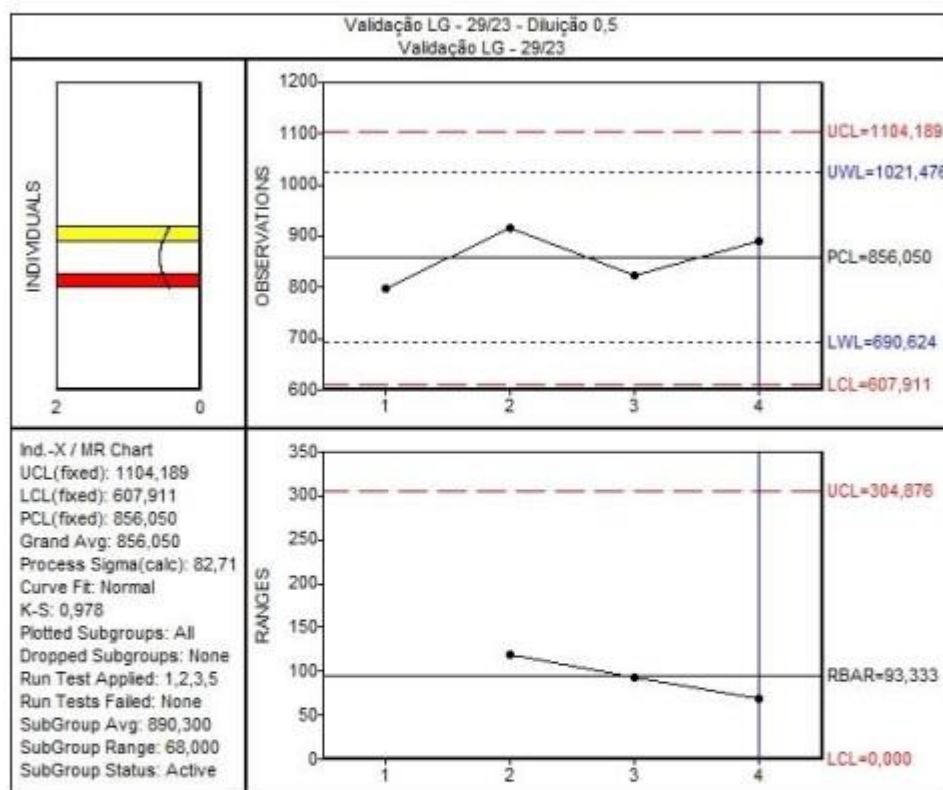


ANÁLISE DE TENDÊNCIAS/GRÁFICOS DE CONTROLE

Processo Validação LG - 29/23 .



Processo: Validação LG - 29/23	Característica: Diluição 0,5	Descrição:
Especificação superior:	Especificação inferior:	Valor alvo:



Grand Average: 856,050	Cpk:	Cp:	Cpm:
Process Sigma: 82,713	Ppk:	Pp:	Ppm:
Sample Sigma: 55,955	Skewness: -0,014	Kurtosis: -4,066	K-S: 0,978
Population Sigma: 48,458	Max Val: 915,300	Min Val: 796,300	Sum: 3424,200
Median:	Standard Error: 27,977	Sigma Level:	
Subgroups Out of Control:		Subgroups Failing Run Tests:	
Subgroups Dropped from Chart:		Subgroups Dropped from Statistics:	

Nº de ensaio	Data do ensaio	Diluição 0,5	Observação
1	21/06/2023	796,300	Ensaio frente à amostra 29/23
2	22/06/2023	915,300	Ensaio frente à amostra 29/23
3	26/06/2023	822,300	Ensaio frente à amostra 29/23
4	27/06/2023	890,300	Ensaio frente à amostra 29/23

Figura 13- Gráfico de controle para diluição de 1,0 ng/mL do lote A

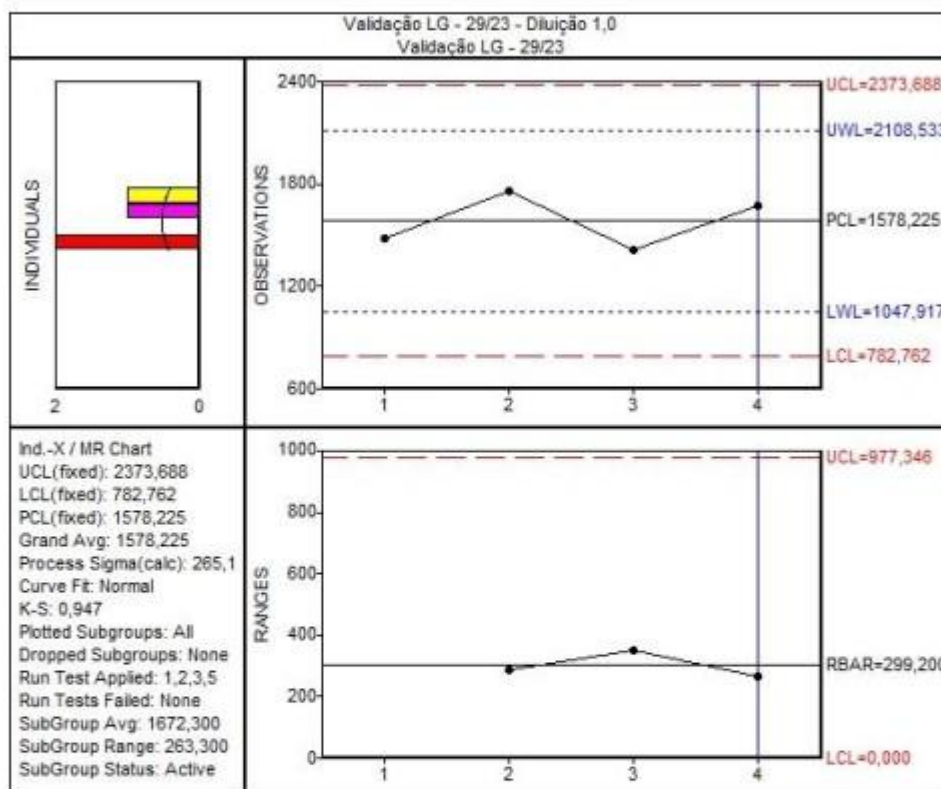


ANÁLISE DE TENDÊNCIAS/GRÁFICOS DE CONTROLE

Processo Validação LG - 29/23 .



Processo: Validação LG - 29/23	Característica: Diluição 1,0	Descrição:
Especificação superior:	Especificação inferior:	Valor alvo:



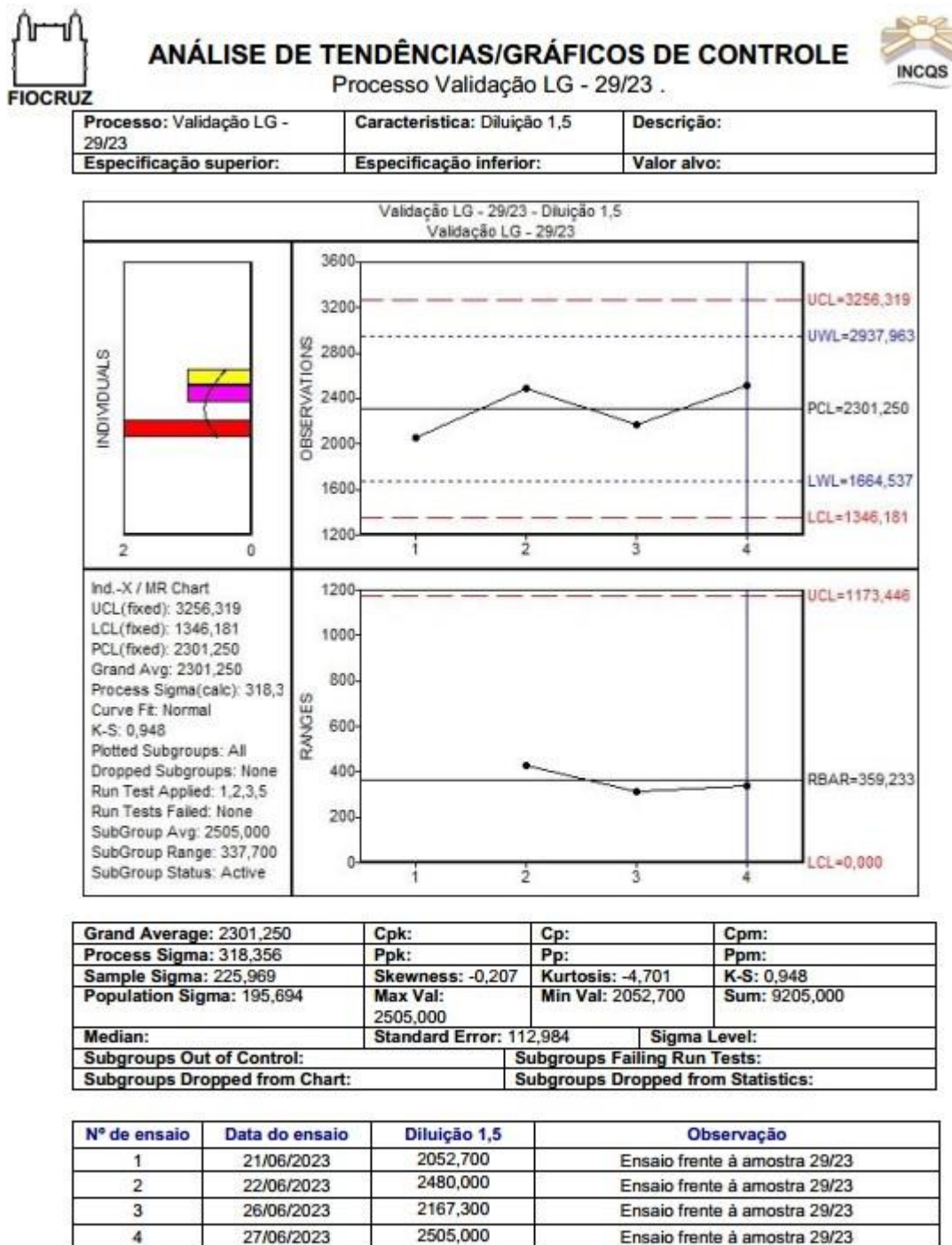
Grand Average: 1578,225	Cpk:	Cp:	Cpm:
Process Sigma: 265,154	Ppk:	Pp:	Ppm:
Sample Sigma: 164,239	Skewness: 0,101	Kurtosis: -4,012	K-S: 0,947
Population Sigma: 142,235	Max Val: 1758,300	Min Val: 1409,000	Sum: 6312,900
Median:	Standard Error: 82,120	Sigma Level:	
Subgroups Out of Control:	Subgroups Failing Run Tests:		
Subgroups Dropped from Chart:	Subgroups Dropped from Statistics:		

Nº de ensaio	Data do ensaio	Diluição 1,0	Observação
1	21/06/2023	1473,300	Ensaio frente à amostra 29/23
2	22/06/2023	1758,300	Ensaio frente à amostra 29/23
3	26/06/2023	1409,000	Ensaio frente à amostra 29/23
4	27/06/2023	1672,300	Ensaio frente à amostra 29/23

POP 65.3400.002 – Anexo C – fl. 1/ 1 - Rev. 04
Classificação: 542

Fonte: A autora (2024).

Figura 14- Gráfico de controle para diluição de 1,50 ng/mL do lote A



A partir dos gráficos de controle produzidos, serão inseridos, ao longo do tempo, os valores de absorvância das futuras leituras de cada diluição do lote de referência, os quais deverão se manter dentro dos limites máximo e mínimo. Dessa forma, será realizado o acompanhamento do lote de referência de trabalho estabelecido.

5 DISCUSSÃO

As vacinas são importantes instrumentos profiláticos contra o desenvolvimento de doenças. Quando inoculadas no indivíduo, induzem imunidade específica ativa. Podem ser constituídas por microrganismos inativados, microrganismos atenuados, substâncias por eles produzidas ou frações antigênicas (Farmacopeia, 2020). Tendo em vista a importância dos imunobiológicos para a saúde coletiva, é de suma relevância realizar o controle de qualidade dos imunobiológicos. O ensaio de potência é um mecanismo de controle de qualidade da vacina que avalia sua eficácia.

É preconizado o uso de controles internos durante a execução dos ensaios laboratoriais de controle de qualidade de imunobiológicos, de modo a garantir a qualidade e a validade dos resultados obtidos (ABNT, 2017; Farmacopeia, 2020; Brasil, 2021). Um desses controles internos é o uso de lote de referência para cada um dos produtores de vacina. Nesse contexto, faz-se necessário que a cada ensaio de avaliação de potência, a amostra seja analisada frente a uma vacina de referência, de mesmo produtor, previamente estabelecida. O estabelecimento é renovado conforme termina-se a validade do último lote de referência. Para que um lote candidato seja designado como lote de referência, é indispensável que esse satisfaça critérios de aprovação que incluem análises estatísticas, em consonância com as determinações da OMS (2010c).

Os ensaios foram realizados utilizando o kit Murex HBsAg Version 3® do fabricante DiaSorin. Incluem-se como critérios de aprovação do ensaio, os valores de densidade óptica (DO) do controle negativo e positivo do kit. Os resultados de DO dos controles negativos se mantiveram inferiores a 0,2 e dos controles positivos obtiveram valores de absorvância 0,8 superiores à média dos controles negativos, validando, portanto, o kit (INCQS, 2023).

Os resultados de absorvância da leitura fotométrica foram incluídos em uma planilha de cálculo já validada no software estatístico CombiStats® v.7.0 (EDQM, Council of Europe). Para avaliação dos resultados, foi utilizado a estatística de “linhas paralelas”, verificando-se desvios de linearidade e paralelismo, calculando, assim, uma potência estimada da vacina. Não foram observados desvios de linearidade e paralelismo. Além disso, as potências foram superiores a 75 % do valor rotulado (20 µg de HBsAg/mL) e se mantiveram dentro dos limites de confiança máximo (125%) e mínimo (80 %) determinados. Os resultados de todas as diluições se mantiveram dentro dos limites definidos pelos gráficos de controle, em conformidade com o POP 65.3430.033 (INCQS,2023).

Para avaliação da reprodutibilidade, faz-se necessário que dois analistas distintos participem da determinação do lote de referência, realizando ensaios distintos. A variância entre os valores de potência encontrados foi de 5%, sendo o limite para aprovação de no máximo 32%. Logo, também obteve-se êxito para esse critério.

6 CONCLUSÃO

Pode-se inferir, portanto, que a vacina do lote A apresentou resultados satisfatórios, de modo que obteve potência estimada maior ou igual a 75% do valor rotulado no frasco da vacina (20 μg de HBsAg/mL), sem apresentar desvios de linearidade e paralelismo.

A variância dos resultados de potência entre os quatro ensaios foi menor de 32%; as absorvâncias de cada diluição lidas no espectrofotômetro calibrado e qualificado, se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pelo gráfico de controle de análise de tendências.

Logo, o lote A atendeu aos requisitos necessários para se tornar o novo lote de vacina de referência de trabalho para o produtor específico. Nesse contexto, o presente estudo estabeleceu uma vacina de referência para o produtor LG CHEM/ Instituto Butantan, dessa forma torna-se possível a continuação das análises de controle de qualidade das vacinas de hepatite B deste fabricante, que posteriormente serão disponibilizadas para imunização da população brasileira.

REFERÊNCIAS

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ANAND, P. *et al.* Hepatitis B Infections in Neonates. **Newborn**, India, v. 1, n. 4, p.368-375, 2022.

BLUMBERG, B. S; ALTER, J. H; VISNICH, S. A “new” antigen in leukemia sera. **Jama**, United States, v. 191, n. 7, p. 541-546, feb. 1965.

BRASIL. Lei nº 6259, de 30 de outubro de 1975. 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. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 14433, 31 out. 1975. PL 1017/1975.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 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 União**: seção 1, Brasília, DF, p. 18055, 20 set. 1990. PL 3110/1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 1, 27 jan. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria Conjunta nº 92, de 9 de outubro de 2008**. Dispõe sobre o estabelecimento de mecanismo de articulação entre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a Secretaria de Vigilância em Saúde e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz sobre Farmacovigilância de Vacinas e outros Imunobiológicos no âmbito do Sistema Único de Saúde e define suas competências Brasília, 2008a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada. RDC nº 73, de 21 de outubro de 2008. **Diário oficial da União**: edição 205, seção 1, Brasília, DF, p. 64, 22 out. 2008b. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/28262>. Acesso em: 24 set. 2023.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada. RDC nº 512, de 27 de maio de 2021. **Diário oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 146, 31 maio. 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/na/web/dou/-/45eporto-f-rdc-n-512-de-27-de-maio-de-2021-322975673>. Acesso em: 28 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais 2022**. Brasília, DF: MS, 2022. p. 80.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico de**

Hepatites Virais 2023. Brasília, DF: MS, 2023. p. 81.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais.** Brasília, DF: MS, 2018. p 121.

INMETRO. **Acreditação.** Brasília, DF, 21 de agosto de 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/assuntos/acreditacao/cgcre/acreditacao>. Acesso em: 17 jan. 2024.

CDC. **Hepatitis B.** United States, 9 mar. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/index.htm>. Acesso em: 27 nov. 2023.

CHALLENGER, M. Reassessing the Three Rs? **The Hastings Center report**, United States, v. 50, n.3, p. 75-76, may 2020.

CHUANG, Y. C; TSAI, K. N; OU, J. J. Pathogenicity and virulence of Hepatitis B virus. **Virulence**, United States, v. 13, n.1, p. 258-296, dec. 2022.

CROWTHER, R. A. *et al.* Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. **Cell**, England, v. 77, n.6, p.943-950, jun. 1994.

DANE, D. S; CAMERON, C. H; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated Hepatitis. **The Lancet**, United States, v. 295, p. 695-698, 1970.

DIASORIN. **Kit Murex HBsAg version 3®**: bula de kit diagnóstico. Inglaterra, [S.d.].

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

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2020. 2 v.

ICTV. **The Master Species List**: a spreadsheet of current taxonomy. 2024. Disponível em: <https://ictv.global/msl>. Acesso em: 19 fev. 2024.

INSTITUTO BUTANTAN. **Bula vacina adsorvida hepatite B (recombinante).** São Paulo: Instituto Butantan, 2022a.

INSTITUTO BUTANTAN. **Hidróxido de alumínio contido na CoronaVac é usado em outras vacinas e inofensivo para crianças e adolescentes.** São Paulo: Instituto Butantan, 21 de janeiro 2022b. Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/hidroxido-de-aluminio-contido-na-coronavac-e-usado-em-outras-vacinas-e-inofensivo-para-criancas-e-adolescentes#:~:text=Essas%20subst%C3%A2ncias%2C%20comumente%20usadas%20em,de%20toxicidade%20nem%20causa%20magnetismo>. Acesso em: 06 jan. 2024.

INCQS (Brasil). **POP 65.3430.033**: avaliação da potência da vacina adsorvida hepatite B (Recombinante). Rev. 12. Rio de Janeiro: INCQS, 2023. 44 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS (Brasil). **PU 3400.012**: tutorial do Software de análises estatísticas de resultados de ensaios - combistats. Rev. 04. Rio de Janeiro: INCQS, 2022a. 47 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS (Brasil). **PU 3400.011**: software SPC-PC IV Explorer. Rev. 03. Rio de Janeiro: INCQS, 2022b. 20 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

JENG, W. J; PAPTAEODORIDIS, G. V; LOK, A. S. F. Hepatitis B. **The Lancet**, United States, v. 401, p 1039-1052, 2023.

JÚNIOR, J. B. S. 40 anos do Programa Nacional de Imunizações: uma conquista da Saúde Pública Brasileira. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 22, n. 1, p. 7-8, 2013.

LANDERS, T. A; GREENBERG, H. B; ROBINSON, W. S. Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. **J Virol, United States**, v.23, n.2, p.368-376, 1977.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **Journal of Viral Hepat.**, v. 11, n. 2, p. 97-107, 2004.

LE SEYEC, J. *et al.* Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. **J Virol, France**, v. 73, n. 3, p. 2052-2057, mar. 1999.

LIANG T. J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology**, v. 49, p.1-17, may 2009.

MCMADHON, B. J. *et al.* Antibody levels and protection after hepatitis B vaccine: results of a 22-year follow-up study and response to a booster dose. **J Infect Dis**, United States, v. 200, n.9, p. 1390-1396, 2009.

MEIRELES, L. C; MARINHO, R.T.; VAN DAMME, P. Three decades of hepatitis B control with vaccination. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 18, p. 2127, 2015.

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

NGUYEN, M. H. *et al.* Hepatitis B Virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy. **Clin Microbiol**, United States, v.33, p.1-38, 2020.

OMS. **Report of the Safe injection Global Network (SIGN) meeting**. Geneva, 2010, 2010a.

OMS. WORLD HEALTH ASSEMBLY, 63., Geneva,17 de maio de 2010b.

OMS. **Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant**

Hepatitis B Vaccines. Geneva, 2010c.

OMS. **Hepatitis B vaccination coverage**, julho de 2022. Disponível em: https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/HEPB.html?CODE=Global&ANTIGEN=HEPB_BD&YEAR=. Acesso em: 28 nov. 2023.

OMS. **Hepatitis B.** 2023a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Acesso em: 25 jul. 2023.

OMS. **Hepatitis D.** 2023b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d>. Acesso em: 20 fev. 2023.

PAN, C. Q; LEE, H. M. Antiviral therapy for chronic hepatitis B in pregnancy. **Semin Liver Dis**, United States, v. 33, p. 138-146, may 2013.

RONCATO, M; BALLARDIN, P. A. Z; LUNGE, V. R. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. **Rev HCPA**, v. 28, n. 3, p. 188-93, 2008.

RITA S. J. D. **Farmacoterapia da Hepatite B.** 2022. 59 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade de Lisboa, Portugal, 2022.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. I. **The Principles of Humane Experimental Technique.** [S.n.]: Methuen, London, 1959.

SCHWEITZER, A. *et al.* Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. **The Lancet**, United States, v.386, p 1546-1555, out. 2015.

SES-SP. Vacina contra hepatite B. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, vol 40, p. 1137-1140, 2006.

TRÉPO, C; CHAN, H. L; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, United States, v. 384, p. 2053-2063, dec.2014.

WONG, V. C. *et al.* Prevention of the HBsAg carrier state in newborn infants of mothers who are chronic carriers of HBsAg and HBeAg by administration of hepatitis-B vaccine and hepatitis-B immunoglobulin. Double-blind randomised placebo-controlled study. **The Lancet**, United States, v. 8383, p. 921-926, 28 abr.1984.

ANEXO A – CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO DA CRIANÇA

Calendário Nacional de Vacinação da Criança							
VACINA	PROTEÇÃO CONTRA	COMPOSIÇÃO	NÚMERO DE DOSES		IDADE RECOMENDADA	INTERVALO ENTRE AS DOSES	
			ESQUEMA BÁSICO	REFORÇO		RECOMENDADO	MÍNIMO
BCG	Formas graves de tuberculose (meníngea e miliar)	Bactéria viva atenuada	Dose única	-	Ao nascer	-	-
Hepatite B (HB - recombinante)	Hepatite B	Antígeno recombinante de superfície do vírus purificado	Dose ao nascer	-	Ao nascer	-	-
Poliomielite 1, 2 e 3 (VIP - inativada)	Poliomielite	Vírus inativado	3 doses	2 reforços com a vacina VOP	1ª dose: 2 meses 2ª dose: 4 meses 3ª dose: 6 meses	60 dias	30 dias
Poliomielite 1 e 3 (VOPb - atenuada)	Poliomielite	Vírus vivo atenuado	-	2 doses de reforço	15 meses e 4 anos	-	1º reforço: 6 meses após 3ª dose da VIP 2º reforço: 6 meses após 1º reforço
Rotavírus humano G1P[8] (ROTA)	Diarreia por Rotavírus	Vírus vivo atenuado	2 doses	-	1ª dose: 2 meses 2ª dose: 4 meses	60 dias	30 dias
(DTP/ HB/Hib) (Penta)	Difteria, Tétano, Coqueluche, <i>Haemophilus influenzae</i> B e Hepatite B	Toxoides diftérico e tetânico purificados + bactéria da coqueluche inativada e purificada + Oligossacarídeos conjugados do Hib + antígeno de superfície de HB.	3 doses	2 reforços com a vacina DTP	1ª dose: 2 meses 2ª dose: 4 meses 3ª dose: 6 meses	60 dias	30 dias
Pneumocócica 10 - valente (VPC 10 - conjugada)	Pneumonias, Meningites, Otites, Sinusites pelos sorotipos que compõem a vacina	Polissacarídeo capsular de 10 sorotipos de pneumococos	2 doses	Reforço	1ª dose: 2 meses 2ª dose: 4 meses Reforço: 12 meses	60 dias	30 dias entre a 1ª dose e 2ª dose 60 dias entre a 2ª dose e o reforço
Meningocócica C (conjugada)	Meningite meningocócica tipo C	Polissacarídeos capsulares purificados da <i>Neisseria meningitidis</i> do sorogrupo C	2 doses	Reforço	1ª dose: 3 meses 2ª dose: 5 meses Reforço: 12 meses	60 dias	30 dias entre a 1ª dose e 2ª dose 60 dias entre a 2ª dose e o reforço
Febre Amarela (VFA - atenuada)	Febre Amarela	Vírus vivo atenuado	Uma dose	Reforço	Dose: 9 meses Reforço: 4 anos de idade	-	30 dias
Sarampo, caxumba, rubéola (SCR - atenuada) (tríplice viral)	Sarampo, Caxumba e Rubéola	Vírus vivo atenuado	2 doses	-	12 meses	-	30 dias
Sarampo, caxumba, rubéola e varicela (SCRV - atenuada) (Tetraviral)	Sarampo, Caxumba, Rubéola e Varicela	Vírus vivo atenuado	Uma dose (2ª dose da tríplice viral e 1ª de varicela)	-	15 meses	-	-
Hepatite A (HA - inativada)	Hepatite A	Vírus inativado	Uma dose	-	15 meses	-	-
Difteria, Tétano e Pertussis (DTP)	Difteria, Tétano e Coqueluche	Toxoides diftérico e tetânico purificados + bactéria da coqueluche (célula inteira) inativada e purificada	3 doses (Considerar doses anteriores)	2 reforços	1º reforço: 15 meses 2º reforço: 4 anos de idade	1º reforço: 9 meses após 3ª dose 2º reforço: 3 anos após 1º reforço	1º reforço: 6 meses após 3ª dose 2º reforço: 6 meses após 1º reforço
Difteria e Tétano (dT)	Difteria e Tétano	Toxoides diftérico e tetânico purificados	3 doses (Considerar doses anteriores com penta e DTP)	A cada 10 anos. Em caso de ferimentos graves, deve-se reduzir este intervalo para 5 anos	A partir dos 7 anos	60 dias	30 dias
Papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (HPV4 - recombinante)	Papilomavírus Humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante)	Papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (HPV4 - recombinante)	2 doses	-	09 a 10 anos (Para meninas e meninos)	2ª dose: 6 meses após 1ª dose	2ª dose: 6 meses após 1ª dose
Pneumocócica 23-valente (VPP 23 - polissacarídica)	Meningites bacterianas, Pneumonias, Sinusite e outros.	Polissacarídeo capsular de 23 sorotipos de pneumococos	2 doses	Uma dose a depender da situação vacinal anterior com a PCV 10	A partir de 5 anos para os povos indígenas. A 2ª dose deve ser feita 5 anos após a 1ª dose	5 anos	3 anos
Varicela (VZ - atenuada)	Varicela (Catapora)	Vírus vivo atenuado	Uma dose (Corresponde a 2ª dose da varicela)	-	4 anos	-	30 dias

Fonte: <https://www.gov.br/saude/pt-br/vacinacao/calendario>.

ANEXO B – CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO DO ADOLESCENTE

Calendário Nacional de Vacinação do Adolescente							
VACINA	PROTEÇÃO CONTRA	COMPOSIÇÃO	NÚMERO DE DOSES		IDADE RECOMENDADA	INTERVALO ENTRE AS DOSES	
			ESQUEMA BÁSICO	REFORÇO		RECOMENDADO	MÍNIMO
Hepatite B (HB - recombinante)	Hepatite B	Antígeno recombinante de superfície do vírus purificado	Iniciar ou completar 3 doses, de acordo com situação vacinal	-	-	2ª dose: 1 mês após 1ª dose. 3ª dose: 6 meses após 1ª dose.	2ª dose: 1 mês após 1ª dose. 3ª dose: 4 meses após 1ª dose.
Difteria e Tétano (dT)	Difteria e Tétano	Toxoides diftérico e tetânico purificados	Iniciar ou completar 3 doses, de acordo com situação vacinal	A cada 10 anos. Em caso de ferimentos graves, deve-se reduzir este intervalo para 5 anos	-	60 dias	30 dias
Febre Amarela (VFA - atenuada)	Febre Amarela	Vírus vivo atenuado	Dose única	Reforço, caso a pessoa tenha recebido uma dose da vacina antes de completar 5 anos de idade	-	-	-
Sarampo, caxumba, rubéola (SCR - atenuada) (Triplice viral)	Sarampo, Caxumba e Rubéola	Vírus vivo atenuado	Iniciar ou completar 2 doses, de acordo com situação vacinal	-	-	-	30 dias
Papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (HPV4 - recombinante)	Papilomavírus Humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante)	Papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (HPV4 - recombinante)	Iniciar ou completar 2 doses, de acordo com situação vacinal	-	11 a 14 anos (Para meninas e meninos)	2ª dose: 6 meses após 1ª dose	2ª dose: 6 meses após 1ª dose
Pneumocócica 23-valente (VPP 23 - (polissacarídica)	Meningites bacterianas, Pneumonias, Sinusite e outros.	Polissacarídeo capsular de 23 sorotipos de pneumococos	Uma dose	Uma dose a depender da situação vacinal anterior com a PCV 10	A partir de 5 anos para os povos indígenas. A 2ª dose deve ser feita 5 anos após a 1ª dose	5 anos	3 anos
Meningocócica ACWY (MenACWY- conjugada)	Meningite meningocócica sorogrupos A, C, W e Y	Polissacarídeos capsulares purificados da <i>Neisseria meningitidis</i> dos sorogrupos A, C, W e Y	Uma dose	-	11 a 14 anos	-	-

Fonte: <https://www.gov.br/saude/pt-br/vacinacao/calendario>.

ANEXO C – CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO DO ADULTO E IDOSO

Calendário Nacional de Vacinação do Adulto e Idoso							
VACINA	PROTEÇÃO CONTRA	COMPOSIÇÃO	NÚMERO DE DOSES		IDADE RECOMENDADA	INTERVALO ENTRE AS DOSES	
			ESQUEMA BÁSICO	REFORÇO		RECOMENDAÇÃO	MÍNIMO
Hepatite B (HB - recombinante)	Hepatite B	Antígeno recombinante de superfície do vírus purificado	Iniciar ou completar 3 doses, de acordo com histórico vacinal	-	-	2ª dose: 1 mês após 1ª dose. 3ª dose: 6 meses após 1ª dose.	2ª dose: 1 mês após 1ª dose. 3ª dose: 4 meses após 1ª dose.
Difteria e Tétano (dT)	Difteria e Tétano	Toxoides diftérico e tetânico purificados	Iniciar ou completar 3 doses, de acordo com histórico vacinal	A cada 10 anos. Em caso de ferimentos graves, deve-se reduzir este intervalo para 5 anos.	-	60 dias	30 dias
Febre Amarela (VFA - atenuada)	Febre Amarela	Vírus vivo atenuado	Dose única	Reforço, caso a pessoa tenha recebido uma dose da vacina antes de completar 5 anos de idade	-	-	-
Sarampo, caxumba, rubéola (SCR - atenuada) (Triplíce viral)	Sarampo, Caxumba e Rubéola	Vírus vivo atenuado	2 doses (20 a 29 anos) Uma dose (30 a 59 anos) (verificar situação vacinal anterior)	-	-	-	30 dias (Se duas doses)
Difteria, Tétano, Pertussis (dTpa - acelular)**	Difteria, Tétano e Coqueluche	Toxoides diftérico (teor reduzido) + tetânico + pertussis (acelular) purificados	Uma dose	Uma dose a cada 10 anos	A partir dos 18 anos	10 anos	5 anos em caso de ferimentos graves

** A Vacina dTpa adulto está recomendada para profissionais da saúde e parteiras tradicionais.

Fonte: <https://www.gov.br/saude/pt-br/vacinacao/calendario>.

ANEXO D – CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO DA GESTANTE

Calendário Nacional de Vacinação da Gestante							
VACINA	PROTEÇÃO CONTRA	COMPOSIÇÃO	NÚMERO DE DOSES		IDADE RECOMENDADA	INTERVALO ENTRE AS DOSES	
			ESQUEMA BÁSICO	REFORÇO		RECOMENDADO	MÍNIMO
Hepatite B (HB - recombinante)	Hepatite B	Antígeno recombinante de superfície do vírus purificado	Iniciar ou completar 3 doses, de acordo com histórico vacinal	-	-	2ª dose: 1 mês após 1ª dose. 3ª dose: 6 meses após 1ª dose.	2ª dose: 1 mês após 1ª dose. 3ª dose: 4 meses após 1ª dose.
Difteria e Tétano (dT)	Difteria e Tétano	Toxoides diftérico e tetânico purificados	Iniciar ou completar 3 doses, de acordo com histórico vacinal	A cada 10 anos. Ferimentos graves, deve-se reduzir este intervalo para 5 anos	-	60 dias	30 dias
Difteria, Tétano, Pertussis (dTpa - acelular)	Difteria, Tétano e Coqueluche	Toxoides diftérico (teor reduzido) + tetânico + pertussis(aceular) purificados	Uma dose	Uma dose a cada gestação	Gestantes a partir da 20ª semana de gravidez e puérperas até 45 dias	60 dias após dT	30 dias após dT

Fonte: <https://www.gov.br/saude/pt-br/vacinacao/calendario>.

ANEXO E – 1º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO - ANALISTA 1

AmStatis Version 7.0. Friday, 23 June 2023, 15:44:15 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Monovalente
Method	Elisa
Assay number	29/23
Technician	Lucas
Date of assay	21/06/2023

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	29/23				
Ass. pot.	20 µg/ ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.502	0.879	1.471	2.258	2.664
(2)	0.475	0.808	1.482	2.090	2.751
(3)	0.509	0.881	1.565	2.194	2.640

Sample 1					
Id.	29/23				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.503	0.818	1.397	2.080	
(2)	0.461	0.767	1.490	2.008	
(3)	0.483	0.804	1.533	2.070	

Model: Parallel lines

Design: Completely randomised

Transformation: $y' = \ln(y)$

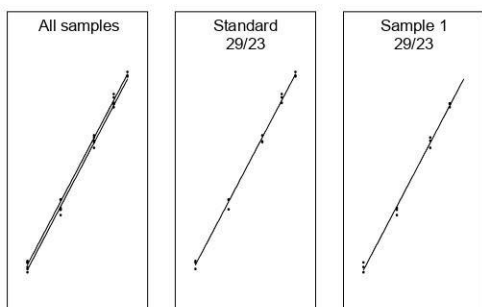
Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.818645 (0.801437 to 0.835853)

Correlation |r|: 0.998212

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.341439	0.341439	244.826	0.000 (***)
Regression	1	9.49156	9.49156	>1000	0.000 (***)
Non-parallelism	1	5.36676E-05	5.36676E-05	0.038	0.847
Non-linearity	5	0.0100948	0.00201896	1.448	0.255
Standard	3	0.00298665	0.000995550	0.714	0.556
Sample 1	2	0.00710816	0.00355408	2.548	0.106
Treatments	8	9.84315	1.23039	882.242	0.000 (***)
Residual error	18	0.0251032	0.00139462		
Total	26	9.86825	0.379548		

Sample 1			
Id.	29/23		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	18.2405	18.9464	19.6726
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	96.3%	100.0%	103.8%



Executed by:


Calculated by:

Approved by:

ID: RENATA/FIOCRUZ/BRA

Fonte: A autora (2024).

ANEXO F – 2º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO - ANALISTA 2

 Version 7.0. Friday, 23 June 2023, 14:54:56 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Monovalente
Method	Elisa
Assay number	29/23
Technician	Karen
Date of assay	22/06/2023

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	29/23				
Ass. pot.	20 µg/ m/l				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.647	1.062	1.89	2.6066	3.039
(2)	0.605	0.992	1.971	2.689	3.035
(3)	0.73	1.177	2.071	2.848	3.152

Sample 1					
Id.	29/23				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.553	0.971	1.677	2.43	
(2)	0.571	0.818	1.718	2.451	
(3)	0.607	0.957	1.88	2.559	

Model: Parallel lines

Design: Completely randomised

Transformation: $y' = \ln(y)$

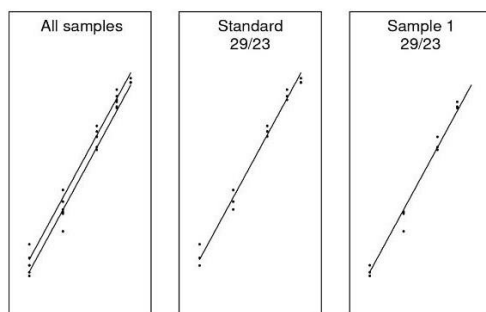
Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.791401 (0.761969 to 0.820833)

Correlation | r |: 0.993183

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.537765	0.537765	131.806	0.000 (***)
Regression	1	8.87033	8.87033	>1000	0.000 (***)
Non-parallelism	1	0.0112351	0.0112351	2.754	0.114
Non-linearity	5	0.0449140	0.00898281	2.202	0.099
Standard	3	0.0227494	0.00758313	1.859	0.173
Sample 1	2	0.0221646	0.0110823	2.716	0.093
Treatments	8	9.46424	1.18303	289.961	0.000 (***)
Residual error	18	0.0734392	0.00407996		
Total	26	9.53768	0.366834		

Sample 1			
Id.	29/23		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	16.2932	17.4473	18.6558
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	93.4%	100.0%	106.9%



Executed by:

Calculated by:

Approved by:

ID: RENATA/FIOCRUZ/BRA

Fonte: A autora (2024).

ANEXO G – 3º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO - ANALISTA 2

OmniStat Version 7.0. Wednesday, 28 June 2023, 10:51:08 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Monovalente
Method	Elisa
Assay number	29/23
Technician	Karen
Date of assay	26/06/2023

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	29/23				
Ass. pot.	20 µg/ ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.585	0.885	1.545	2.133	2.629
(2)	0.518	0.858	1.605	2.247	2.662
(3)	0.641	0.997	1.700	2.286	2.845

Sample 1					
Id.	29/23				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.482	0.741	1.364	1.989	
(2)	0.472	0.793	1.436	2.149	
(3)	0.451	0.933	1.427	2.364	

Model: Parallel lines

Design: Completely randomised

Transformation: $y' = \ln(y)$

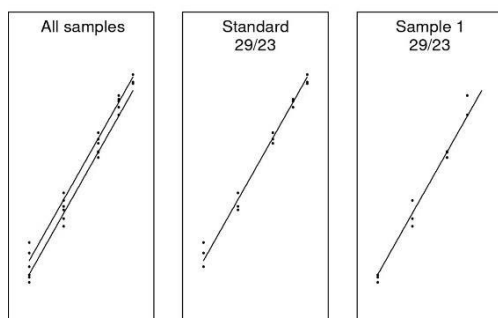
Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.784001 (0.748862 to 0.819139)

Correlation | r |: 0.992779

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.797939	0.797939	145.710	0.000 (***)
Regression	1	8.24995	8.24995	>1000	0.000 (***)
Non-parallelism	1	0.0190741	0.0190741	3.483	0.079
Non-linearity	5	0.0199295	0.00398591	0.728	0.612
Standard	3	0.00878169	0.00292723	0.535	0.665
Sample 1	2	0.0111478	0.00557392	1.018	0.382
Treatments	8	9.08690	1.13586	207.417	0.000 (***)
Residual error	17	0.0930956	0.00547621		
Total	25	9.17999	0.367200		

Sample 1			
Id.	29/23		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	15.7434	17.1274	18.5832
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	91.9%	100.0%	108.5%



Executed by:

Calculated by:

Approved by:

ANEXO H – 4º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO - ANALISTA 2

OmniStat Version 7.0. Wednesday, 28 June 2023, 10:48:02 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Monovalente
Method	Elisa
Assay number	29/23
Technician	Karen
Date of assay	27/06/2023

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	29/23				
Ass. pot.	20 µg/ ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.573	0.956	1.717	2.561	2.838
(2)	0.522	0.990	1.859	2.558	2.990
(3)	0.698	1.004	1.911	2.671	2.937

Sample 1					
Id.	29/23				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.553	0.798	1.623	2.374	
(2)	0.558	0.881	1.543	2.430	
(3)	0.598	0.992	1.851	2.711	

Model: Parallel lines

Design: Completely randomised

Transformation: $y' = \ln(y)$

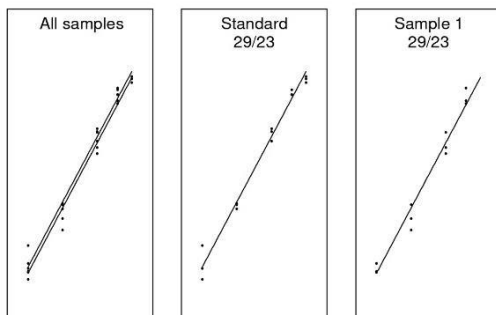
Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.809756 (0.773867 to 0.845644)

Correlation | r | : 0.991123

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.358220	0.358220	59.051	0.000 (***)
Regression	1	9.28655	9.28655	>1000	0.000 (***)
Non-parallelism	1	0.00349311	0.00349311	0.576	0.458
Non-linearity	5	0.0608472	0.0121694	2.006	0.126
Standard	3	0.0257837	0.00859457	1.417	0.271
Sample 1	2	0.0350635	0.0175318	2.890	0.082
Treatments	8	9.70911	1.21364	200.064	0.000 (***)
Residual error	18	0.109192	0.00606625		
Total	26	9.81830	0.377627		

Sample 1			
Id.	29/23		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	17.3066	18.7613	20.3046
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	92.2%	100.0%	108.2%



Executed by:

Calculated by:

Approved by:

ID: RENATA/FIOCRUZ/BRA

Fonte: A autora (2024).

ANEXO I – COMBINAÇÃO DA POTÊNCIA ESTIMADA E DE LIMITES DE CONFIANÇA MÍNIMO E MÁXIMO DOS QUATRO ENSAIOS

Amestatis Version 7.0. Thursday, 29 June 2023, 15:17:23 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Monovalente
Method	Elisa
Assay number	29/23
Ass. pot.	? µg/ml

Remarks: _____

Technician	Date of assay	Sample	Info	Lower limit	Estimate	Upper limit	df
Karen	22/06/2023	1	29/23	16.2932	17.4473	18.6558	18
Karen	26/06/2023	1	29/23	15.7434	17.1274	18.5832	17
Karen	27/06/2023	1	29/23	17.3066	18.7613	20.3046	18
Lucas	21/06/2023	1	29/23	18.2405	18.9464	19.6726	18

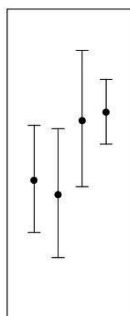
Geometric combination

Homogeneity: $p = 0.030$

Weighted combination			
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	17.9280	18.4215	18.9286
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	97.3%	100.0%	102.8%

Semi-weighted combination			
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	17.2708	18.1524	19.0791
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	95.1%	100.0%	105.1%

Unweighted combination			
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	16.6506	18.0531	19.5738
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	92.2%	100.0%	108.4%



Executed by:

Calculated by:

Approved by: