

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

Jarbas Emílio dos Santos

**AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DO ENSAIO DE POTÊNCIA DA VACINA ORAL CONTRA
A POLIOMIELITE UTILIZADA NO BRASIL NO PERÍODO DE 2008 A 2009**

Rio de Janeiro

2010

Jarbas Emílio dos Santos

**AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DO ENSAIO DE POTÊNCIA DA VACINA ORAL
CONTRA A POLIOMIELITE UTILIZADA NO BRASIL NO PERÍODO DE 2008 A 2009**

Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional
de Controle de Qualidade em Saúde da
Fundação Oswaldo Cruz como requisito para
obtenção do grau de Mestre

Orientadores: Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira
Dr. Wlamir Corrêa de Moura

Rio de Janeiro

2010

Santos, Jarbas Emílio dos

Avaliação Retrospectiva do ensaio de potência da Vacina Oral contra a Poliomielite utilizada no Brasil no período de 2008 a 2009. / Jarbas Emilio dos Santos, Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2010.

88 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010.

Orientadores: Ana Cristina de Almeida Nogueira e Wlamir de Moura Corrêa.

1. Avaliação. 2. Vacina. 3. Retrospectiva 4. Potência. 5. Poliomielite.

Jarbas Emílio dos Santos

**AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DO ENSAIO DE POTÊNCIA DA VACINA ORAL
CONTRA A POLIOMIELITE UTILIZADA NO BRASIL NO PERÍODO DE 2008 A 2009**

Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional
de Controle de Qualidade em Saúde da
Fundação Oswaldo Cruz como requisito para
obtenção do grau de Mestre

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Dra. Isabella Fernandes Delgado (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Jurandy Susana Patrícia Ocampo Lyra (UNIRIO)

Dra. Maria Helena Simões Villas Boas (INCQS/FIOCRUZ)

*À Luiza companheira de todas as horas e
que faz tudo valer a pena.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, acima de tudo.

À Dra Ana Cristina de Almeida Nogueira pela orientação e amizade.

Ao Dr. Wlamir de Moura Corrêa pela orientação, pela força e pela amizade.

À direção do INCQS, que deu todo apoio a este trabalho.

À Lúcia Maria Correia Werneck, pela amizade incondicional.

À Dra. Isabella Fernandes Delgado, ex-chefe do Departamento de Imunologia, por toda força e apoio.

Ao Dr. Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias, chefe do Laboratório de Vacinas Bacterianas pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Vacinas Virais Michele Nascimento, Patrícia Alves por todo apoio, confiança e amizade.

Ao Setor de Cultura de Células em especial à Anna Cristina Rosa Guimarães e Deuse por toda força e apoio.

Aos amigos do Departamento de Imunologia que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

À Prof.^a Patrícia Ocampo, pela generosidade e apoio a este trabalho.

*Quem trilha o caminho da perfeição não acumula tesouros,
Para o sábio riqueza é o que ele faz pelos outros,
Quanto mais ele pode oferecer aos outros,
Tanto mais rico se torna.
Assim como de Tao brota a vida,
Assim age o sábio,
Sem ferir ninguém.”*

Lao Tse

RESUMO

Uma pesquisa foi realizada para testar a aplicação de ferramentas de garantia da qualidade em ensaios de potência da vacina oral contra poliomielite (OPV) e testar novas abordagens para validação de métodos analíticos, levando em conta a maior variabilidade de ensaios biológicos, com a finalidade de traçar o perfil deste ensaio. Foram adotadas duas abordagens para a validação do ensaio: a abordagem Clássica da "International Conference on Harmonization" aplicada aos ensaios biológicos de acordo com as recomendações descritas pela comissão da "Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques" (SFSTP) e a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações da para esta abordagem também da SFSTP. As principais características avaliadas no estudo de validação, por se tratar de um ensaio quantitativo, foram a Exatidão e a Precisão. O Cpk, um índice gerencial de capacidade de processos, foi calculado para avaliar a capacidade do ensaio de potência e a adequação à regra 4-6-20 foi avaliada. Para cada componente viral da OPV, gráficos de controle da diferença entre os resultados dos dois laboratórios foram utilizados para detectar tendências não aleatórias nos resultados e a média das variâncias entre os resultados obtidos em cada laboratório, por amostra, foram utilizada para calcular o coeficiente de variação geométrico % geral em uma abordagem prática para determinar a reprodutibilidade do ensaio. O ensaio foi considerado Exato e Preciso nas duas abordagens de validação.

Palavras-chave: Avaliação; Vacina; Retrospectiva; Potência; Poliomielite

ABSTRACT

A research was performed to test quality control tools use in potency assays of Oral Polio Vaccine (OPV) and to test new approaches for validating analytic methods, considering the higher variability of biological assays, with the goal of establishing the profile of the assay. Two approaches were used for validating the assay: the International Conference on Harmonization classic approach applied to bioassays using the guideline of "Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques" commission for this approach and using the Total Error Concept also recommended by the same commission. The main characterizes evaluated in the validation study, as recommended for quantitative assays, were Accuracy and Precision. Cpk, and management index of process capability, was calculated to evaluate the capability of the assay and the fit to the 4-6-20% rule was evaluated. For each vaccine viral component of OPV, control charts plotting the difference between the results of INCQS and the producer laboratory were performed to detect non random trends in results and the between laboratories results variances mean, for individual samples, were used to calculate the overall % geometric coefficient of variation as a practical approach to assess the reproducibility of the assay. The assay was considered Accurate and Precise in both approaches.

Key-words: Evaluation; Vaccine; Retrospective; Potency; Poliomyelitis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Estela Egípcia retrata pessoa com sequela de poliomielite	17
FIGURA 2	Publicação de Michael Underwood (1789), descrevendo uma doença sugestiva de poliomielite	18
FIGURA 3	Nas décadas de 1940 e 1950 os “pulmões de ferro” foram usados para manter pacientes com poliomielite vivos	19
FIGURA 4	Áreas com poliomielite autóctone	22
FIGURA 5	Número de casos de poliomielite no mundo, no período de 2000/2008	23
FIGURA 6	Mapa mostrando a atual distribuição do vírus da poliomielite na África e Oriente	24
FIGURA 7a	Campanha de vacinação contra a poliomielite – 1º etapa	31
FIGURA 7a	Campanha de vacinação contra a poliomielite – 2º etapa	32
FIGURA 8	Número de casos confirmados de poliomielite e notificados de paralisia flácida aguda, no Brasil, de 1979 a 2008	34
QUADRO 1	Títulos mínimos de cada componente viral para aprovação da OPV	35
QUADRO 2	Quantitativo de lotes de OPV analisados no INCQS	48
GRÁFICO 1	Diferença entre resultados dos ensaios do Produtor e dos ensaios do INCQS em Log_{10} CCID ₅₀ – componente trivalente	72
GRÁFICO 2	Diferença entre resultados dos ensaios do Produtor e dos ensaios do INCQS em Log_{10} CCID ₅₀ – componente tipo I	72
GRÁFICO 3	Diferença entre resultados dos ensaios do Produtor e dos ensaios do INCQS em Log_{10} CCID ₅₀ – componente tipo II	73
GRÁFICO 4	Diferença entre resultados dos ensaios do Produtor e dos ensaios do INCQS em Log_{10} CCID ₅₀ – componente tipo III	74
GRÁFICO 5	Gráfico de controle sistemático da vacina de referência lote 24-A, componente viral trivalente. O KS obtido foi 0,981, indicando que a amostra apresenta distribuição normal	74
GRÁFICO 6	Gráfico de controle sistemático da vacina de referência lote 24-A, componente viral tipo I. O KS obtido foi 0,946, indicando que a amostra apresenta distribuição normal	75
GRÁFICO 7	Gráfico de controle sistemático da vacina de referência lote 24-A, componente viral tipo II. O KS obtido foi 0,885, indicando que a amostra apresenta distribuição normal	76
GRÁFICO 8	Gráfico de controle sistemático da vacina de referência lote 24-A, componente viral tipo III. O KS obtido foi 0,983, indicando que a amostra apresenta distribuição normal	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Critérios adotados para configuração dos gráficos de controle calculados sobre os 30 primeiros resultados	56
TABELA 2	Interpretação dos gráficos de controle	57
TABELA 3	Dados brutos obtidos nos ensaios de estabelecimento da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para o componente trivalente	58
TABELA 4	Dados brutos obtidos nos ensaios de estabelecimento da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para o componente tipo I	59
TABELA 5	Dados brutos obtidos nos ensaios de estabelecimento da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para o componente tipo II	60
TABELA 6	Dados brutos obtidos nos ensaios de estabelecimento da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para o componente tipo III	61
TABELA 7	Análise estatística dos resultados	61
TABELA 8	Avaliação da exatidão – Bias percentual e Teste-t de Student bicaudal	62
TABELA 9	Dados brutos para o componente trivalente	63
TABELA 10	Análise de variância para o componente trivalente	63
TABELA 11	Componente trivalente – Intervalo de confiança de 95% - Aceitação para o título esperado de 6,91 log ₁₀ CCID ₅₀ /dose(+/-0,5 log = 6,41 a 7,41).	63
TABELA 12	Dados brutos obtidos para o componente tipo I	64
TABELA 13	Análise de variância para o componente tipo I	64
TABELA 14	Componente tipo I – Intervalo de confiança de 95% - Aceitação para o título esperado de 6,93 log ₁₀ CCID ₅₀ /dose(+/-0,5 log = 6,43 a 7,43)	65
TABELA 15	Dados brutos obtidos para o componente tipo II	65
TABELA 16	Análise de variância para o componente tipo II	66
TABELA 17	Componente tipo II – Intervalo de confiança de 95% - Aceitação para o título esperado de 5,96 log ₁₀ CCID ₅₀ /dose(+/-0,5 log = 5,46 a 6,46)	66
TABELA 18	Dados brutos obtidos para o componente tipo III	67
TABELA 19	Análise de variância para o componente tipo III	67
TABELA 20	Componente tipo III – Intervalo de confiança de 95% - Aceitação para o título esperado de 6,66 log ₁₀ CCID ₅₀ /dose(+/-0,5 log = 6,16 a 7,16)	68
TABELA 21	Análise estatística dos resultados do ensaio de potência da OPV para os quatro componentes virais	68

TABELA 22	Avaliação da exatidão para o ensaio da OPV para os quatro componentes virais utilizando o conceito do Erro Total	69
TABELA 23	Avaliação da precisão para o ensaio da OPV para os quatro componentes virais utilizando o conceito do Erro Total	70
TABELA 24	CpK calculado para os quatro componentes virais	70
TABELA 25	Análise estatística das diferenças entre os resultados de potência do Laboratório Produtor e do INCQS para 39 lotes de OPV	71

SIGLAS

ATCC - American Type Culture Collection

BPF - Boas Práticas de Fabricação

CEME - Central de Medicamentos da Presidência da República

ECP - Efeito Citopático

EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines

FDA - Food and Drug Administration

FSESP - Fundação Escola de Serviço Público

Hep₂C - Linhagem Celular de Carcinoma de Laringe Humana

ICH - International Conference of Harmonization

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IPV - Vacina Inativada contra a Poliomielite, do inglês, *Inactivated Polio Vaccine*

LCCDMA - Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos

LCN - Laboratório Nacional de Controle

OPV - Vacina Oral contra a Poliomielite, do inglês, *Oral Polio Vaccine*

Ph. Eur. - Farmacopeia Europeia

Ph. Bras. - Farmacopeia Brasileira

PNI – Programa Nacional de Imunizações

SFSTP - Sociedade Francesa de Ciências e Técnicas Farmacêuticas, do francês,
Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

VAPP - Pólio Paralítica Associada à Vacina, do inglês, *Vaccine associated Polio Paralytic*

WHO - Organização Mundial de Saúde, do inglês, *World Health Organization*

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 HISTÓRICO	17
1.2 ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO	20
1.3 EPIDEMIOLOGIA	21
1.4 AS VACINAS	26
1.4.1 As vacinas contra a poliomielite	26
1.5 RELEVÂNCIA	30
1.6 ENSAIO DE POTÊNCIA	32
1.7 GARANTIA QUALIDADE	35
1.8 IMPORTÂNCIA DAS PREPARAÇÕES DE REFERÊNCIA PARA LIBERAÇÃO DE LOTES	36
1.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	36
1.9.1 O problema dos ensaios biológicos	38
1.9.2 Abordagem clássica da ICH	38
1.9.2.1 <i>Exatidão</i>	39
1.9.2.2 <i>Precisão</i>	40
1.9.3 Conceito do Erro Total	41
1.9.3.1 <i>Índice de capacidade (CpK)</i>	43
1.9.4 Monitoramento com gráficos de controle	44
2 OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48

3.1 TOTAL DE LOTES ANALISADOS	48
3.2 ESTUDOS RETROSPECTIVOS DOS RESULTADOS DE ENSAIO DE POTÊNCIA	48
3.3 ESTUDO DE VALIDAÇÃO	49
3.3.1 Análise estatística	49
3.3.2 Análise de variância	50
3.3.3 Coeficiente de variação geométrico (gCV%)	50
3.4 OBJETIVO I - PADRONIZAÇÃO DO TÍTULO DA VACINA DE REFERÊNCIA LOTE 24-A	51
3.5 OBJETIVO II – VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE POTÊNCIA	52
3.5.1 <i>Exatidão</i>	52
3.5.2 <i>Precisão</i>	53
3.5.3 <i>Regra 4-6-20%</i>	54
3.5.4 <i>CpK</i>	54
3.6 OBJETIVO III – ANÁLISE DE TENDÊNCIA DA DIFERENÇA ENTRE RESULTADOS E DETERMINAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DO ENSAIO	55
3.6.1 Análise de tendência da diferença entre resultados	55
3.6.2 Determinação da reprodutibilidade do ensaio	55
3.6.3 Controle sistemático das vacinas de referência empregadas nos ensaios	56
4 RESULTADOS	58
4.1 ESTUDO DE PADRONIZAÇÃO DO TÍTULO DA VACINA DE REFERÊNCIA LOTE 24-A	58
4.1.1 Componente trivalente	58
4.1.2 Componente tipo I	59
4.1.3 Componente tipo II	59
4.1.4 Componente tipo III	60
4.2 ESTUDO DE VALIDAÇÃO	61
4.2.1 Validação pela abordagem clássica da ICH	61

4.2.1.1 <i>Exatidão</i>	61
4.2.1.2 <i>Precisão</i>	62
4.2.1.2.1 <i>Componente trivalente</i>	62
4.2.1.2.2 <i>Componente tipo I</i>	64
4.2.1.2.3 <i>Componente tipo II</i>	65
4.2.1.2.4 <i>Componente tipo III</i>	67
4.2.2 Validação conceito Erro Total	68
4.2.2.1 <i>Exatidão</i>	68
4.2.2.2 <i>Precisão total</i>	69
4.2.2.3 <i>Regra 4-6-20%</i>	70
4.2.2.4 <i>CpK</i>	70
4.3 ANÁLISE DE TENDÊNCIA E REPRODUTIBILIDADE	71
4.3.1 Diferença entre os resultados de potência obtidos no INCQS e pelo laboratório produtor	71
4.3.2 Controle sistemático da vacina de referência lote 24-A	74
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

A poliomielite (do grego pólios, cinzento, e myelos, medula espinal) é uma doença infecto-contagiosa de origem viral aguda causada por poliovírus, sendo designada como “paralisia infantil” por ser conhecida inicialmente como uma doença que causava paralisia em crianças. A doença é bastante antiga na história da humanidade. Uma Estela egípcia, com data que remonta à oitava dinastia (período de 1580 – 1350 AC), retratando um sacerdote com uma perna afetada apoiada sobre uma muleta (figura 1), é um forte indício da presença desta doença em civilizações bastante antigas.

Figura 1 - Estela Egípcia retrata pessoa com sequela de poliomielite

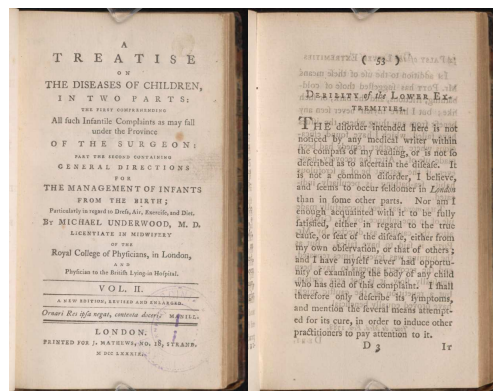


Fonte: Oliveira, 2008.

No entanto, a primeira tentativa de descrição clínica conhecida é atribuída a Michael Underwood, um pediatra britânico, que em 1789 publicou em seu livro “Treatise on Diseases of Children” (figura 2), uma doença sugestiva de poliomielite que afetava as extremidades inferiores, principalmente em crianças. Nos anos

subseqüentes, outros casos de poliomielite foram notificados. Em 1835, o primeiro relato de um surto da doença foi descrito por Jonh Badhame e em 1840, Jacob Von Heine, um ortopedista alemão, fez a primeira descrição que indica a medula espinhal como alvo da forma paralítica da doença. Surtos na Europa foram documentados no início do século XIX e nos Estados Unidos os primeiros surtos foram registrados em 1843. Muitas dessas epidemias eram acompanhadas por reações histéricas da população (DE JESUS, 2007).

Figura 2 - Publicação de Michael Underwood (1789), "Treatise on Diseases of Children", descrevendo uma doença sugestiva de poliomielite.



Fonte: <http://historical.hsl.virginia.edu/treasures/underwood.html>

Em 1894, ocorreu o primeiro surto significativo de paralisia infantil das Américas, que se deu nos Estados Unidos. Mais tarde identificado como surto de poliomielite. Porém em 1887, um surto de 44 casos em Estocolmo, permitiu a Karl Oskar Medin categorizar a poliomielite como doença da medula espinhal, bulbar encefálica e polineurítica. Na Suécia, em 1905, o aparecimento de 1000 casos permitiu a Wickman analisar a transmissão de pessoa para pessoa, assim como mostrar a natureza contagiosa da doença, que até então não havia sido estabelecida. Um grande avanço ocorreu em Viena, em 1908, quando Karl Landsteiner e Erwin Popper descobriram que o agente etiológico causador da poliomielite era um vírus filtrável e não uma bactéria como se pensava até então. Os dois cientistas inoculando líquido espinhal, de um paciente com poliomielite paralítica, em cérebro de dois macacos e ambos desenvolveram poliomielite. Esta

descoberta contribuiu de maneira significativa para as pesquisas futuras. Mas, a epidemia ocorrida em 1916 nos Estados Unidos, com um total de 27000 casos com 6000 óbitos dos quais 9000 casos somente em Nova York com 2343 óbitos, causou pânico generalizado. Esta epidemia levou a preocupação, em ambos os lados do Oceano Atlântico, que foi reforçada e pesquisas mais abrangentes foram realizadas para investigar a transmissão da doença (DRUTZ et al., 2000).

Na década de 1940 a 1950 as epidemias de poliomielite, na Europa e Estados Unidos, causaram muito pânico principalmente naquelas pessoas em que a paralisia tinha afetado os músculos respiratórios, pois elas necessitavam de um respirador artificial. No caso destas pessoas foi utilizado, um dispositivo desenvolvido por Philip Drinker, em 1926, que consistia de um cilindro de ferro enorme que funcionava com dois foles para regular a respiração e mantê-las vivas. Este dispositivo foi chamado de “**pulmão de ferro**” (figura 3), e faz parte da história da poliomielite no mundo (DRUTZ et al., 2000).

Figura 3 - Nas décadas de 1940 e 1950 os “pulmões de ferro” foram usados para regular a respiração e manter pacientes com poliomielite vivos



Fonte: WHO, 1969.

No Brasil, o pediatra Fernandes Figueira, em 1911, foi quem pela primeira vez descreveu um surto de poliomielite, embora se tenha registros de alguns poucos casos no final do século XIX. Algum ano mais tarde, em 1917, Francisco de Salles Gomes descreveu outro surto, em Vila Americana, estado de São Paulo. Esta

epidemia resultou na formulação e aprovação de uma lei que tornava a poliomielite doença de notificação compulsória no estado de São Paulo. Após estas primeiras epidemias, alguns surtos de certa importância foram registrados em diversas capitais brasileiras: Porto Alegre (1935), Santos (1937), São Paulo e Rio de Janeiro (1939). Nos anos 40, Belém (1943), Florianópolis (1943 e 1947), Recife (1946) e Porto Alegre (1945). Em 1953, ocorreu a maior epidemia de poliomielite registrada no Brasil, no Rio de Janeiro, atingindo a taxa de 21,5 pessoas infectadas por 100 mil habitantes (CAMPOS et al., 2003).

1.2 ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO

O vírus da poliomielite pertence à família Picornaviridae, ao gênero enterovírus. É um vírus com genoma de RNA simples de sentido positivo, sem envelope, esférico, medindo de 24 – 30 nm de diâmetro. Existem três sorotipos distintos imunologicamente, mas idênticos em suas manifestações clínicas. Os poliovírus são estáveis em pH ácido e podem se manter por muito tempo quando conservados de 0 a 8°C. É resistente ao álcool 70%, tal como outros enterovírus. Os três sorotipos do poliovírus I, II e III provocam a doença, sendo que o tipo I é isolado com maior frequência, seguido pelo tipo III. O sorotipo II apresenta maior imunogenicidade. A imunogenicidade é específica para cada tipo. Os antígenos presentes em células infectadas pelo poliovírus foram designados por antígeno D, relacionado ao vírus infeccioso, e antígeno C relacionado ao capsídeo vazio. O virion do poliovírus é pequeno e possui quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4. Os lípidos são normalmente ausentes, mas algumas cepas podem apresentar poucas quantidades na face interna do capsídeo (WHO, 2004).

Na maioria dos países em desenvolvimento a rota de transmissão do poliovírus mais importante é fecal-oral. O vírus se replica de forma eficiente no trato intestinal e geralmente é eliminado nas fezes por duas a quatro semanas e, por vezes, a eliminação dura um período mais longo. A eliminação pode ser intermitente e é afetada pelo estado ou pela competência imunológica do indivíduo. Alguns fatores que influenciam a transmissão do vírus incluem a existência de aglomeração,

os níveis de higiene, qualidade da água e instalações de tratamento de esgoto. Em áreas com boas condições sanitárias e de água não contaminada, outras vias de transmissão são provavelmente mais importantes.

Desde que o vírus pode também se replicar no trato respiratório superior, pode ser eliminado e transmitido por aerossóis através do contato pessoa a pessoa. Em geral, o poliovírus selvagem tem um padrão sazonal distinto. Em regiões tropicais e sub-tropicais a circulação tende a ser o ano inteiro, ou em associação com a estação das chuvas. Em áreas temperadas a circulação prevalece mais no outono e no verão (WHO, 2004).

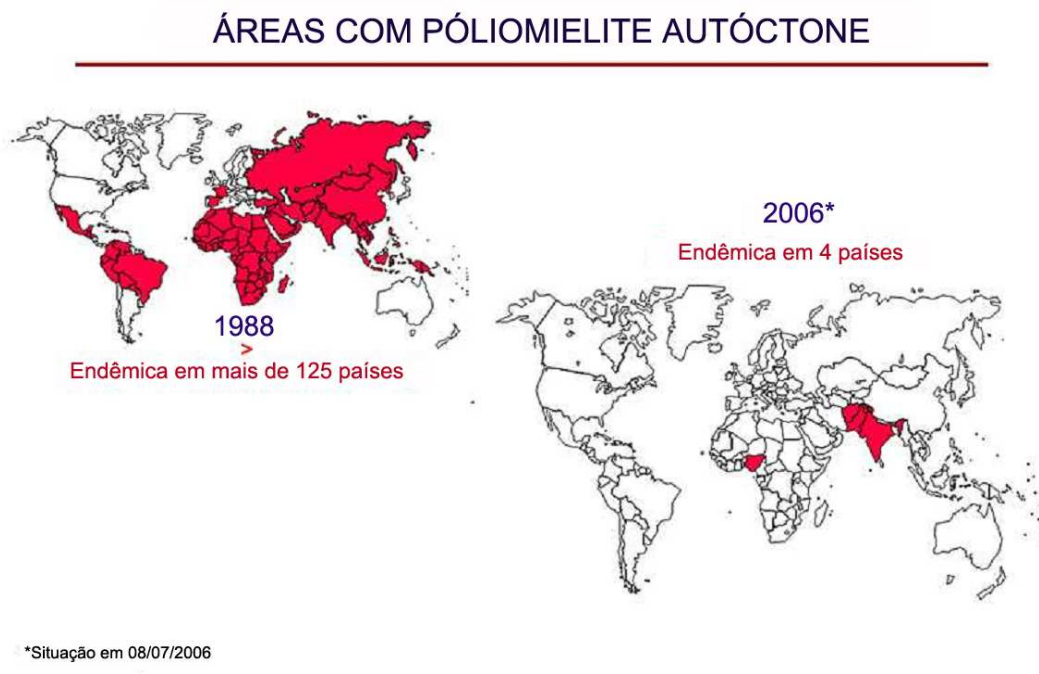
1.3 EPIDEMIOLOGIA

Qualquer doença infecciosa pode ser eliminada, ou mesmo globalmente erradicada, desde que seja estritamente uma infecção humana, sem nenhum reservatório animal que possa abrigar o patógeno, e possa ser prevenida por uma vacina eficaz e acessível. A campanha de erradicação global da varíola, uma doença antiga, temível, frequentemente fatal, foi iniciada em 1967, e o sucesso foi alcançado em 1979 e certificado em 1980. Tal sucesso foi facilitado pela disponibilidade de uma vacina de fácil administração combinada com uma rede global de vigilância epidemiológica. O sucesso da erradicação da varíola pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a incentivou a lançar em 1974 o Programa Ampliado de Imunização (PAI) nos países em desenvolvimento até então privados do acesso à vacinação (REY, 2008).

O Fundo de Iniciativa Global para Erradicação da Poliomielite, lançado em 1988, alcançou grande sucesso em seu objetivo, pois conseguiu diminuir de 350.000 casos relatados e 125 países (figura 4) com poliomielite endêmica à época do início dos trabalhos em 1988, para 680 casos registrados em 2006. Atualmente, o vírus permanece endêmico em quatro países: Afeganistão, Índia, Nigéria e Paquistão. A erradicação é definida como um estado em que a doença tenha desaparecido, mas o agente causador, neste caso o poliovírus, ainda pode estar circulando no ambiente. A OMS também estabeleceu um objetivo mais difícil ainda de ser alcançado, que é a remoção completa do poliovírus do ambiente, como no caso da

varíola. Em 1996, um grande surto na Albânia, um país que recebeu o certificado da OMS por estar livre da transmissão da poliomielite durante 11 anos, 138 casos confirmados de poliomielite foram notificados. Em 1997, 141 casos de poliomielite foram registrados na Turquia, o único país na Europa, que relatou a transmissão do poliovírus selvagem durante o ano. Casos de poliomielite selvagem, não foram registrados na Europa por três anos até uma reincidência na Bulgária em 2001, o país já está livre da poliomielite. Durante os dez últimos anos, surtos importantes também foram observados na República Dominicana e no Haiti (DUTTA, 2008).

Figura 4 – Áreas com Poliomielite autóctone.

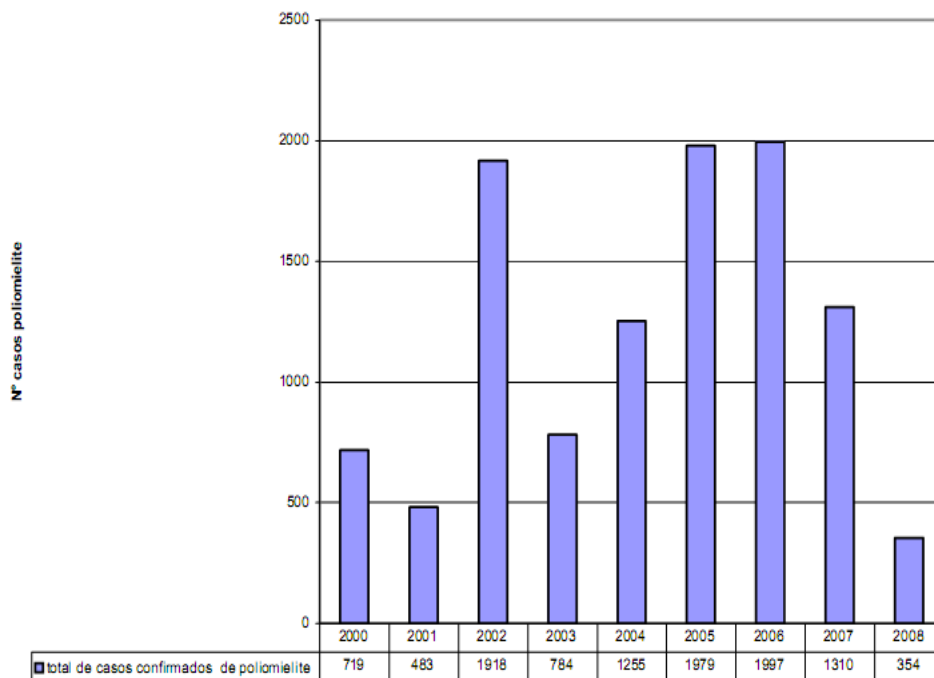


Fonte: Adaptado de REY & GIRARD, 2008.

O Comitê Consultivo para a Erradicação da Poliomielite, da OMS tendo por base as lições aprendidas com o ressurgimento da poliomielite no período 2003-2005, em países considerados livres da doença, estabeleceu, em outubro de 2005, recomendações específicas para orientar a resposta à circulação do poliovírus em uma área anteriormente livre para limitar o potencial de disseminação internacional do poliovírus. Nos últimos anos, a iniciativa para a erradicação da poliomielite tem enfrentado desafios importantes. O poliovírus selvagem do tipo II foi erradicado em 1999 e a decisão de intensificar os esforços para a erradicação da doença, adotada

em fevereiro de 2007, reduziu em 80% o poliovírus selvagem do tipo I. A situação endêmica (figura 5) observada em algumas áreas pode estar relacionada à dificuldades encontradas para vacinar o quantitativo preconizado de crianças e administrar o número de doses suficientes para garantir a imunidade (BRASIL, 2008).

Figura 5: Número de casos confirmados de poliomielite no mundo, no período 2000/2008(*)



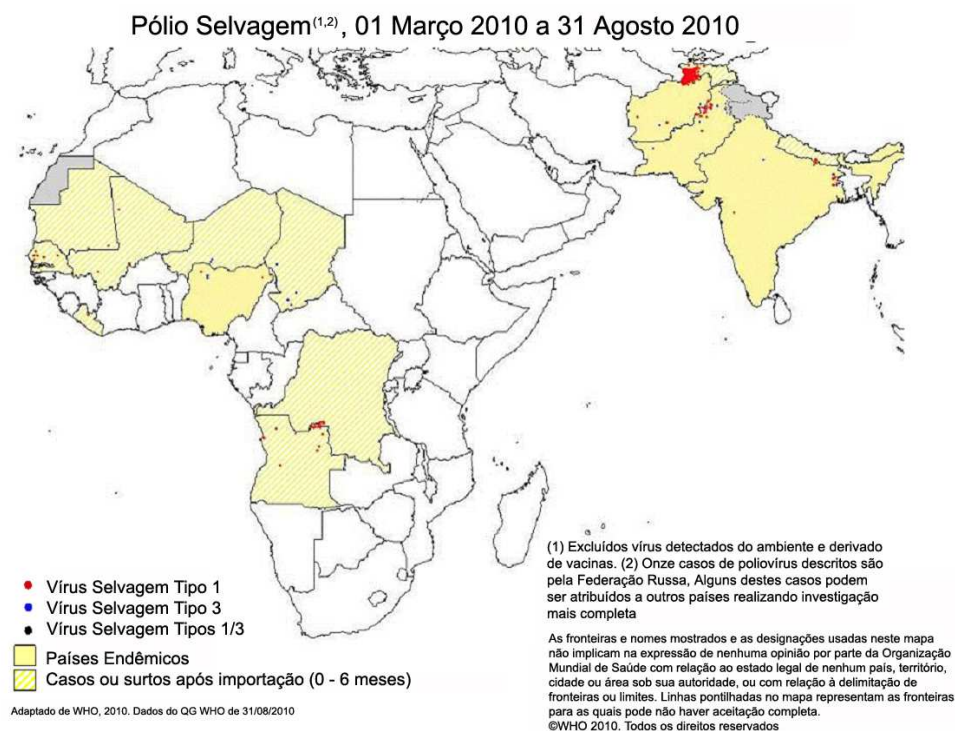
Fonte: Iniciativa para a Erradicação Global da Poliomielite 26/02/08.

* Dados até 29/4/2008

O último caso de poliomielite nas Américas ocorreu no Peru em 1991, o último da região do Pacífico foi registrado no Camboja em 1997 e na Europa na Turquia em 1998. De fato, há uma forte dificuldade na manutenção da vigilância epidemiológica quanto da cobertura vacinal devido as conturbações sócio-políticas de diversos países. Um exemplo deste fato é a Nigéria, onde em 2002 a vacinação foi recusada por problemas políticos e religiosos. Autoridades muçulmanas alegaram que a vacina seria utilizada para esterilizar as mulheres e inocular HIV em crianças. Este acontecimento foi desastroso para o país, pois uma epidemia de poliomielite ocorreu, causada por poliovírus I e III, gerando 782 casos de poliomielite em 2004, 830 em 2005 e 1124 em 2006, e se espalhou para outros países transformando a

Nigéria no país com maior número de casos em todo o mundo (figura 6). Em 2005, alcançou o Iêmen, Arábia Saudita e Indonésia (REY, 2008).

Figura 6 – Mapa mostrando a atual distribuição do vírus na África e Oriente



Fonte: adaptado de WHO, 2010.

As Vacinas contra a Poliomielite tiveram um efeito dramático sobre a incidência de pólio nos países desenvolvidos, desde o momento da sua introdução. A vacina inativada contra a poliomielite (IPV) desenvolvida por Salk foi introduzida em 1955 e reduziu o número de casos de poliomielite cerca de 20 vezes em 1960. Com a introdução da vacina oral contra a poliomielite (OPV), em 1962, uma vacina que imitava mais de perto as infecções naturais, devido a sua rota de ingestão, observou-se que os casos de pólio continuaram a declinar até atingirem um patamar da ordem de 1.000 vezes menor do que antes da vacinação. Os casos de poliomielite restantes são, provavelmente, associados à OPV, o último caso causado pelo poliovírus selvagem nos Estados Unidos ocorreu em 1978 (MINNOR, 2009).

No entanto, a incapacidade de eliminar a circulação do vírus selvagem em alguns países tem gerado sucessivos adiamentos do prazo de erradicação. As

razões para a baixa eficácia não são compreendidas; as taxas de soroconversão e a redução do número de casos têm melhorado ao longo dos últimos dois anos por causa da introdução de vacinação complementar, com uma vacina oral monovalente contra o sorotipo predominante na região. Estes países continuam a ser uma fonte permanente de reintrodução do vírus selvagem em países onde a transmissão já havia cessado. Apesar do grande progresso em direção à erradicação da poliomielite, as notícias sobre a OPV não eram de fato todas boas. Casos de pólio paralítica, associados a OPV, foram relatados um fenômeno raro ocorrendo em uma pessoa entre milhares de vacinados. Parecia ser um evento adverso que representava um risco aceitável quando avaliado contra os enormes benefícios do uso da OPV, entretanto, esta lógica mudou em relação ao risco-benefício nos países industrializados com a erradicação do vírus selvagem (CHUMAKOV, 2008).

Os eventos virais após a primeira dose da vacina oral contra a poliomielite OPV são totalmente previsíveis. As cepas da vacina se replicam no intestino dos indivíduos vacinados por um período de tempo e depois são excretados durante 30-60 dias. Durante este período, as mutações em algumas cepas vacinais podem acontecer e estes vírus serem excretados para o ambiente por indivíduos vacinados. Essa reversão nas cepas atenuadas é a causa principal dos raros casos de Pólio Paralítica Associada à Vacina (VAPP) em indivíduos vacinados e contatos próximos.

A VAPP é definida pela OMS como a poliomielite, que ocorre em um indivíduo vacinado entre sete e 30 dias após uma dose ou em uma pessoa em contato íntimo com um indivíduo vacinado entre sete e 60 dias após a dose recebida. Este agravo ocorre tem baixa incidência, estimada pela OMS em 1 caso para um milhão de nascimentos. Porém, o vírus atenuado pode sofrer uma mutação e se tornar mais virulento causando poliomielite mais frequentemente ou se tornando mais facilmente transmissível e desta forma aumentar os níveis de cepas mutantes de poliovírus derivados da vacina que poderiam ser evitadas pela retirada do uso da OPV, por exemplo. Alguns países desenvolvidos já adotaram a IPV em suas estratégias de vacinação, entretanto no que concerne à política geral de vacinação a maioria dos países continuará utilizando nas campanhas de rotina até a certificação da erradicação do vírus selvagem a OPV (MINNOR, 2009).

1.4 AS VACINAS

De todos os ramos da medicina moderna, a vacinologia pode reivindicar ser a que mais contribuiu para o alívio da miséria humana e para o aumento espetacular da expectativa de vida nos dois últimos séculos. Sendo esta a única ciência que possibilitou a erradicação de uma doença infecciosa – Variola – responsável por 8 a 20% de todas as mortes em vários países europeus no século XVIII (ANDRÉ, 2003).

Maurice Hilleman desenvolveu mais de 40 vacinas entre as décadas de 1940 e 2000, entre elas a contra o sarampo, contra a caxumba e contra a hepatite B, entre outras realizações. Alguns observadores denotam que Hilleman deve ter salvado mais vidas do que qualquer outra pessoa (The College of Physicians of Philadelphia, 2010).

1.4.1 As vacinas contra a poliomielite

Antes do século 20, praticamente todas as crianças foram infectadas pelo poliovírus, mas eram protegidas por anticorpos maternos. Após a revolução industrial, a melhoria das práticas sanitárias levou a um aumento da idade em que as crianças entravam em contato com o vírus pela primeira vez, sendo que nesta primeira exposição as crianças já não estavam protegidas por anticorpos maternos. Na metade do século 20, os esforços para combater a epidemia crescente de poliomielite nos Estados Unidos, tinham como foco pesquisas para o desenvolvimento de vacinas visando bloquear a transmissão. O desenvolvimento da vacina começou utilizando duas estratégias diferentes. Em um primeiro momento buscou-se uma vacina com vírus inativado por formaldeído em uma segunda estratégia, as tentativas foram voltadas para uma vacina de vírus atenuado (De JESUS, 2007).

A imunidade protetora contra a poliomielite é estabelecida através de imunização, ou como resultado de uma infecção natural, pelo poliovírus. A poliomielite proporciona imunidade à doença ao longo da vida, mas a proteção está limitada ao tipo específico de poliovírus envolvido. Infelizmente, não há

proteção cruzada contra os outros dois tipos de poliovírus. Dois tipos de vacina contra a poliomielite estão disponíveis atualmente: uma onde o vírus está inativo que é a vacina contra a pólio inativada (IPV), originalmente desenvolvida em 1955 por Jonas Salk, e uma vacina oral de vírus vivo atenuado (OPV), desenvolvida por Albert Sabin, em 1961. Ambas as vacinas são muito eficazes contra os três tipos de poliovírus (WHO, 2004).

Em 1908, Landsteiner e Levaditi publicaram seus resultados mostrando que macacos injetados com líquido da medula espinhal de um caso pólio fatal desenvolveram a doença parálitica típica conforme descrito anteriormente. Em 1909, Simon Flexner, diretor do Instituto Rockefeller, e Paul Lewis publicaram seus resultados, os quais demonstraram que a doença poderia ser transmitida a macacos por inoculação intracerebral em série. Algumas tentativas de produzir uma vacina contra a poliomielite nos anos 30 não foram bem sucedidas.

Maurice Brodie e colaboradores desenvolveram um método bem eficaz para inativar o vírus da poliomielite com formol, que fora utilizado para imunizar 20 macacos e mais tarde 12 crianças. As crianças desenvolveram anticorpos neutralizantes. Vários meses depois, 3.000 crianças foram imunizadas. Ao mesmo tempo, John Kolmer tentou desenvolver uma vacina viva atenuada, utilizando ricineolato de sódio e obteve um sucesso parcial. Sua preparação foi distribuída para milhares de crianças. As consequências foram desastrosas para ambas as tentativas. Pelo menos 12 casos de pólio parálitica ocorreram, sendo seis casos fatais, resultaram da vacina de Kolmer e alguns casos com o uso da vacina desenvolvida por Brodie (PAUL, J.R. 1971).

Em 1949, foi demonstrada a capacidade de replicação dos três tipos poliovírus em cultura de células de primatas, derivadas de outros tecidos que não o do sistema nervoso, através de um efeito citopático característico que era facilmente visível ao microscópio. Testes sorológicos foram desenvolvidos utilizando cultura de tecidos para inoculação e detecção do poliovírus em amostras humanas, ao invés de inocular em macacos. Esta descoberta lhes valeu o prêmio Nobel de 1954 (ENDERS, et al, 1949).

Mais tarde, o conhecimento sobre a patogênese e os mecanismos da infecção pelo poliovírus, a descoberta dos três tipos antigênicos e o advento da cultura de células para cultivar os poliovírus, o que eliminou a necessidade de utilização de macacos, foram descobertas que facilitaram uma nova tentativa de

desenvolver uma vacina. Com uma bolsa da Fundação Nacional para a Paralisia Infantil, Jonas Salk começou sua pesquisa sobre uma vacina contra a poliomielite. Utilizando cultura de tecidos para cultivar o vírus, ele determinou as melhores condições para a inativação do agente por formalina e preparou uma vacina de vírus inativados. Com doses espaçadas, bons níveis de produção de anticorpos foram conseguidos. Os primeiros testes em humanos foram realizados em crianças do Watson DT (lar para crianças deficientes). Estas crianças eram consideradas de risco reduzido, porque tinham a resposta imune à poliomielite adquirida anteriormente. Quarenta e três crianças foram inoculadas sem nenhuma reação adversa (DRUTZ, 2000).

A vacina inativada contra a poliomielite foi licenciada primeiramente nos Estados Unidos, onde Jonas Salk demonstrou que o poliovírus incubado em formalina 1/1000 por um período de 12 a 14 dias, a uma temperatura de 37 °C, e pH 7,0 seria inativado, mas manteria a sua capacidade antigênica (SALK, et al, 1954).

As primeiras vacinas inativadas contendo os três tipos virais de poliovírus, utilizavam cultura de células de rim de macaco para a replicação viral, isto limitava a produção em larga escala. Entretanto, pouco após a vacina ter se tornado disponível foram notificados casos de doença paralítica em vacinados. Como o intervalo entre a vacinação e o início da doença correspondia ao período de incubação da poliomielite, e como a paralisia ocorria no membro inoculado, suspeitou-se de que aqueles casos fossem causados por vírus ativos residuais. Uma investigação epidemiológica revelou que quase todos os casos ocorreram em crianças que receberam a vacina produzida pelo laboratório Cutter, no episódio conhecido como *incidente Cutter*. Com os avanços nos métodos de cultura celular, purificação e concentração do vírus, tornou-se possível a produção de vacina de poliovírus inativado de potência elevada em escala industrial, com a conseqüente redução de custos de produção (FALLEIROS-CARVALHO, 2006).

Albert Sabin buscava, como uma alternativa, desenvolver uma vacina atenuada contra a poliomielite. Inicialmente cultivou os sorotipos do vírus da poliomielite em tecido embrionário nervoso humano *in vitro*. Seus estudos revelaram que os sorotipos do poliovírus diferem grandemente na sua capacidade de produzir a paralisia (SABIN et al., 1936). Sabin esperava isolar partes de cada um dos três sorotipos, onde a neurovirulência estaria reduzida sem alterar a capacidade do vírus de infectar o trato digestivo, produzindo, desta forma, imunidade sorológica e de

mucosa. Durante o período de dois anos e meio foram realizados, cerca de 9.000 testes em 150 macacos e chimpanzés, Sabin foi capaz de identificar as preparações mais virulentas de cada tipo de vírus. Posteriormente voluntários foram inoculados com uma vacina oral contendo esses sorotipos atenuados. Mas, os resultados não foram animadores, pois, o vírus excretado por quem recebeu a vacina era um pouco mais virulento do que aquele inoculado (SABIN, 1985). Em 1956, Sabin e pesquisadores da União Soviética trabalharam em colaboração por conta de algumas epidemias surgidas naquele país. Este fato foi importante para a aceitação da OPV nos Estados Unidos, pois já em 1960, 60.000.000 de crianças da Rússia e do bloco soviético receberam a vacina oral em estudos cuidadosamente monitorados. A diminuição drástica dos casos de pólio foi registrada (HINMAN, 1984).

O uso imediato da vacina desenvolvida por Salk em 1955 reduziu o número de casos de pólio drasticamente. No entanto, em 1958 houve um aumento no número de casos e em 1959 o número de casos duplicou. Pesquisadores descobriram que o nível de anticorpos circulantes, induzidos pela vacina Salk, diminuía entre dois a quatro anos após a vacinação e que doses de reforço seriam necessárias para manter a imunidade (DRUTZ, 2000).

Sabin desenvolveu cepas atenuadas dos três tipos de poliovírus, com a perda da virulência e a manutenção da capacidade infectante do trato digestivo e da sua imunogenicidade. A vacina é administrada por via oral, à semelhança da infecção pelo vírus selvagem. A OPV foi liberada para uso nos Estados Unidos em 1962 e gradativamente foi substituindo a vacina inativada desenvolvida por Salk, pois além do baixo custo e facilidade de aplicação, os vírus vacinais que colonizam o trato digestivo são eliminados em grande quantidade nas fezes de pessoas vacinadas podendo secundariamente infectar contatos suscetíveis. Segundo Falleiros-Carvalho (2006), este fato contribui para uma taxa maior de imunização do que a cobertura vacinal além de servir com o argumento para realização de campanhas de vacinação em massa em várias partes do mundo (FALLEIROS-CARVALHO, 2006).

1.5 RELEVÂNCIA

O êxito das Campanhas de Vacinação contra a varíola na década de 60 mostrou que a vacinação em massa tinha o poder de erradicar uma determinada doença. O último caso de varíola notificado no Brasil foi em 1971 e, no mundo em 1977 na Somália. Em 1973 foi formulado o Programa Nacional de Imunizações (PNI), por determinação do Ministério da Saúde, com o objetivo de coordenar as ações de imunizações que se caracterizavam, até então, pela descontinuidade, pelo caráter episódico e pela reduzida área de cobertura. A proposta básica para o Programa, constante de documento elaborado por técnicos do Departamento Nacional de Profilaxia e Controle de Doenças (Ministério da Saúde) e da Central de Medicamentos (CEME - Presidência da República), foi aprovada em reunião realizada em Brasília, em 18 de setembro de 1973, presidida pelo próprio Ministro Mário Machado Lemos e contou com a participação de renomados sanitaristas e infectologistas, bem como representantes de diversas instituições.

Em 1975 foi institucionalizado o PNI, resultante do somatório de fatores, de âmbito nacional e internacional, que convergiam para estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes, buscando a integridade das ações de imunizações realizadas no país. O PNI passou a coordenar, assim, as atividades de imunizações desenvolvidas rotineiramente na rede de serviços e, para tanto, traçou diretrizes pautadas na experiência da Fundação de Serviços de Saúde Pública (FSESP), com a prestação de serviços integrais de saúde através de sua rede própria. A legislação específica sobre imunizações e vigilância epidemiológica deu ênfase às atividades permanentes de vacinação e contribuiu para fortalecer institucionalmente o Programa (PONTE, 2003).

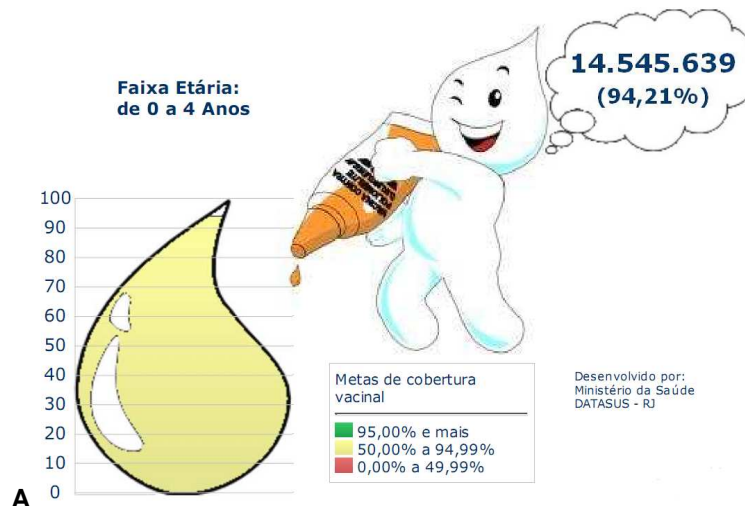
Em seguimento à erradicação da varíola, inicia-se em 1980 a 1ª campanha nacional de vacinação contra a poliomielite, com a meta de vacinar todas as crianças menores de cinco anos em um só dia. Porém, um acontecimento em 1981 mostrou a relevância e tornou pública a necessidade da qualidade dos imunobiológicos utilizados em campanhas nacionais era fundamental para o PNI. A contaminação de uma vacina contra a poliomielite, importada da antiga Iugoslávia, que iria ser utilizada na campanha contra poliomielite adiou os dias nacionais de vacinação, previstos para julho e agosto daquele ano. O país começava a perceber a

defasagem institucional que o separava dos países de primeiro mundo no que se relacionava ao controle da qualidade de vacinas.

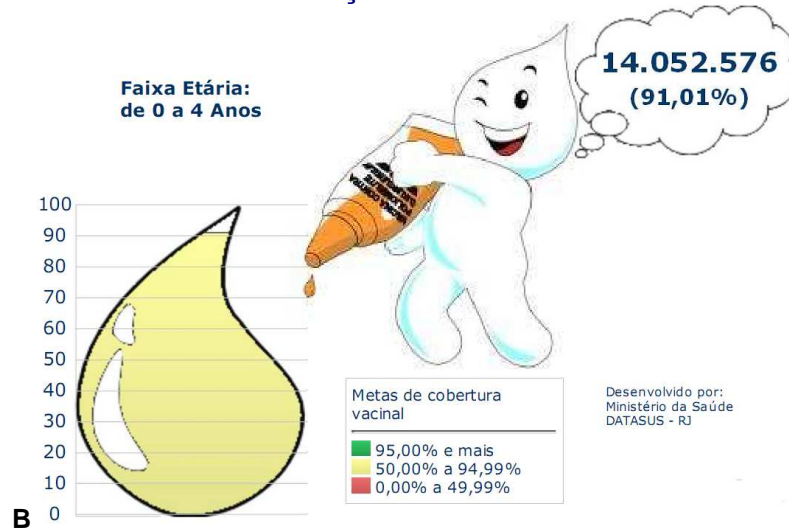
Criado em 1981, e incorporado à Fundação Oswaldo Cruz vindo do antigo Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) passou a centralizar, a partir de 1983, o controle da qualidade das vacinas utilizadas pelo PNI e o faz até os dias de hoje. A vigilância sanitária articula vários níveis de prevenção, enfatizando o desenvolvimento de um amplo espectro de ações que incluem questões relativas à melhoria de condições de vida e saúde para população. A vacinação constitui a melhor forma conhecida de prevenção de doenças infecto-contagiosas e a garantia da qualidade de vacinas comercializadas e administradas no país é uma questão que envolve diretamente a saúde pública (PONTE, 2003). No Brasil no ano de 2010 foram utilizadas nas duas etapas da campanha nacional contra a poliomielite aproximadamente 30.000.000 de doses da vacina oral contra a poliomielite, tendo uma cobertura vacinal acima de 90% em todo o país (Figura 7 A e B).

Figura 7 A e B – Quantitativo de doses e cobertura vacinal na campanha nacional de 2010

CAMPANHA NACIONAL DE VACINAÇÃO CONTRA PÓLIO – 1ª ETAPA - Gotômetro



CAMPANHA NACIONAL DE VACINAÇÃO CONTRA PÓLIO – 2ª ETAPA - Gotômetro



Fonte: Programa Nacional de Imunizações

Em 29 de setembro de 1994 o Brasil, por conta da diminuição do número de casos (figura 8), junto com os demais países da região das Américas, recebeu da Comissão Internacional para a Certificação da Ausência de Circulação Autóctone do Poliovírus Selvagem nas Américas, o Certificado que a doença e o vírus foram eliminados de nosso continente. Esse feito foi a conclusão de uma luta contra a doença que se estendeu por várias décadas, mobilizou mais de uma geração de profissionais da área da saúde em todo o país e a própria sociedade na forma de campanhas nacionais de vacinação. No INCQS é realizado o controle da qualidade de todas as vacinas que compõem o calendário de rotina formulado pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), como por exemplo, a tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola), febre amarela e poliomielite. Também é realizado o controle da qualidade de vacinas quando solicitadas pelo Ministério da Saúde e em caso de denúncias (PONTE, 2003).

1.6 ENSAIO DE POTÊNCIA

Requerimentos legais determinam que cada lote de vacina produzido seja avaliado para seu potencial de indução de imunidade protetora pós-administração.

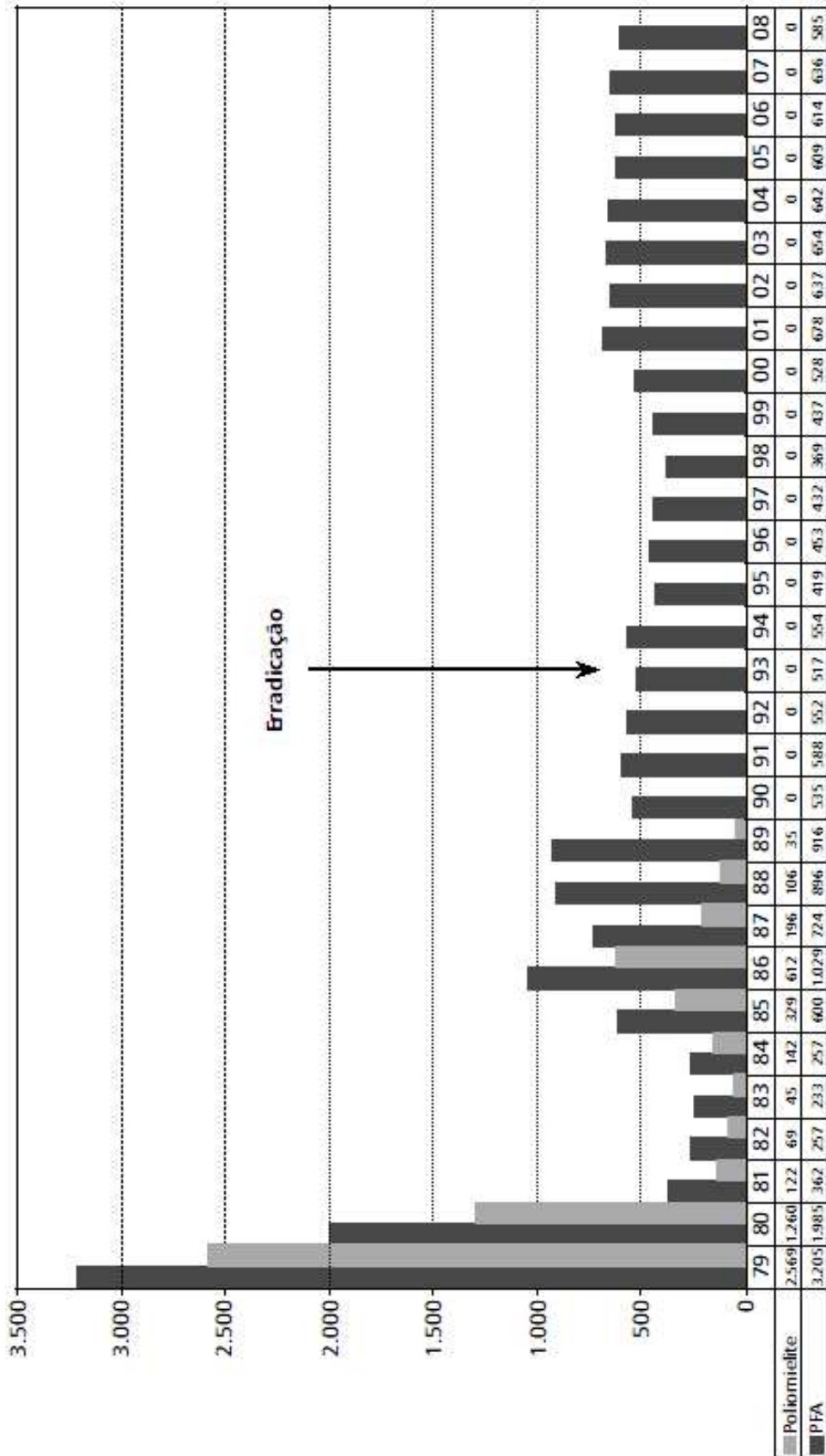
Existe uma fundamental diferença no planejamento de ensaios para vacinas com agentes viáveis ou inativados. Enquanto as vacinas inativadas normalmente são submetidas a testes de imunogenicidade, direta (desafio) ou indiretamente (sorologia), muitas vezes em animais, no caso da OPV, a eficácia de cada lote de vacina é relacionada ao número de partículas, determinado tanto pela contagem ou titulação, que é inteiramente avaliada *in vitro* (METZ et al., 2002).

No ensaio de potência da OPV, trivalente e atenuada, tanto o conteúdo de vírus total e sorotipos, separadamente, são determinados em um ensaio *in vitro*, utilizando células da linhagem Hep2C. As titulações individuais dos sorotipos, utilizando misturas de soros tipo-específicos, devem ser realizadas pelo fabricante e pelo Laboratório Nacional de Controle (LNC) para a liberação de lotes da vacina. Para cada ensaio de OPV deve-se incluir um frasco com uma preparação de referência de trabalho, cujo título tenha sido bem estabelecido, para controlar a precisão e a reprodutibilidade do sistema de ensaios (WHO, 2004).

Segundo a OMS, as vacinas de referência e teste devem apresentar variação máxima de título de $\pm 0,5 \text{ Log}_{10}$. O título esperado é baseado na média geométrica dos títulos de todos ensaios válidos da vacina de referência realizados anteriormente e os títulos encontrados para esta vacina devem estar dentro dos limites de confiança pré-estabelecidos para o teste (WHO, 1997)

O INCQS realiza o método de ensaio de potência seguindo a monografia 128 da Farmacopéia Brasileira (*Ph. Bras.*, 2003). Nos ensaios de potência de rotina geralmente são testadas paralelamente, diluições, em meio de cultura adequado, de 3 frascos de cada lote analisado e um frasco de vacina de referência de trabalho, sempre em duas replicatas cada em uma única corrida de ensaio. A vacina de referência de trabalho tem seu título médio padronizado previamente, através de ensaios realizados frente a uma vacina de referência internacional (National Institute of Biological Standards and Control – NIBSC – Reino Unido). O espectro das diluições deve ser de 10^{-1} a $10^{-6,5}$, o intervalo entre as diluições deve ser de, no mínimo $0,5 \text{ log}_{10}$, e os frascos devem ser diluídos separadamente em banho de gelo. Uma vez que a vacina oral contra a poliomielite é trivalente é necessário que as concentrações dos três tipos virais, presentes na vacina sejam mensurados de maneira individualizada e, também, na forma trivalente. Para determinação da potência de cada tipo de poliovírus, é realizada uma soroneutralização com uma mistura volume a volume de vacina e soro imune divalente.

Figura 8 – Número de casos confirmados de Poliomielite e notificados de paralisia flácida aguda. Brasil, 1979 a 2008.



Fonte: www.portal.saude.gov.br/portal/.../gve_7ed_web_atual_poliomielite.pdf

Os soros imunes divalentes são fornecidos pela OMS, de forma que para determinação da concentração do poliovírus tipo I presente na vacina utiliza-se um soro divalente contendo anticorpos contra polivírus II e III; para determinação da concentração do poliovírus tipo II utiliza-se um soro divalente contendo anticorpos contra polivírus I e III e para para determinação da concentração do poliovírus tipo III utiliza-se um soro divalente contendo anticorpos contra polivírus I e II. Para determinar a concentração de vírus total (trivalente) é adicionado um volume de meio de cultura igual ao volume de cada diluição (dobrando o volume). Esta mistura é incubada a 37 °C por aproximadamente 60 minutos. Após a incubação, 50 µL de cada diluição de cada um dos tipos virais são inoculados em 8 orifícios de uma microplaca contendo uma suspensão, com 100 µL da linhagem celular Hep2c, em uma concentração aproximada de 2×10^5 célula /mL. As microplacas são incubadas por sete dias a 35 °C e ao final deste período é observada e registrada a presença ou não de efeito citopático (ECP). O título expresso em logaritmo base 10 da Cell Culture Infectious Dose 50% (CCID₅₀) por dose da vacina de cada tipo de vírus deve ser calculado pelo método estimativo de Spearman & Karber e a potência mínima (BRASIL, 2003) como demonstra o quadro 1.

Quadro 1- Títulos mínimos de cada componente viral para aprovação da OPV

Componente viral	TRI	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Log₁₀ CCID50/dose	6,0	6,0	5,0	5,7

1.7 GARANTIA DA QUALIDADE

Um dos requerimentos das Boas Práticas de Fabricação correntes (BPFc) é que os fabricantes de produtos médicos, incluindo drogas e equipamentos, tenham um programa de garantia da qualidade. A garantia da qualidade é um sistema completo de abordagem para garantir a segurança e eficácia de produtos acabados. O controle da qualidade é normalmente considerado um item do sistema de garantia da qualidade. É o mais básico ou mais simples tipo de programa da qualidade. O controle da qualidade primariamente consiste de inspeções e ensaios como meio

inicial de detectar problemas e é apenas parte do sistema de Garantia da Qualidade. Este princípio tem como resultado o uso de preparações de referência, orientações sobre ensaios e os critérios de liberação para a segurança e eficácia (METZ et al., 2002).

1.8 IMPORTÂNCIA DAS PREPARAÇÕES DE REFERÊNCIA PARA LIBERAÇÃO DE LOTES

Materiais de referência foram desenvolvidos para aumentar a padronização de ensaios. Seu uso apropriado em testes independentes como parte da liberação de lotes é de importância crítica na interpretação de resultados. Este item tem um impacto particular na relevância de comparações entre resultados de ensaios de diferentes laboratórios (e.g. Produtor e Laboratório Nacional de Controle – LNC) e no processo de tomada de decisão (WHO, 2010).

A qualidade das vacinas não é somente assegurada por ensaios, mas também pela aplicação de um amplo sistema de garantia da qualidade que se estende por outros aspectos como a consistência de produção, os estudos clínicos e que passa também por fármaco-vigilância. A abordagem da consistência de produção para controle da qualidade e liberação de lotes de vacina de rotina é baseada no princípio que a qualidade das vacinas é consequência de um sistema da qualidade e de produção que prepara lotes com características semelhantes àqueles que mostraram segurança e eficácia em seres humanos (HENDRIKSEN, 2008).

1.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Sistemas de garantia da qualidade como as BPFc e, o adotado no INCQS, ISO/IEC 17025 (2005), requerem o uso de procedimentos analíticos propriamente validados. Embora métodos farmacopeicos não requeiram re-validação, para a liberação de lotes de produtos, certos procedimentos devem ser realizados para

garantir que os métodos são aplicáveis na sua utilização e pode ser necessário confirmar a precisão do método ou a sua confiabilidade em atingir os níveis de detecção do método validado (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006). Segundo a International Conference on Harmonization (ICH), é necessário demonstrar que o método é apropriado à finalidade de uso (ICH, 2005) e a ANVISA determina que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A ISO/IEC 17025 descreve validação de métodos como a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ISO/IEC 17025, 2005).

Validação é o processo pelo qual a confiabilidade, uma medida objetiva da reprodutibilidade intra e inter-laboratorial (BALLS et al., 1990), e a sua relevância são avaliadas com o objetivo de dar suporte a um uso específico (NIEHS, 1997; FRAZIER, 1990). Um método é considerado validado quando suas características de performance, vantagens e limitações foram adequadamente determinadas para um propósito específico (BALLS et al., 1990). Não há níveis de reprodutibilidade ótimos ou mínimos ou associados ao evento de interesse que deverão ser alcançados para uma validação de sucesso. Os níveis de confiabilidade e relevância necessários dependerão das condições sob as quais o teste será usado e o propósito ao qual seus resultados serão aplicados (ROBINSON, 2003).

Durante um estudo de validação, medidas são tomadas em múltiplas sessões de ensaios independentes (k) com replicatas de determinações (n) em cada sessão. É assumido que os erros aleatórios para os k -ésimas sessões de ensaios e as n -ésimas replicatas apresentam distribuição normal e independente com média zero e variâncias σ^2_I e σ^2_E , respectivamente. Estas variâncias σ^2_I e σ^2_E , correspondem à variabilidade intra ensaios e entre ensaios do método, respectivamente. A variabilidade total do ensaio é dada por $\sigma^2_T = \sigma^2_I + \sigma^2_E$. Isto normalmente é referido como modelo de efeito aleatório de fator único. Usando a análise de variância (ANOVA) para modelo de efeito aleatório de fator único balanceado (número constante de replicatas em todas as sessões), os quadrados médios intra e entre ensaios podem ser usados para obter estimativa da variância intra-ensaios, da variância entre-ensaios e da variância total (HOFFMAN & KRINGLE, 2007).

Na prática, o objetivo da validação é dar ao laboratório assim como às autoridades garantia, de que cada resultado que será obtido na rotina estará

suficientemente próximo ao valor “real” desconhecido da amostra (HUBERT et al., 2004).

A conformidade de um dado método com os objetivos de uso é normalmente avaliada em duas fases (SMITH & SITTAMPALAM, 1998). Primeiro uma fase de “pré-estudo” é conduzida para provar, com base em um desenho de experimento, que o método é capaz de apresentar resultados de qualidade. Então, em uma segunda fase, no uso de rotina, o laboratório deve verificar se o método analítico de interesse se mantém válido ao longo do tempo e que cada corrida prove medidas confiáveis (BOULANGER et al., 2007).

1.9.1 O problema dos ensaios biológicos

Ensaio biológico (também chamados bioensaios) são métodos para estimar a potência de uma droga ou material através da utilização da reação causada pela sua aplicação em unidades experimentais vivas (GOVINDARAJULU, 2001). São partes integrantes da avaliação da qualidade para produção e venda no mercado de vários produtos biológicos e alguns produtos não biológicos. Bioensaios normalmente usados para estimar a potência de drogas podem ser distinguidos de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas, ou complexos funcionais de receptores alvo). Devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos advindos da base biológica, eles tipicamente exibem uma maior variabilidade do que os testes baseados em química (USP, 2010).

1.9.2 Abordagem clássica da ICH

Na indústria farmacêutica, validações analíticas são realizadas de acordo com o guia da ICH (2005) que recomenda para ensaios de natureza quantitativa, que as

características mais relevantes a serem avaliadas no estudo de validação são a linearidade, a exatidão e a precisão. Entretanto, na introdução deste guia parte 2, é afirmado que devido à sua natureza complexa, procedimentos analíticos para produtos biológicos e biotecnológicos, em alguns casos, podem ser abordados diferentemente deste documento. Partindo desta premissa, uma comissão da “Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques” (SFSTP, 2005) desenvolveu um guia prático específico para a validação de ensaios biológicos aplicando a abordagem clássica da ICH (2005).

O objetivo de um bom método analítico é quantificar com certeza cada um dos valores desconhecidos em amostras analisadas. Ou seja, a diferença entre os resultados obtidos e o valor “verdadeiro” deve ser suficientemente pequena. Dois componentes podem influenciar esta diferença: a Exatidão (ou bias) do método e sua precisão. A bias demonstra quanto os resultados desviam “em média” ou sistematicamente de um valor verdadeiro e a precisão expressa como os resultados variam em torno do valor médio quando as medidas são repetidas. Um “bom” método analítico deveria, de uma forma ideal, dar resultados próximos de um valor verdadeiro da amostra, i.e. dentro de algum limite de aceitação. Esta “proximidade” está diretamente ligada ao tamanho da bias e da precisão do método (BOULANGER et al. 2007).

As definições destas duas características são:

1.9.2.1 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico expressa a proximidade de concordância entre o valor que é aceito, seja como um valor convencionalmente considerado verdadeiro ou como um valor de referência, e o valor encontrado. Isto às vezes é denominado “certeza” (ICH, 2005).

Geralmente a exatidão é expressa como bias percentual (ou erro %) ou seu inverso, o percentual de recuperação.

1.9.2.2 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas de múltiplas medições de uma mesma amostra sob as condições prescritas. Precisão pode ser considerada em três níveis: Repetitividade; Precisão Intermediária e Reprodutibilidade.

A precisão de um procedimento analítico, normalmente é expressa como a variância, o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medições (ICH, 2005).

Repetitividade ou precisão Intra-ensaios – Expressa a precisão sob as mesmas condições de operação em um curto período de tempo. Para ser avaliada, corridas do ensaio são feitas em condições de repetitividade, o que significa que “n” replicatas são testadas nas mesmas condições, na mesma amostra inicial, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, usando o mesmo equipamento, em um curto período de tempo.

Precisão Intermediária ou precisão inter-ensaios – Expressa variação dentro de um laboratório: entre dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes etc. (ICH, 2005). Para ser avaliada, “k” sessões de ensaios correspondem às condições para testar a precisão intermediária. Isto significa que os resultados de ensaio são obtidos usando uma amostra homogênea em diferentes dias e/ou por diferentes operadores e/ou com diferentes equipamentos no mesmo laboratório.

O objetivo final do estudo é obter uma imagem do procedimento que represente o mais precisamente possível sua variabilidade sob circunstâncias normais de uso. Para obter sucesso em determinar a variabilidade do procedimento analítico o produto $k \times n$ não pode ser menor do que 18 resultados (SFSTP, 2005).

Reprodutibilidade – Expressa a precisão entre diferentes laboratórios (estudos colaborativos normalmente aplicados à padronização de uma metodologia).

1.9.3 O Conceito do Erro Total

Como descrito acima, dentre as características descritas no guia da ICH (2005), duas são mais importantes para ensaios quantitativos: exatidão e precisão. Porém, a interpretação do guia ICH não é clara, uma vez que esta abordagem confunde a avaliação do erro sistemático, representada pelo critério de Certeza, com a avaliação do Erro Total representada pelo critério da Exatidão (GIBELIN et al., 2009). Inclusive, o guia ISO (ISO 5725, 1994) provê uma definição adequada para a determinação da exatidão de métodos quantitativos, definida como a soma da Certeza e da Precisão. Esta abordagem para validação e transferência de métodos analíticos, também chamada de “Conceito do Erro Total”, tem sido difundida pela comissão SFSTP, desde sua publicação inicial em 1997 (CHAPUZET et al., 1997), que já fez algumas modificações e recebeu propostas visando um processo contínuo de melhorias (HUBERT et al., 2004; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b; HUBERT et al., 2008).

Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes bias e precisão separadamente (Teste-t e Qui-quadrado em validação ou gráficos de controle na rotina), mas esta abordagem tem o inconveniente de valores muito pequenos de um dos componentes não compensar a falha do outro componente (BOULANGER et al., 2007).

Os critérios de aceitação para a validação de ensaios do FDA (USDHHS-FDA, 2001) preconizam que pelo menos 67% (4 em 6 resultados) de amostras de controle da qualidade devem estar entre 15% do seu valor nominal, 33% das amostras sob controle da qualidade (não todas as replicatas na mesma concentração) podem estar fora dos 15% de seu valor nominal, porém, em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Esta regra é conhecida como 4-6-15.

Ou seja, é adequado inferir que um método bioanalítico é apropriado a seu objetivo de uso se pelo menos 66,7% dos resultados observados (a longo prazo) estejam entre os 15% do valor real. Isto é uma simplificação, uma vez que as propriedades de uma amostragem pequena (i.e. de seis amostras sob controle da qualidade) estão sujeitas à variação aleatória e podem ser diferentes das propriedades do método em longo prazo (HOFFMAN. & KRINGLE, 2007).

O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura (HUBERT et al., 2004; ROZET et al., 2007a; HOFFMAN and KRINGLE, 2007; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b; ROZET et al., 2007b, ROZET et al., 2007c; VISWANATHAN et al., 2007). O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos quanto aleatórios. O conceito do erro total reflete quão largo o erro de medida pode ser e é facilmente entendido por analistas. Além disto, é uma medida compreensiva simples da performance do método, ao invés de uma avaliação da bias do método e da variabilidade individual.

O Conceito do Erro Total sugere uma abordagem global considerando um procedimento aceitável se a probabilidade de que a diferença entre cada medida de uma amostra e seu “valor verdadeiro” esteja dentro de limites de aceitação predefinidos pelo analista. O valor dos limites deve ser escolhido de acordo com o objetivo de uso dos resultados. O objetivo é ligado às normas utilizadas para o ensaio (e.g 1% ou 2% no granel; 5% em especialidades farmacêuticas, 15% em amostras biológicas, 30% para ensaios de ligação como Radio Imuno Ensaio e ELISA etc) (BOULANGER et al. 2007).

Os critérios de aceitação ideais deveriam garantir que uma alta proporção (e.g. $\beta\%$) das futuras observações esteja entre limites aceitáveis (e.g. 15 % do valor nominal), com um alto grau de confiança (e.g. $\gamma\%$). Visto desta maneira, intervalos bi-caudais de tolerância de conteúdo- β são a opção ideal.

Um Intervalo bi-caudal de tolerância de conteúdo- β provê limites inferiores (LI) e superiores (LS) de forma que podemos obter a proporção específica β de valores medidos em ensaios que residirá dentro do intervalo (I, S), com um coeficiente de confiança $\gamma\%$ especificado (WALD & WOLFOWITZ, 1946).

Para um método analítico, podemos definir características de performance que consistam da adequação do método para o objetivo de uso pela escolha de proporções β e limites de aceitação (A, B). Isto é, um método é adequado, para seu objetivo de uso, se pelo menos uma proporção β de valores medidos em ensaios se situarem dentro de limites de aceitação específicos (A, B). Intervalos bi-caudais de tolerância de conteúdo- β provêm uma abordagem para controle do risco de aceitar métodos que não preenchem estes requerimentos de performance.

A abordagem do Erro Total é tal como se segue:

- 1) Construir um Intervalo bi-caudal de tolerância de conteúdo- β (LI, LS) com o nível desejado de confiança γ (e.g. 90%);
- 2) Comparar o intervalo (LI, LS) com os limites de aceitação (A, B);
- 3) Se (LI, LS) residirem completamente entre (A, B), o método é aceito; em contrário, o método não é aceito.

A adoção da abordagem do Erro Total requer a escolha de apropriados níveis de conteúdo (β), nível de confiança (γ) e os limites de aceitação (A, B). Para ensaios bioanalíticos, HOFFMAN. & KRINGLE (2007) propõem 66,7% de conteúdo, 90% de confiança e $\pm 15\%$ de limites de aceitação. No entanto, segundo BOULANGER et al. (2007) e MAUMY et al. (2007) a proporção (β) de medidas que devem estar dentro dos limites de aceitação (A, B) deve ser pelo menos igual a 80% para garantir que pelo menos 90% das corridas sejam aceitas com a regra 4-6-(A, B).

1.9.3.1 Índice de capacidade (Cpk)

Os critérios de aceitação alvo da validação devem ser escolhidos para minimizar os riscos inerentes na tomada de decisões a partir de medidas de bioensaios e ser razoável em termos de capacidade. Quando existe uma especificação para um produto, critérios de aceitação podem ser justificados com base no risco de que aquela medida possa cair fora da especificação do produto. Um índice de capacidade (Cpk) pode ser usado para informar ligações entre a bias relativa e a precisão total do ensaio (USDHHS-FDA, 2001).

A escolha de uma ligação no Cpk é uma decisão gerencial e está relacionada ao risco de obter um resultado fora-de-especificação (OOS - do termo em inglês "Out-Of-Specification"). Alguns laboratórios requerem capacidade de processo correspondente a um Cpk de 1,33 ou maior. Isto corresponde aproximadamente a uma chance de um em 10.000 de que um lote com potência no centro da especificação apresente resultado OOS. A proporção de lotes que são previstos como OOS é uma função do Cpk (USDHHS-FDA, 2001).

No entanto, os produtos biológicos são substâncias complexas em termos de sua composição e origem. Os processos usados para obtê-los necessariamente

envolvem um organismo vivo do qual a variabilidade é potencialmente transmitida à substância obtida (SFSTP, 1996), assim, a caracterização de vacinas é mais difícil de que a caracterização de fármacos, devido à complexa estrutura molecular dos antígenos que elas contêm, seus processos de produção e sua interação com agentes usados durante a produção e/ou presentes no lote final, como conservantes e adjuvantes (HENDRIKSEN et al., 2008). Desta forma, a liberação de lotes destes imunobiológicos continuará mandatária (METZ et al., 2002).

1.9.4 Monitoramento de dados com gráficos de controle

O princípio de monitoramento, que é um item muito importante nos programas de garantia da qualidade, testa o quanto os dados podem ser considerados como provenientes de uma população. Caso positivo isto indicará que os processos de produção e de teste são consistentes. O monitoramento pode ser realizado pelo uso de gráficos de controle (HENDRIKSEN et al., 1998), tendo sua aplicação ao controle de qualidade de vacinas sido descrita há 60 anos por BATSON e colaboradores. (1951).

Um processo de medida está sob controle estatístico quando a exatidão e a precisão dos resultados são mantidas, produzindo resultados cuja média e desvio padrão são previsíveis quando aplicado repetidamente a um mesmo material, ao longo do tempo. Nessa situação, o processo metrológico está sujeito apenas a erros aleatórios, provenientes de pequenas e múltiplas causas comuns, inerentes ao sistema de medição (HIRATA, 2002).

Todos os dados quantitativos de resultados de controle da qualidade e especialmente do produtor ou outras fontes devem ser usadas para análise de tendência como uma parte essencial da liberação de lotes. Análise estatística deve ser realizada uma vez que suficientes dados tenham sido acumulados. Os limites de alerta ou de aviso e limites de controle para as tendências de consistência devem ser definidos em bases estatísticas. Geralmente, $\pm 2DP$ e $\pm 3DP$ da média são adotados para limites de alerta e de controle respectivamente, quando os dados apresentam distribuição normal. Cuidado, deve ser tomado, na interpretação destes

limites quando baseado em amostragem pequena. A análise de tendências de parâmetros-chave pode ser requerida pelos produtores ou pelo LNC do país produtor/controlador. Métodos de análise mais complexos e específicos de tendências podem ser utilizados quando dados e experiência suficientes estiverem disponíveis, particularmente quando os dados não apresentarem distribuição normal. Em adição, um conjunto de dados de um certo período (e.g. seis meses ou um ano) deve ser analisado estatisticamente comparado a um período anterior para detectar quaisquer diferenças significativas ou mudanças em tendências (HENDRIKSEN et al., 1998).

Gráficos de controle de parâmetros críticos dos materiais de referência devem também ser mantidos para monitorar a performance ao longo do tempo. Isto permite uma visão geral tanto da atividade das preparações de referência quanto do método. Por exemplo, pode demonstrar se há tendências ou mudanças nos atributos do material de referência, como inclinação, intercepto, *end point* 50%, o que pode indicar problemas com estabilidade do padrão de referência ou mudanças no sistema de ensaio, por exemplo, animais, células, reagentes críticos etc (WHO, 2010).

Análises de tendência dos resultados obtidos pelo LNC, incluindo o comportamento dos padrões de referência, assim como a comparação entre os resultados do produtor/LNC, devem ser realizadas. Quaisquer diferenças significativas devem ser documentadas (WHO, 2007; WHO, 2010).

Gráficos de controle de valores individuais são ferramentas estatísticas usadas para avaliar a tendência central de um processo ao longo do tempo. São às vezes chamados de “gráficos de médias móveis” devido ao modo como os limites são calculados. Devem ser usados quando não é possível utilizar médias de medidas múltiplas para controlar o processo (PYZDEK, 1998).

Um mínimo de 10 a 20 resultados deve estar disponível antes que um gráfico de controle de valores individuais seja estabelecido. Quando um novo método estiver sendo introduzido, estes resultados podem ser tomados do estudo de validação e usados para calcular limites fixos (por exemplo, dois desvios padrões). Outra abordagem pode ser uma adaptação contínua aos limites, baseado em todos resultados válidos ou em um conjunto dos resultados mais recentes de ensaio como a média móvel de, por exemplo, 30 ensaios consecutivos (HENDRIKSEN et al., 1998).

Atualmente, a qualidade de vacinas é crescentemente garantida pelo uso de processos de produção robustos e reprodutíveis. Agências reguladoras como FDA e *Ph. Eur.* - EDQM, publicam requerimentos e guias para garantir níveis de qualidade mínimos, porém elevados (CASTLE, 1996). Os LNC devem seguir ensaios e testes descritos nestes guias para a liberação de lotes ao consumo.

A proposta desta pesquisa é aplicar ferramentas de garantia da qualidade em ensaios de potência da vacina oral contra poliomielite e testar novas abordagens para validação de métodos analíticos, levando em conta a maior variabilidade de ensaios biológicos, com a finalidade de traçar o perfil deste ensaio.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar retrospectivamente o ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite utilizada no Brasil no período de 2008 a 2009.

2.2 ESPECÍFICOS

- I - Padronizar os títulos da vacina de referência de trabalho de OPV, lote 24-A, para avaliação da exatidão do ensaio;
- II - Validar retrospectivamente o ensaio de potência da OPV para cada um dos vírus componentes da vacina (tipo 1, 2 e 3 e trivalente) através da determinação da linearidade, exatidão e precisão do ensaio comparando a abordagem tradicional com a utilização do Conceito do Erro Total;
- III - Analisar tendências na diferença entre valores de potência obtidos no INCQS e nos declarados pelos produtores da vacina, no controle sistemático dos resultados da vacina de referência e determinar a reprodutibilidade do ensaio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TOTAL DE LOTES ANALISADOS

Em 2002, o INCQS realizou um estudo retrospectivo visando identificar dentre os produtos oriundos de fabricantes que seguem as BPF, as vacinas com registro na ANVISA que apresentavam consistência de produção (identificada pela ausência de reprovações por cinco anos consecutivos). A edição de uma portaria conjunta entre o INCQS, ANVISA e PNI (portaria INCQS N°031/2002) permitiu que o INCQS adotasse sistema de amostragem aleatória, a partir de 2003, para estes produtos. E.g. a vacina contra pólio deixou de ter análise laboratorial lote a lote passando a ser analisado um em cada quatro lotes recebidos (25%), no entanto todos os lotes continuaram a sofrer análise documental (quadro 2). Em alguns anos o número de lotes analisados é maior que 25%, isto se deve a entrada de novos produtores que não estavam incluídos nos critérios de aleatoriedade descritos na portaria.

Quadro 2 - Quantitativo de lotes de Vacina Oral Contra Poliomielite analisados no INCQS

ANO	QUANTIDADE		
	TOTAL	ANALISADOS	%
2007	92	70	76,09
2008	72	43	59,72
2009	82	64	78,05

3.2 ESTUDO RETROSPECTIVO DOS RESULTADOS DE ENSAIO DE POTÊNCIA

O estudo consistiu de uma revisão de dados de ensaios de rotina que foram realizados no Laboratório de Vacinas Virais - Departamento de Imunologia do INCQS. O laboratório adota como sistema de garantia da qualidade a Norma ABNT ISO/IEC 17025 (2005) e os ensaios usados no estudo atenderam aos critérios desta

norma assim como aos descritos na *Ph. Bras.* (2005) para aceitação de ensaios como válidos¹.

Foram realizadas duas modalidades de revisões de dados do ensaio de potência da OPV de acordo com os objetivos:

Objetivos I e II - Validação do ensaio

Os dados brutos de 17 ensaios de potência realizados no período de 2008 e 2009 que utilizaram a vacina de referência lote 24-A (quatro ensaios realizados no estudo de padronização do título do lote e 13 ensaios de rotina) foram recuperados dos livros de registro de ensaios. O recálculo dos resultados, originalmente calculados manualmente pelo método de Spearman & Karber, foi realizado pelo método de probitos utilizando o software CombiStats (EDQM, 2004) para obtenção da $CCID_{50}/dose$ em logaritmo base 10 ($\log_{10} CCID_{50}$), ativando a opção de transformação retangular em combinação com uma inclinação fixa de $1/(\logaritmo\ natural\ do\ fator\ de\ diluição)$ e uma variância teórica de 1, visando reproduzir uma estimativa de Spearman & Karber com limites de confiança (CombiStats, 2004) uma vez que a OMS recomenda este método estatístico para os cálculos da potência de OPV (WHO, 2004).

3.3 ESTUDO DE VALIDAÇÃO

3.3.1 Análise Estatística

Os valores de $\log_{10} CCID_{50}/dose$ foram calculados pelo método de probitos simulando resultados de Spearman & Karber utilizando o software CombiStats (EDQM, 2004). A homogeneidade das variâncias foi determinada usando o teste de Cochran. Para determinação da exatidão, foi avaliado se houve diferença

¹ Uma vez que esta similaridade de termos freqüentemente gera confusões, cabe ressaltar que o termo ensaio válido se refere aqui aos critérios de aceitação de ensaios, não tendo relação com a validação de ensaios propriamente dita.

estatisticamente significativa entre a média dos resultados de ensaios e o valor esperado utilizando o teste-*t* de Student, sendo também calculada a bias%. O grau de significância estatística entre as diferenças observadas entre os resultados, entre as replicatas (*n*) e sessões de ensaios (*k*), foi testada pela ANOVA fator único e o intervalo de confiança da precisão total foi calculado e comparado ao intervalo esperado de $\pm 0,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{dose}$. Foi ainda empregada a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações da SFSTP (HUBERT et al., 2004; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b; HUBERT et al., 2008) como descrito por HOFFMAN & KRINGLE (2007) e BOULANGER et al. (2003).

3.3.2 Análise de Variância

A análise de variância de fator único compara as médias de diferentes populações supostamente normais e de mesma variância (previamente demonstrada pelo teste de Cochran), a partir de amostras aleatórias, simples e independentes.

A análise de variância fator único permitiu calcular:

- Os quadrados médios(QM) intra e entre ensaios usados para obter estimativas das variâncias intra-ensaios, entre-ensaios e total para determinar a repetitividade, a precisão intermediária e a precisão total respectivamente;
- A significância estatística da variância entre grupos (*n* e *k*).

Os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade foi inferior a 5% ($p < 0,05$ intervalo de confiança de 95% na tabela de Fisher-Snedecor).

3.3.3 Coeficiente de variação geométrico (gCV%)

O coeficiente de variação geométrico (gCV%) como recomendado pela ICH (2005), foi calculado como descrito em USP (US, 2010), o coeficiente de variação geométrico (gCV%) foi utilizado para valores logarítmicos utilizando a Equação 1.

Equação 1:

$$gCV\% = 100. \left(10^{\sqrt{\sigma^2}} - 1 \right)$$

Foram calculadas o gCV% para determinação da repetitividade (variação intra grupos), precisão intermediária, a combinação das variâncias intra e inter ensaios para avaliar a precisão total e seu Intervalo de confiança utilizando as Equações 2 e 3.

Equação 2:

$$Precisão\ Total = 100. \left(10^{\sqrt{\sigma_{Entre}^2 + \sigma_{Intra}^2}} - 1 \right)$$

Equação 3:

$$IC_{PT} = \bar{x} \pm t_{gl} \cdot \frac{dp}{\sqrt{n}}$$

3.4 OBJETIVO I – PADRONIZAÇÃO DO TÍTULO DA VACINA DE REFERÊNCIA LOTE 24-A

Para que fosse possível o cálculo da exatidão foi realizada a padronização do título da vacina de referência lote 24-A em \log_{10} CCID₅₀/dose. Embora os títulos da vacina não sejam expressos como potência relativa, a vacina foi testada frente ao padrão internacional do NIBSC, para cada tipo viral, em 5 replicatas (n=5) em 4 sessões (k=4), obtendo-se um total de 20 resultados para cada tipo viral, os resultados em \log_{10} CCID₅₀ obtidos para cada tipo viral nos diferentes ensaios foram combinados para obtenção de uma média ponderada considerada o título padronizado, após a avaliação da homogeneidade dos resultados pelo teste de Cochran para possível existência de valores aberrantes. Os valores aberrantes, caso existissem, teriam sido excluídos dos cálculos finais de título, porém, não observamos nenhum.

3.5 OBJETIVO II - VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE POTÊNCIA

Foram adotadas duas abordagens para a validação do ensaio: a abordagem Clássica ICH (2005) aplicada aos ensaios biológicos de acordo com as recomendações descritas pela comissão da SFSTP (2005) e a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações da SFSTP (HUBERT et al., 2004; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b HUBERT at al., 2008) como descrito por HOFFMAN & KRINGLE (2007) e BOULANGER et al. (2003).

Além dos critérios de aceitação gerais requeridos pelo sistema ISO/IEC 17025 como verificação/calibração de equipamentos relevantes e treinamento de analistas, outros critérios de aceitação foram definidos para cada característica validada para cada uma das abordagens adotadas. As características avaliadas foram:

3.5.1 Exatidão

Para avaliar a exatidão, inicialmente foi estabelecido o título em \log_{10} CCID₅₀/dose do lote de vacina de referência 24-A para cada componente viral. As médias ponderadas obtidas para cada componente viral, no estudo de estabelecimento da referência 24-A (item 3.4), foram usadas como valores esperados para o ensaio. A bias % (diferença percentual entre a média dos títulos observados expressa em \log_{10} CCID₅₀/dose e o título esperado expresso em \log_{10} CCID₅₀/dose) foi calculada para cada componente viral da vacina e o teste-t de Student foi usado para comparar as médias. A bias percentual foi calculada como descrito em USP (2010), usando a Equação 4.

Equação 4:

$$Bias\% = 100 \cdot \left(\frac{Potência\ Medida}{Potência\ Teórica} - 1 \right)$$

Os Critérios de aceitação da exatidão foram: a) para abordagem clássica ICH (2005), a bias não poderia ser estatisticamente significativa no teste-t de Student, $p = 0,05$ (SFSTP, 2005) e b) para a abordagem do Conceito do Erro Total, foi construído um Intervalo bi-caudal de tolerância de conteúdo- β (LI, LS) com o nível desejado de confiança $\gamma = 95\%$; O intervalo (LI, LS) foi comparado com os limites de aceitação (A, B). Se (LI, LS) residiram completamente entre os limites (A, B) adotados de $\pm 20\%$, o método foi aceito; de outra forma, o método não foi aceito.

3.5.2 Precisão

A precisão foi avaliada com os resultados de potência em \log_{10} CCID₅₀/dose, obtidos em 13 sessões de ensaios de rotina ($k = 13$) com duas replicatas por ensaio ($n = 2$) utilizando a vacina de referência lote 24-A. Os resultados foram submetidos ao teste de Cochran para avaliar se havia diferença significativa entre as variâncias e a seguir submetidos à análise de variância fator único e os QM intra e entre ensaios foram usados para obter estimativas das variâncias intra-ensaios (σ^2_I), entre-ensaios (σ^2_E) e total para determinar a repetitividade, a precisão intermediária e a precisão total. A análise de variância fator único serviu ainda para verificar se houve diferença significativa entre os resultados obtidos entre as replicatas (n) e as sessões de ensaio (k) e o Intervalo de confiança de 95% da precisão total foi calculado, como recomendado pela SFSTP (2005), com duas replicatas ($n=2$) em uma repetição de ensaio ($k=1$), as mesmas condições de uso em rotina, utilizando a Equação 5:

Equação 5:

$$IC_{PT} = Média \pm t_{(\alpha; \rho)} \cdot \sqrt{\frac{\sigma_{Entre}^2}{k} + \frac{\sigma_{Intra}^2}{k \cdot n}}$$

Os critérios de aceitação para a precisão foram definidos como sendo: Na abordagem clássica ICH, o limite de 95% de confiança para precisão total não poderia ser maior que $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, como preconizado para titulação de

suspensões virais (ICH Q5A, 1999; EMEA, 1996) e, na abordagem do Conceito do Erro Total, foi o mesmo critério utilizado na avaliação da Exatidão (item 3.5.1).

3.5.3 Regra 4-6-20%

Foi avaliada a proporção de resultados de potência obtidos no estudo de validação pela vacina de referência 24-A, para cada componente viral, que se apresentasse fora do intervalo esperado para exatidão de $\pm 20\%$ para (A, B) visando determinar se o ensaio obedece à regra 4-6-20%, como preconizado pelo FDA (USDHHS-FDA, 2001).

3.5.4 Cpk

O Cpk foi calculado com os resultados obtidos pela vacina de referência 24-A no estudo de validação para cada componente viral utilizando a equação 6.

Equação 6:

$$Cpk = \min \left[\frac{\bar{X} - LI}{3 \cdot \sigma}, \frac{LS - \bar{X}}{3 \cdot \sigma} \right]$$

Um Cpk de 1,33 ou maior foi adotado como satisfatório indicando uma chance de 1/10.000 de que um lote com potência satisfatória seja reprovado por obter um resultado OOS (USDHHS-FDA, 2001).

3.6 OBJETIVO III – ANÁLISE DE TENDÊNCIA DA DIFERENÇA ENTRE RESULTADOS E DETERMINAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DO ENSAIO.

Utilizar o gráfico de controle (GC) de valores individuais (ou de valores únicos). O gráfico de valores individuais deve ser acompanhado pelo de amplitudes móveis. O GC de amplitudes móveis monitora a variação entre sub-grupos consecutivos ao longo do tempo, embora tenha sido realizado e avaliado, não será demonstrado no presente trabalho.

3.6.1 Análise de tendência da diferença entre resultados

A análise de tendência das diferenças absolutas de resultados, em \log_{10} CDID₅₀/dose, de ensaios de potência realizados em 2008 em 39 lotes de OPV foi realizada utilizando gráficos de controle no software SPC Explorer RT® (Quality America Inc.; EUA), os gráficos foram configurados com os critérios descritos na tabela 1. Os limites foram calculados com base nos primeiros 30 resultados como recomendado por HENDRIKSEN et al. (1998) com o objetivo de melhorar a distribuição normal da amostra. Os gráficos foram avaliados de acordo com os limites de alerta, limites de confiança e testes de corrida como descritos na tabela 1 e interpretados como descrito na tabela 2.

3.6.2 Determinação da reprodutibilidade do ensaio

Uma vez que não foi realizado um estudo colaborativo convencional onde as mesmas amostras seriam analisadas em uma matriz de ensaios, nos dois laboratórios, como uma etapa adicional na validação do método, foi adotada uma abordagem prática na avaliação da reprodutibilidade, que foi a determinação da variação média entre os resultados dos dois laboratórios para diferentes amostras testadas. Isto foi realizado através da utilização da média das variâncias entre os

resultados obtidos no INCQS e pelo produtor para o cálculo do coeficiente de variação geométrico.

O mesmo critério de aceitação de 20% de variação máxima entre os resultados dos dois laboratórios foi usado, como na avaliação da precisão no conceito do Erro Total.

3.6.3 Controle sistemático das vacinas de referência empregadas nos ensaios

Os resultados obtidos pelo INCQS para a potência da vacina de referência lote 24-A para cada componente viral em \log_{10} CCID₅₀/dose no estudo de validação de 17 sessões de ensaios foram inseridos em um gráfico de controle para a avaliação sistemática deste lote de referência. Os gráficos foram avaliados de acordo com os limites de alerta, limites de confiança e testes de corrida como descritos na tabela 1 e interpretados como descrito na tabela 2.

Tabela 1 – Critérios adotados para configuração dos gráficos de controle calculados sobre os 30 primeiros resultados

Parametros	Critérios
Limites de Alerta	97,5% = 2xDP
Limites de Controle	99,9% = 3xDP
Testes de Corrida	a) 1 ponto além dos limites de 3xDP (99,9%); b) 9 pontos consecutivos no mesmo lado da linha média; c) 6 pontos consecutivos aumentando ou diminuindo em relação à média; d) 2 entre 3 pontos além de 2xDP (97,5%).

Tabela 2 – Interpretação dos gráficos de controle

Crítérios	1 ponto além de 3xDP (99,9%)	9 pontos consecutivos no mesmo lado da linha média	6 pontos consecutivos aumentando ou diminuindo	2 entre 3 pontos além de 2xDP (97,5%)
Interpretação	A média do processo se alterou	A média do processo se alterou	A média do processo se alterou (tendência)	A média do processo se alterou
Ações	Ensaio inválido Novo teste	Aumentar supervisão	Aumentar supervisão	Aumentar supervisão
GC de valores individuais-X	Se aplica	Se aplica	Se aplica	Se aplica
GC amplitudes móveis	Se aplica	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica

Fonte: adaptada do POP INCQS 65.3400.002

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DE PADRONIZAÇÃO DO TÍTULO DA VACINA DE REFERÊNCIA LOTE 24-A

4.1.1 Componente Trivalente

A tabela 3 apresenta os dados brutos obtidos para o componente Trivalente. Os dados foram considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$ ($C_{\text{calc}} = 0,4638 < C_{\text{tab}} = 0,6287$) e a análise de variância demonstrou que não houve variação significativa entre as replicatas (n) e dentre as sessões (k) de ensaios, $F = 0,30$ e $p = 0,826$ ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados puderam ser combinados para obtenção da média ponderada como descrito na *Ph. Eur.* (COUNCIL OF EUROPE, 2008) utilizando o software de cálculos estatísticos CombiStats (EDQM, 2004).

Tabela 3 – Dados brutos obtidos nos ensaios de estabelecimento da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para o componente Trivalente

TRI Replicatas (n)	Sessões (k)			
	1	2	3	4
1	6,89	6,96	6,96	6,89
2	6,96	6,89	6,95	6,90
3	6,90	6,89	7,02	6,84
4	6,77	6,96	6,89	6,96
5	6,90	6,90	6,90	6,89
Média (log ₁₀ CCID ₅₀ /dose)	6,89	6,92	6,94	6,90
DP	0,0702	0,0359	0,0510	0,0426

DP – desvio padrão
CCID₅₀ – cell culture Infectious dose 50%

A tabela 7 demonstra os resultados da análise estatística dos resultados. A média obtida para o título foi 6,91 Log₁₀ CCID₅₀/dose, o desvio padrão geral foi 0,0527 e a precisão geral para o ensaio deste componente foi 11,30% (19 gl).

4.1.2 Componente Tipo I

A tabela 4 apresenta os dados brutos obtidos para o componente Tipo I. Os dados foram considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$ ($C_{\text{calc}} = 0,5086 < C_{\text{tab}} = 0,6287$) e a análise de variância demonstrou que não houve variação significativa entre replicatas (n) e dentre as sessões (k) de ensaios, $F = 0,10$ e $p = 0,9599$ ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados puderam ser combinados para obtenção da média ponderada como descrito na *Ph. Eur.* (COUNCIL OF EUROPE, 2008) utilizando o software de cálculos estatísticos CombiStats (EDQM, 2004).

Tabela 4 – Dados brutos obtidos nos ensaios de estabelecimento da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para o componente Tipo I

TIPO I Replicatas (n)	Sessões (k)			
	1	2	3	4
1	6,97	7,03	6,97	6,90
2	7,03	6,97	6,97	6,97
3	7,03	6,97	6,90	6,84
4	6,90	6,90	6,90	6,90
5	6,84	6,90	6,90	6,90
Média (log ₁₀ CCID ₅₀ /dose)	6,95	6,95	6,93	6,90
DP	0,0835	0,0549	0,0389	0,0470

DP – desvio padrão

CCID₅₀ – cell culture Infectious dose 50%

A tabela 7 demonstra a análise estatística dos resultados, onde a média obtida para o título foi 6,93 Log₁₀ CCID₅₀/dose, o desvio padrão geral foi 0,0581 e a precisão geral para o ensaio deste componente foi 11,46% (19 gl).

4.1.3 Componente Tipo II

A tabela 5 apresenta os dados brutos obtidos para o componente Tipo II. Os dados foram considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$ ($C_{\text{calc}}=0,3385 < C_{\text{tab}} = 0,6287$) e a análise de variância demonstrou que não houve variação significativa entre replicatas (n) e dentre as sessões (k) de ensaios, $F = 0,63$ e $p = 0,608531$ ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados puderam ser combinados

para obtenção da média ponderada como descrito na *Ph. Eur.* (COUNCIL OF EUROPE, 2008) utilizando o software de cálculos estatísticos CombiStats (EDQM, 2004).

Tabela 5 – Dados brutos obtidos nos ensaios de estabelecimento da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para o componente Tipo II

TIPO II Replicatas (n)	Sessões (k)			
	1	2	3	4
1	5,84	5,90	5,97	5,95
2	6,03	5,90	6,03	5,90
3	6,03	6,03	5,90	5,97
4	5,97	5,97	5,84	6,03
5	5,97	5,90	5,97	6,03
Média (log ₁₀ CCID ₅₀ /dose)	5,97	5,94	5,94	5,98
DP	0,0779	0,0586	0,0738	0,0548

DP – desvio padrão
CCID₅₀ – cell culture Infectious dose 50%

A tabela 7 demonstra a análise estatística dos resultados, onde a média obtida para o título foi 5,96 Log₁₀ CCID₅₀/dose, o desvio padrão geral foi 0,0636 e a precisão geral para o ensaio deste componente foi 11,78% (19 gl).

4.1.4 Componente Tipo III

A tabela 6 apresenta os dados brutos obtidos para o componente Tipo III. Os dados foram considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$ ($C_{\text{calc}}=0,3877 < C_{\text{tab}} = 0,6287$) e a análise de variância demonstrou que não houve variação significativa entre replicatas (n) e dentre as sessões (k) de ensaios, $F = 0,25$ e $p = 0,858024$ ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados puderam ser combinados para obtenção da média ponderada como descrito na *Ph. Eur.* (COUNCIL OF EUROPE, 2008) utilizando o software de cálculos estatísticos CombiStats (EDQM, 2004).

Tabela 6 – Dados brutos obtidos nos ensaios de estabelecimento da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para o componente Tipo III

TIPO III Replicatas (n)	Sessões (k)			
	1	2	3	4
1	6,58	6,60	6,53	6,51
2	6,58	6,69	6,57	6,58
3	6,53	6,57	6,60	6,47
4	6,57	6,53	6,47	6,63
5	6,60	6,69	6,60	6,60
Média (log ₁₀ CCID ₅₀ /dose)	6,57	6,62	6,55	6,56
DP	0,0256	0,0725	0,0568	0,0665

DP – desvio padrão

CCID₅₀ – cell culture Infectious dose 50%

A tabela 7 demonstra a análise estatística dos resultados, onde a média obtida para o título foi 6,58, log₁₀ CCID₅₀/dose o desvio padrão geral foi 0,0594 e a precisão geral para o ensaio deste componente foi 11,47% (19 gl).

Tabela 7 – Análise estatística dos resultados

Componente viral	TRI	TIPO I	TIPO II	TIPO III
Média geral (log ₁₀ CCID ₅₀ /dose)	6,91	6,93	5,96	6,58
DP geral	0,0527	0,0581	0,0636	0,0594
CV% Intra (3 gl)	11,26%	11,44%	11,67%	11,43%
CV% entre (16 gl)	10,29%	10,19%	10,56%	10,31%
Precisão Total (19 gl)	11,30%	11,46%	11,78%	11,47%

DP – desvio padrão

gl – graus de liberdade

CV – coeficiente de variação

CCID₅₀ – cell culture Infectious dose 50%

4.2 ESTUDO DE VALIDAÇÃO

4.2.1 Validação pela abordagem clássica ICH

4.2.1.1 Exatidão

A tabela 8 apresenta os resultados da avaliação da exatidão do método para os quatro componentes virais. Foi realizada uma comparação direta entre a média dos títulos em log₁₀ CCID₅₀/dose obtida para cada componente viral da vacina de

referência 24-A com o título esperado para cada componente, determinado durante o estudo de padronização daquela vacina de referência. O teste-t de Student foi aplicado para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p=0,05$, $gl=25$).

Tabela 8 - Avaliação da exatidão – Biais percentual e Teste-t de Student bi-caudal

	Tri	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Bias %	0,002	0,201	0,068	0,225
n	26	26	26	26
dp	0,0695	0,0527	0,0501	0,0536
Média	6,91	6,94	5,96	6,67
Título esp.	6,91	6,93	5,96	6,66
T_{Calc}	0,01	1,35	0,41	1,43
gl	25	25	25	25
Conclusão	Exato	Exato	Exato	Exato

T_{crítico} = -2,06 a 2,06; $p = 0,05$; $t = 0,975$.

dp = desvio padrão

gl = graus de liberdade

T_{calc} = T calculado

4.2.1.2 Precisão

4.2.1.2.-1 Componente Trivalente

A tabela 9 apresenta os dados brutos obtidos para o componente Trivalente no estudo de validação. Os dados foram considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$ ($C_{calc} = 0,2330 < C_{tab} = 0,7880$) o que permitiu a realização da análise de variância demonstrado na tabela 10, que mostrou que não houve variação significativa entre as replicatas (n) e dentre as sessões (k) de ensaios, $F = 0,44$ e $p = 0,9190$ ($p > 0,05$).

Tabela 9 - Dados brutos obtidos para o componente Trivalente

TRI	Sessões (k)												
Replicatas (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	6,89	6,83	6,89	6,89	6,89	6,84	6,96	6,96	6,96	6,89	6,77	6,84	6,77
2	7,02	6,96	6,95	6,96	6,83	6,89	6,89	6,96	7,02	6,89	6,96	7,02	6,95
Média	6,95	6,90	6,92	6,93	6,86	6,87	6,92	6,96	6,99	6,89	6,87	6,93	6,86
DP	0,09	0,09	0,04	0,05	0,04	0,04	0,05	0,00	0,04	0,00	0,14	0,12	0,13

DP – desvio padrão

Tabela 10 – Análise de variância para o componente trivalente

Fonte de Variação Tri	SQ	GL	QM	F	p
Entre grupos	-0,0415222	12	0,002661	0,44	0,9191
Intra grupos	0,079160	13	0,006089		
Total	0,120682	25			

Assim, usando os dados da precisão, foram calculadas a repetibilidade (CV% intra) e precisão intermediária (CV% entre) que puderam ser combinadas para obtenção da precisão total e um intervalo de confiança de 95%, foi construído com base no número de sessões (k) e de replicatas (n) por sessão, para o desenho de ensaio de rotina com uma sessão (n) e duas replicatas (n) e comparado com o intervalo esperado de $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose como recomendado em ICH Q5A. O intervalo de confiança calculado para $n=2$ e $k=1$ foi 6,72 - 7,10 \log_{10} CCID₅₀/dose (ou seja $\pm 0,19 \log_{10}$ CCID₅₀/dose) como observado na tabela 11.

Tabela 11 – Componente Trivalente - Intervalo de confiança de 95% - Aceitação para o título esperado de 6,91 \log_{10} CCID₅₀/dose ($\pm 0,5 \log = 6,41$ a 7,41)

IC95% (0,975; gl=25); t = 2,1	Sessões (k)	
	Replicatas (n)	
	k = 1	k = 2
n = 1	6,69 - 7,13	6,75 - 7,07
n = 2	6,72 - 7,10	6,78 - 7,04

IC – Intervalo de confiança

A análise estatística dos resultados mostra que a média obtida para o título foi 6,91 \log_{10} CCID₅₀/dose, o desvio padrão geral foi 0,07, a repetibilidade foi 11,97%

(12 gl), a precisão intermediária foi 11,82% (13 gl) e a precisão total foi 12,78% (25 gl) como observado na tabela 21.

4.2.1.2 - 2 Componente Tipo I

A tabela 12 apresenta os dados brutos obtidos para o componente Tipo I no estudo de validação. Os dados foram considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$ ($C_{calc} = 0,2679 < C_{tab} = 0,7880$) o que permitiu a realização da análise de variância demonstrado na tabela 13, que mostrou que não houve variação significativa entre as replicatas (n) e dentre as sessões (k) de ensaios, $F = 0,07$ e $p = 0,9999$ ($p > 0,05$).

Tabela 12 – Dados brutos obtidos para o componente Tipo I

TIPO I		Sessões (k)												
Replicatas (n)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		6,97	6,90	7,03	6,90	7,03	6,97	6,90	6,90	6,97	6,95	6,97	6,90	6,90
2		6,97	6,97	6,90	6,90	6,97	6,97	6,90	6,90	6,84	6,90	7,03	6,95	7,03
Média		6,97	6,94	6,96	6,90	7,00	6,97	6,90	6,90	6,91	6,93	7,00	6,93	6,96
DP		0,00	0,05	0,09	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,10	0,04	0,04	0,04	0,09

DP – desvio padrão

Tabela 13 – Análise de variância para o componente tipo I

Fonte de Variação TIPO I	SQ	GL	QM	F	p
Entre grupos	-0,0345888	12	0,000198	0,07	0,9999
Intra grupos	0,034899	13	0,002685		
Total	0,069488	25			

Assim, usando os dados da precisão foram calculadas a repetibilidade (CV% intra) e precisão intermediária (CV% entre) que puderam ser combinadas para obtenção da precisão total e um intervalo de confiança de 95% foi construído com base no número de sessões (k) e de replicatas (n) por sessão, para o desenho de ensaio de rotina com uma sessão (n) e duas replicatas (n). O intervalo de confiança

(n=2 e k=1) foi 6,84 - 7,02 \log_{10} CCID₅₀/dose (ou seja $\pm 0,09 \log_{10}$ CCID₅₀/dose) como observado na tabela 14.

Tabela 14 – Componente Tipo I - Intervalo de confiança de 95% - Aceitação para o título esperado de 6,93 \log_{10} CCID₅₀/dose ($\pm 0,5 \log = 6,43$ a 7,43)

IC95% (0,975; gl=25); t = 2,1	Sessões (k)	
	Replicatas (n)	
		k = 1
		k = 2
n = 1		6,82 - 7,04
n = 2		6,87 - 6,99

IC – Intervalo de confiança

A análise estatística dos resultados mostra que a média obtida para o título foi 6,94 \log_{10} CCID₅₀/dose, o desvio padrão geral foi 0,09, a repetibilidade foi 11,27% (12 gl), a precisão intermediária foi 10,47% (13 gl) e a precisão total foi 11,36% (25 gl) como observado na tabela 21.

4.2.1.2 - 3 - Componente Tipo II

A tabela 15 apresenta os dados brutos obtidos para o componente Tipo II no estudo de validação. Os dados foram considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$ ($C_{calc} = 0,3633 < C_{tab} = 0,7880$) o que permitiu a realização da análise de variância demonstrado na tabela 16, que mostrou, que não houve variação significativa entre as replicatas (n) e dentre as sessões (k) de ensaios, $F = 0,87$ e $p = 0,5883$ ($p > 0,05$).

Tabela 15 - Dados brutos obtidos para o componente Tipo II

TIPO II	Sessões (k)													
	Replicatas (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		6,03	5,97	5,97	5,97	5,90	5,90	5,90	5,97	6,03	5,97	5,97	5,97	5,97
2		6,01	6,03	6,03	5,90	5,89	5,97	5,90	5,97	5,90	6,03	5,95	6,03	5,90
Média		6,02	6,00	6,00	5,94	5,90	5,94	5,90	5,97	5,96	6,00	5,96	6,00	5,94
DP		0,01	0,04	0,04	0,05	0,00	0,05	0,00	0,00	0,09	0,04	0,01	0,04	0,05

DP – desvio padrão

Tabela 16 – Análise de variância para o componente tipo II

Fonte de Variação Tipo II	SQ	GL	QM	F	p
Entre grupos	-0,0396840	12	0,001546	0,87	0,5884
Intra grupos	0,022967	13	0,001767		
Total	0,062651	25			

Assim, usando os dados da precisão foram calculadas a repetibilidade (CV% intra) e precisão intermediária (CV% entre) que puderam ser combinadas para obtenção da precisão total e um intervalo de confiança de 95% foi construído com base no número de sessões (k) e de replicatas (n) por sessão, para o desenho de ensaio de rotina com uma sessão (n) e duas replicatas (n). O intervalo de confiança de 95% (n=2 e k=1) foi 5,83 - 6,09 \log_{10} CCID₅₀/dose (ou seja $\pm 0,13 \log_{10}$ CCID₅₀/dose), como observado na tabela 17.

Tabela 17 – Componente Tipo II - Intervalo de confiança de 95% - Aceitação para o título esperado de 5,96 \log_{10} CCID₅₀/dose ($\pm 0,5 \log = 5,46$ a 6,46)

IC95% (0,975; gl=25); t = 2,1	Sessões (k)	
	Replicatas (n)	
		k = 1
		k = 2
n = 1	5,82 - 6,10	5,86 - 6,06
n = 2	5,83 - 6,09	5,87 - 6,05

IC – Intervalo de confiança

A análise estatística dos resultados, mostra que a média obtida para o título foi 5,96 \log_{10} CCID₅₀/dose, o desvio padrão geral foi 0,09, a repetibilidade foi 11,27% (12 gl), a precisão intermediária foi 10,47% (13 gl) e a precisão total foi 11,36% (25 gl). O intervalo de confiança de 95% (n=2 e k=1) foi 5,83 - 6,09 \log_{10} CCID₅₀/dose (ou seja $\pm 0,13 \log_{10}$ CCID₅₀/dose) como observado na tabela 21.

4.2.1.2 - 4 Componente Tipo III

A tabela 18 apresenta os dados brutos obtidos para o componente Tipo III no estudo de validação. Os dados foram considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$ ($C_{calc} = 0,3633 < C_{tab} = 0,7880$) o que permitiu a realização da análise de variância, demonstrado na tabela 19, que mostrou, que não houve variação significativa entre as replicatas (n) e dentre as sessões (k) de ensaios, $F = 0,87$ e $p = 0,5883$ ($p > 0,05$).

Tabela 18 - Dados brutos obtidos para o componente Tipo III

TIPO III	Sessões (k)												
Replicatas (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	6,65	6,69	6,76	6,70	6,64	6,63	6,65	6,64	6,69	6,70	6,51	6,70	6,65
2	6,65	6,70	6,63	6,63	6,65	6,69	6,69	6,69	6,76	6,76	6,65	6,76	6,69
Média	6,65	6,70	6,69	6,66	6,64	6,66	6,67	6,67	6,72	6,73	6,58	6,73	6,67
DP	0,00	0,01	0,09	0,05	0,01	0,05	0,03	0,04	0,04	0,04	0,10	0,04	0,03

DP - desvio padrão

Tabela 19 – Análise de variância para o componente Tipo III

Fonte de Variação Tipo III	SQ	GL	QM	F	p
Entre grupos	0,0407442	12	0,001019	0,43	0,9240
Intra grupos	0,030951	13	0,002381		
Total	0,071695	25			

Assim, usando os dados da precisão foram calculadas a repetibilidade (CV% intra) e precisão intermediária (CV% entre) que puderam ser combinadas para obtenção da precisão total e um intervalo de confiança de 95% foi construído com base no número de sessões (k) e de replicatas (n) por sessão, para o desenho de ensaio de rotina com uma sessão (n) e duas replicatas (n). O intervalo de confiança (n=2 e k=1) foi 5,83 - 6,09 \log_{10} CCID₅₀/dose (ou seja $\pm 0,12 \log_{10}$ CCID₅₀/dose), como observado na tabela 20.

Tabela 20 - Componente Tipo III - Intervalo de confiança de 95% - Aceitação para o título esperado de $6,66 \log_{10}$ CCID₅₀/dose ($\pm 0,5 \log = 6,16$ a $7,16$)

IC95% (0,975; gl = 25); t = 2,1	Sessões (k)	
	Replicatas (n)	k = 1
n = 1	6,52 – 6,80	6,56 - 6,76
n = 2	6,54 - 6,78	6,58 – 6,74

IC – Intervalo de confiança

A análise estatística dos resultados, mostra que a média obtida para o título foi $6,67 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, o desvio padrão geral foi 0,05, a repetibilidade foi 11,19% (12 gl), a precisão intermediária foi 11,09% (13 gl) e a precisão total foi 11,65% (25 gl) como observado na tabela 21.

Tabela 21 - Análise estatística dos resultados do ensaio de potência da OPV para os quatro componentes virais

Componente Viral	TRI	TIPO I	TIPO II	TIPO III
Média geral (\log_{10} CCID ₅₀ /dose)	6,91	6,94	5,96	6,67
DP geral	0,07	0,05	0,05	0,05
gCV% Intra (12 gl)	11,97	11,27	11,02	11,19
gCV% entre (13 gl)	11,82	10,47	11,36	11,09
Precisão Total (25 gl)	12,78	11,36	11,74	11,65
IC 95% Precisão Total (n = 2 e k = 1)	$\pm 0,19 \log_{10}$ CCID ₅₀	$\pm 0,09 \log_{10}$ CCID ₅₀	$\pm 0,13 \log_{10}$ CCID ₅₀	$\pm 0,12 \log_{10}$ CCID ₅₀
Limite de aceitação	$\pm 0,5 \log_{10}$ CCID ₅₀			

n – nº de replicatas

k – nº de sessões (corridas) de ensaios

DP – desvio padrão

gl – graus de liberdade

gCV – coeficiente de variação geométrico

CCID₅₀ – cell culture Infectious dose 50%

4.2.2 Validação Conceito do Erro Total

4.2.3.1 Exatidão

A tabela 22 apresenta os resultados da avaliação da exatidão do método para os quatro componentes virais utilizando a abordagem do Erro Total. Foi realizada uma comparação direta entre a média dos títulos em \log_{10} CCID₅₀/dose obtida para cada componente viral da vacina de referência 24-A com o título esperado para cada

componente, determinado durante o estudo de padronização daquela vacina de referência. O intervalo de confiança calculado foi comparado com os limites esperados (A, B).

4.2.2.2 Precisão Total

A tabela 23 apresenta os resultados da avaliação da precisão do método para os quatro componentes virais. Os resultados foram obtidos em 13 sessões de ensaios de rotina ($k = 13$) com duas replicatas por ensaio ($n = 2$) utilizando a vacina de referência lote 24-A. Os dados foram avaliados aplicando o conceito do Erro Total. O intervalo de confiança calculado (LI-LS) foi comparado com os limites esperados (A, B).

Tabela 22 – Avaliação da exatidão para o ensaio de potência da OPV para os quatro componentes virais utilizando o conceito do Erro Total

	Tri	Tipo I	Tipo II	Tipo III
n	26	26	26	26
Média	6,91	6,94	5,96	6,67
Título esp.	6,91	6,93	5,96	6,66
Intervalo (LI-LS)	6,72-7,10	6,79-7,09	5,81-6,12	6,52-6,83
%	-2,8% a 2,8%	-2,0 a 2,4	-2,5 a 2,6	-2,2 a 2,6
GI	25	25	25	25
Limites (A, B)	±20%	±20%	±20%	±20%
Z_{tab}	1,96	1,96	1,96	1,96
Z	0,975	0,975	0,975	0,975
Bias %	0,002	0,201	0,068	0,225
Conclusão	Exato	Exato	Exato	Exato

β nível de conteúdo – 95%, γ – Nível de confiança – 95%

Tabela 23 – Avaliação da precisão para o ensaio de potência da OPV para os quatro componentes virais utilizando o conceito do Erro Total

	Tri	Tipo I	Tipo II	Tipo III
n	26	26	26	26
dp	0,0695	0,0527	0,0501	0,0536
Média	6,91	6,94	5,96	6,67
GI	25	25	25	25
A, B	±20%	±20%	±20%	±20%
Z_{tab}	1,96	1,96	1,96	1,96
Z	0,975	0,975	0,975	0,975
Precisão Total gCV%	18,88%	14,60%	14,29%	15,22%
Conclusão	Preciso	Preciso	Preciso	Preciso

β nível de conteúdo – 95%, γ – Nível de confiança – 95%

4.2.2.3 Regra 4-6-20%

Foram avaliados os números de resultados fora do intervalo esperado (A, B) para exatidão de ±20% para cada um dos componentes virais e não houve resultados fora da faixa em nenhum dos componentes.

4.2.2.4 Cpk

O Cpk foi calculado para cada componente viral da vacina e os resultados obtidos estão descritos na tabela 24. Todos os resultados se apresentaram acima do valor de aceitação de capacidade.

Tabela 24 – CpK calculado para os quatro componentes virais

Componente viral	Cpk	Aceitação
TRIVALENTE	2,22	1,33
TIPO I	2,89	1,33
TIPO II	2,90	1,33
TIPO III	2,80	1,33

4.3 ANÁLISE DE TENDÊNCIAS E REPRODUTIBILIDADE

4.3.1 Diferença entre os resultados de potência obtidos no INCQS e pelo laboratório Produtor

A tabela 25 demonstra a análise estatística das diferenças absolutas entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelo laboratório Produtor para a potência em \log_{10} CCID₅₀/dose de 39 lotes da OPV de todos os quatro componentes virais. O coeficiente geométrico de variação entre os resultados destes dois laboratórios, para o componente trivalente, foi 13,62% e a diferença média foi 0,170 (IC_{95%} 0,038 a 0,302) e o desvio padrão foi 0,0726.

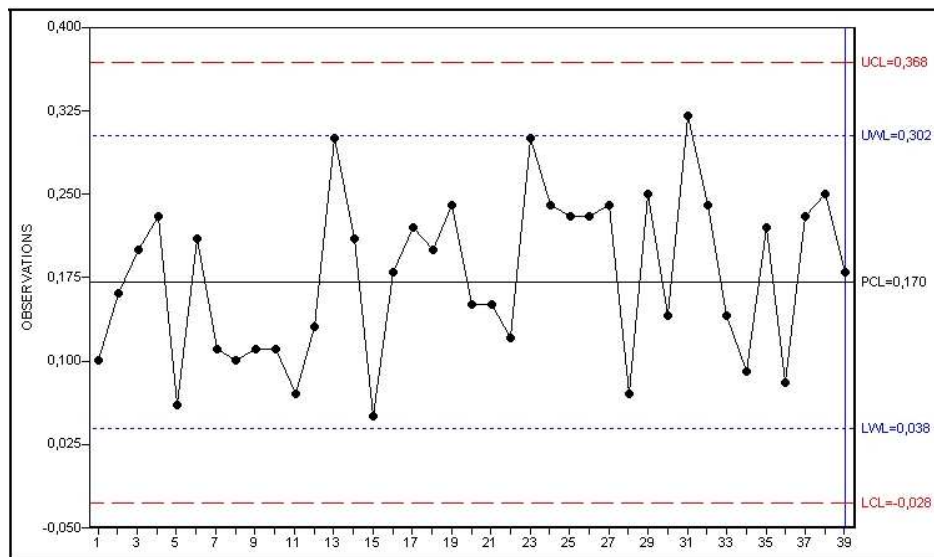
Tabela 25 – Análise estatística das diferenças entre os resultados de potência do Laboratório Produtor e do INCQS para 39 lotes de OPV

Componente	TRI	TIPO I	TIPO II	TIPO III
gCV%*	13,62	11,13	11,44	17,89
Diferença				
média	0,170	0,044	0,061	0,339
LIC_{95%}	0,038	-0,019	-0,047	0,130
LSC_{95%}	0,302	0,106	0,168	0,548
KS	0,367	0,619	0,347	0,100
N	39	39	39	39
DP	0,0726	0,0413	0,0581	0,1391

* Calculado com a média das variâncias entre cada par de resultados
KS – Teste de Kolmogorov Smirnov para distribuição normal

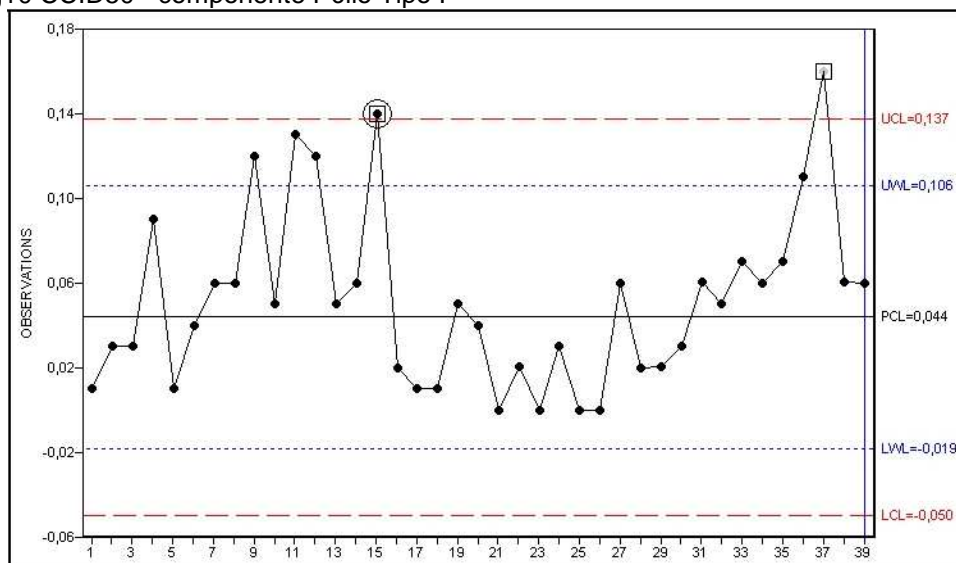
O gráfico de controle 1 plota as diferenças absolutas entre os resultados pelo INCQS e pelo laboratório Produtor para o componente trivalente.

Gráfico 1 - Diferença entre resultados dos ensaios do Produtor e dos ensaios do INCQS em Log10 CCID₅₀ - componente Trivalente



A tabela 25 demonstra que o coeficiente geométrico de variação entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelo laboratório Produtor, para o componente Tipo I, foi 11,13%, a diferença média foi 0,044 (IC_{95%} -0,019 a 0,106) e o desvio padrão foi 0,0413. O gráfico de controle 2 plota as diferenças absolutas entre os resultados dos dois laboratórios para este componente viral.

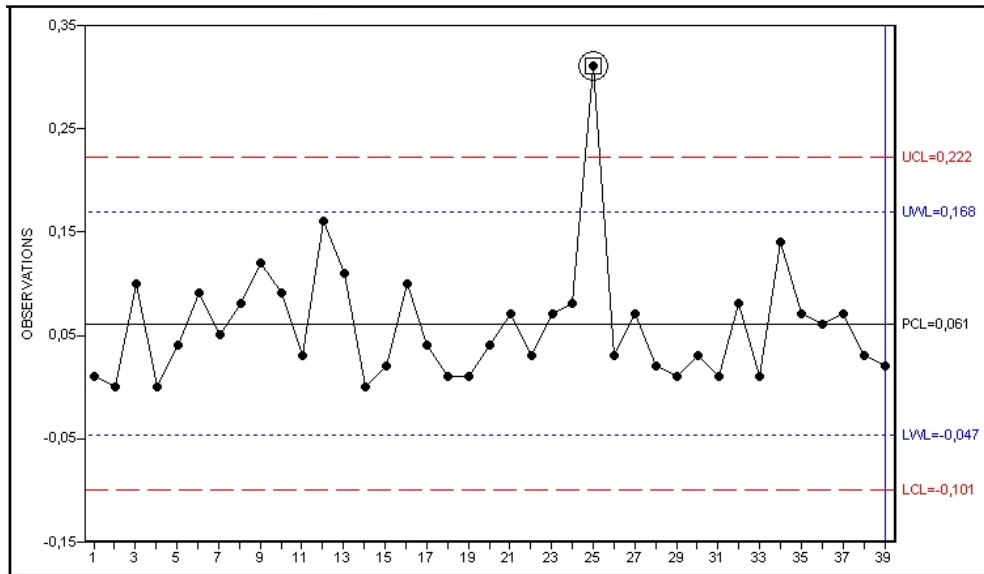
Gráfico 2 - Diferença entre resultados dos ensaios do Produtor e dos ensaios do INCQS em Log10 CCID₅₀ - componente Pólio Tipo I



Como demonstrado na tabela 25 (pg.49), o coeficiente geométrico de variação entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelo laboratório Produtor, para o

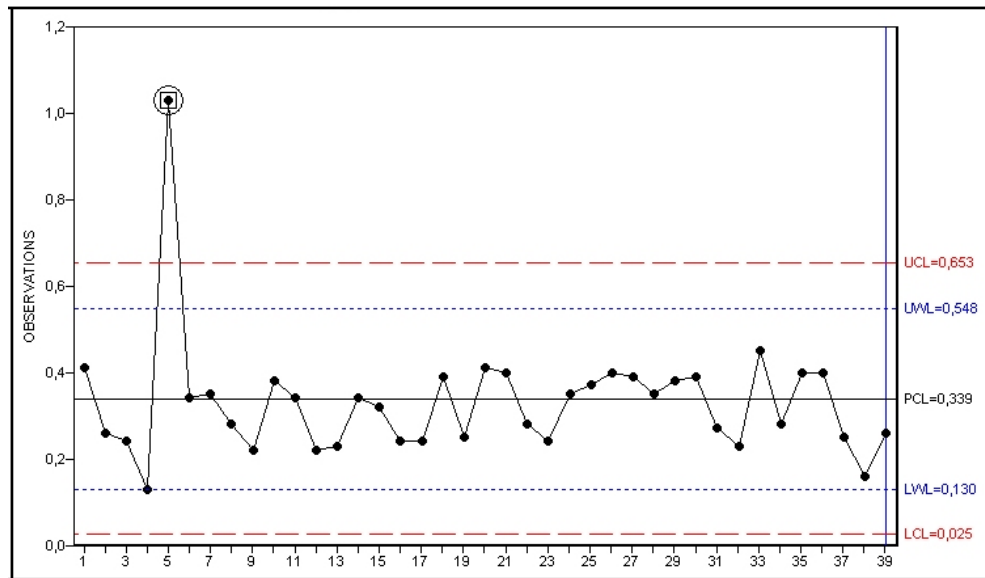
componente Tipo II, foi 11,44% e a diferença média foi 0,061 (IC_{95%} -0,047 a 0,168) e o desvio padrão foi 0,0581. O gráfico de controle 3 plota as diferenças absolutas entre os resultados dos dois laboratórios para este componente viral.

Gráfico 3 - Diferença entre resultados dos ensaios do Produtor e dos ensaios do INCQS em Log₁₀ CCID₅₀ - componente Polio Tipo II.



Como demonstrado na tabela 25, o coeficiente geométrico de variação entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelo laboratório Produtor, para o componente Tipo III, foi 17,89%, a diferença média foi 0,339 (IC_{95%} 0,130 a 0,548) e o desvio padrão foi 0,1391. O gráfico de controle 4 plota as diferenças absolutas entre os resultados dos dois laboratórios para este componente viral.

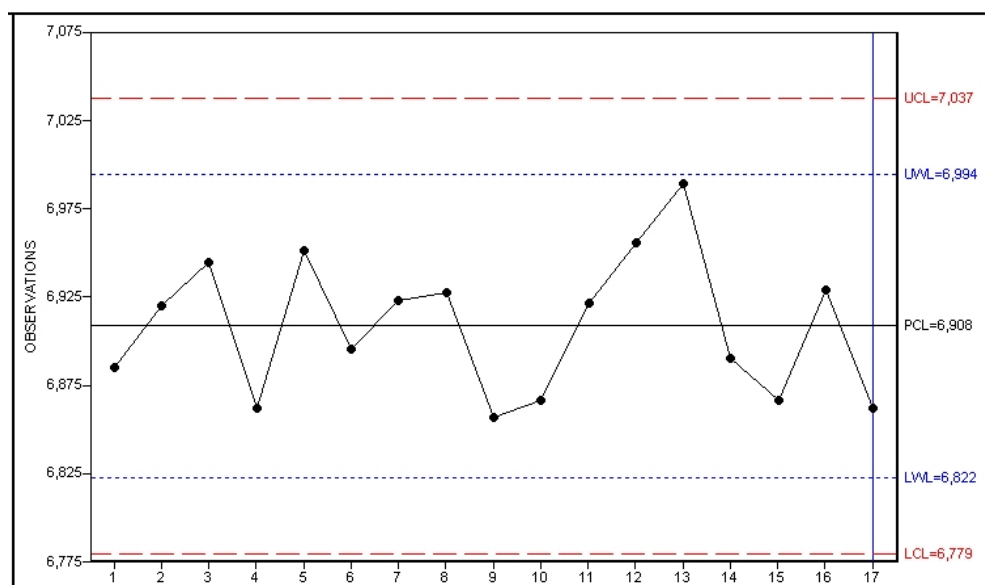
Gráfico 4 - Diferença entre resultados dos ensaios do Produtor e dos ensaios do INCQS em Log10 CCID₅₀ - componente Polio Tipo III.



4.3.2 Controle sistemático da Vacina de Referência lote 24-A

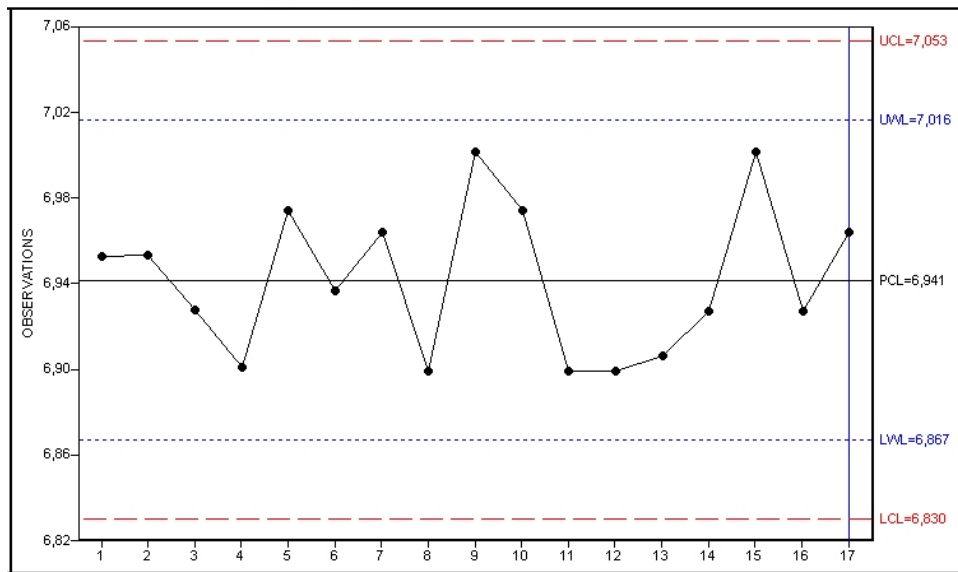
O gráfico de controle 5 plota os resultados obtidos pela vacina de referência 24-A, para o componente viral Trivalente, obtidos no INCQS nos estudos de estabelecimento ($n=4$) e de validação ($n=13$) ($n_{\text{total}} = 17$).

Gráfico 5 – Gráfico de controle sistemático da vacina de Referência lote 24-A, componente Viral Trivalente. O KS obtido foi 0,981, indicando que a amostra apresenta distribuição normal ($p>0,05$).



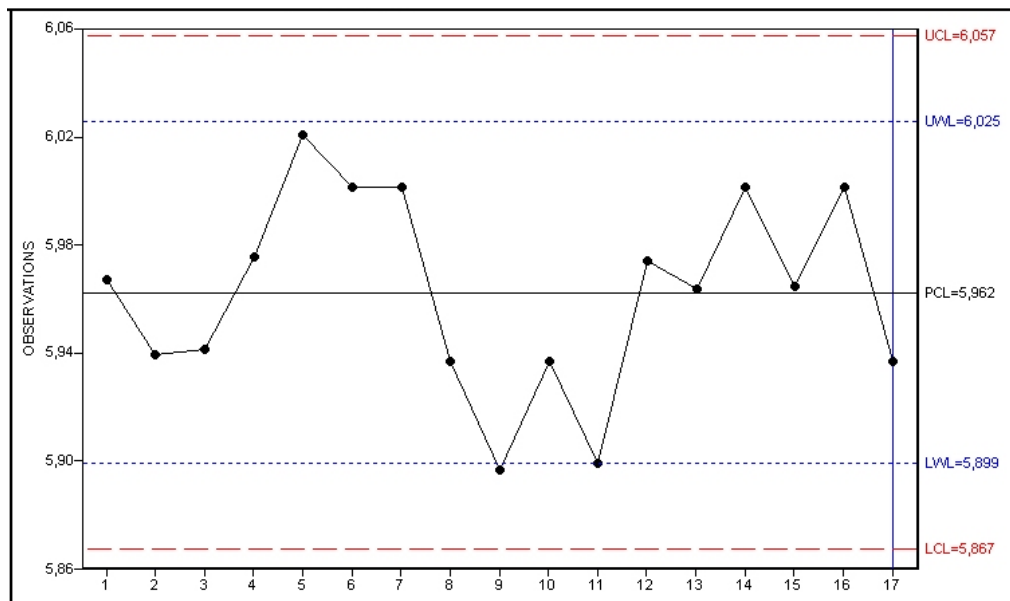
O gráfico de controle 6 plota os resultados obtidos pela vacina de referência 24-A, para o componente viral Tipo I, obtidos no INCQS nos estudos de estabelecimento (n=4) e de validação (n=13) ($n_{\text{total}} = 17$).

Gráfico 6 – Gráfico de controle sistemático da vacina de Referência lote 24-A, componente Viral Tipo I. O KS obtido foi 0,946, indicando que a amostra apresenta distribuição normal ($p > 0,05$).



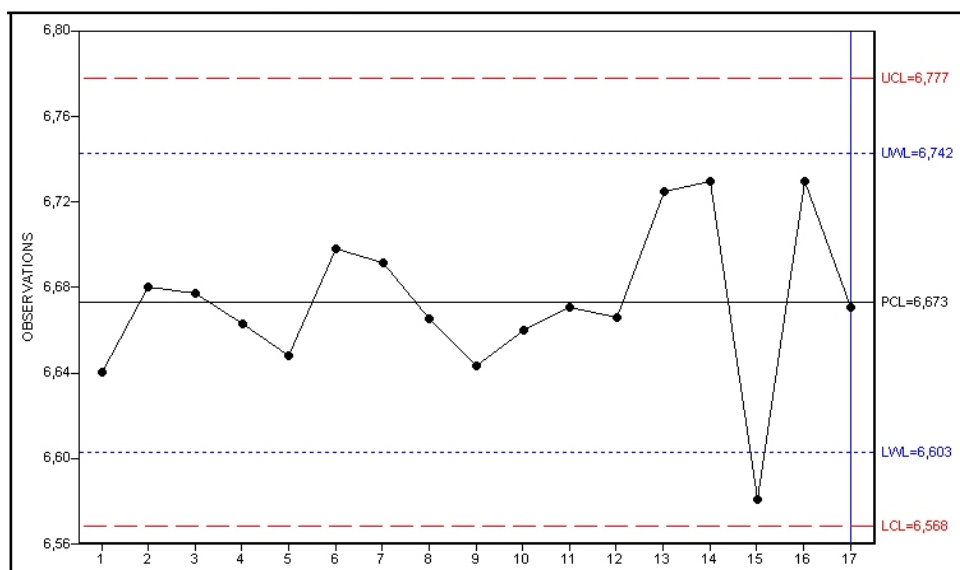
O gráfico de controle 7 plota os resultados obtidos pela vacina de referência 24-A, para o componente viral Tipo II, obtidos no INCQS nos estudos de estabelecimento (n=4) e de validação (n=13) ($n_{\text{total}} = 17$).

Gráfico 7 – Gráfico de controle sistemático da vacina de Referência lote 24-A, componente Viral Tipo II. O KS obtido foi 0,885, indicando que a amostra apresenta distribuição normal ($p>0,05$).



O gráfico de controle 8 plota os resultados obtidos pela vacina de referência 24-A, para o componente viral Tipo II, obtidos no INCQS nos estudos de estabelecimento ($n=4$) e de validação ($n=13$) ($n_{\text{total}} = 17$).

Gráfico 8 – Gráfico de controle sistemático da vacina de Referência lote 24-A, componente Viral Tipo III. O KS obtido foi 0,983, indicando que a amostra apresenta distribuição normal ($p>0,05$).



5. DISCUSSÃO

As principais características avaliadas no estudo de validação, por se tratar de um ensaio quantitativo, foram a Exatidão e a Precisão. O Cpk foi calculado para avaliar a capacidade do ensaio de potência e a adequação à regra 4-6-20 foi avaliada. Para cada componente viral da OPV, gráficos de controle da diferença entre os resultados dos dois laboratórios foram utilizados para detectar tendências não aleatórias nos resultados e a média das variâncias entre os resultados obtidos em cada laboratório, por amostra, foi utilizada para calcular o gCV% geral em uma abordagem prática para determinar a reprodutibilidade do ensaio.

A avaliação da exatidão com a abordagem do conceito tradicional ICH demonstrou que não houve diferença significativa entre as médias dos títulos obtidos no ensaio de validação e o valor esperado em nenhum dos quatro componentes virais (bias apresentada: Trivalente = 0,002%; Tipo I = 0,201%; Tipo II = 0,068%; Tipo III = 0,225%) quando testados com o teste *t* de Student como recomendado pela STSTP (2005). Desta forma nosso trabalho demonstrou que o ensaio de potencia para OPV apresentou exatidão satisfatória. Embora os ensaios para todos os componentes tenham sido considerados exatos, a faixa de aceitação da exatidão pelo teste *t* de Student é muito estreita e aceitou diferenças apenas da ordem de $\pm 0,02 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{dose}$, nas condições obtidas no estudo, corresponderam a bias% de 0,34%. GIBELIN et al. (2009) adotaram como critério de aceitação $\pm 0,2 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{dose}$ para avaliação da exatidão seguindo a abordagem clássica da ICH. Embora os autores não tenham escalarecido no trabalho publicado o porque da adoção deste valor, ele correspondeu a bias de $\pm 2x$ desvio padrão da precisão total, que é uma abordagem alternativa, mais coerente resultando em menor reprovação de ensaios satisfatórios. No entanto, a OMS (WHO, 2004) estabelece que uma variação de $\pm 0,5 \text{Log}_{10}$ é aceitável em titulações de vacinas contra pólio oral. Apesar de na abordagem convencional (ICH) os critérios de aceitação pré-estudo para métodos bioanalíticos requererem dentro da avaliação da exatidão, que a média observada esteja entre $\pm 15\%$ do valor nominal (HOFFMAN & KRINGLE, 2007).

Nossos resultados mostram que, quando aplicado o conceito do Erro Total para o cálculo da precisão, os ensaios de potência para os quatro componentes virais (Trivalente, 18,88%; Tipo I, 14,60%; Tipo II, 14,29%; Tipo III, 15,22%) foram

considerados precisos por apresentarem intervalos de confiança menores que os limites esperados (A, B) de $\pm 20\%$. A análise de variância não demonstrou efeito significativo de replicatas (n) ou sessões (k). Isto significa que os dois fatores são equivalentes e se repetições forem necessárias para obter maior precisão, poderiam ser aumentados o número de replicatas por ensaio ou de repetições de ensaios.

BOULANGER et al. (2007), descrevem que estes limites esperados são ligados às normas utilizadas para o ensaio e descreve como valores utilizados na rotina de 1% ou 2% no granel; 5% em especialidades farmacêuticas, 15% em amostras biológicas, 30% para ensaios de ligação como Radio Imuno Ensaio e ELISA. Particularmente, achamos o valor sugerido para amostras biológicas de 15% demasiado baixo frente à variabilidade dos bioensaios. Este fato é enfatizado pela OMS, que descreveu que ensaios de ligação têm em geral uma variabilidade de 5 a 20%, enquanto ensaios em animais ou células podem ter uma variabilidade maior do que 50% (WHO, 1997a).

O conceito do Erro Total aplicado por GIBELIN et al. (2009), adotou os limites de aceitação de $\pm 30\%$ do valor de referência para os valores de concentrações das amostras expressos em \log_{10} CCID₅₀/mL para um ensaio de titulação viral em cultivo celular. Dada a semelhança do trabalho destes autores com o nosso, determinação de título viral em material imunobiológico vacinal, forneceu bases teóricas para a realização de nosso estudo.

O ICH Q5A (1999) estabelece, para aceitação da precisão de métodos, que o limite de 95% de confiança para precisão total deve ser menor ou igual a $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose. Com o intuito de avaliar a Precisão Total, foram calculados, para cada componente viral, os intervalos de confiança para uma sessão de ensaio (k=1) com uma replicata (n=1), o desenho usado na rotina, os resultados obtidos foram $\pm 0,19 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Trivalente; $\pm 0,09 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo I; $\pm 0,13 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo II e $\pm 0,12 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo III. Isto nos permitiu notar, através da análise de variância, que não houve diferença significativa entre os resultados de replicatas (n) e de sessões (k) para o ensaio de potência de nenhum dos componentes virais.

Nossos resultados demonstraram que todos os intervalos de confiança de 95% calculados para a Precisão Total dos quatro componentes virais foram inferiores a $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, critério recomendado pela ICH Q5A R1 (1999)

como aceitável para titulações *in vitro* de vírus. Portanto a precisão do ensaio pode ser considerada satisfatória para a intenção de uso.

A adoção da abordagem do Erro Total, para validação, requer que se escolham apropriados níveis de conteúdo (β), nível de confiança (γ) e os limites de aceitação (A, B). HOFFMAN & KRINGLE (2007) propõem, para ensaios bioanalíticos, 66,7%, de conteúdo, 90% de confiança e $\pm 15\%$ de limites de aceitação baseados nas recomendações do FDA. O uso de intervalo de confiança de 90% em lugar do convencional de 95%, uma prática comum, tem a mesma leitura da abordagem de dois testes de 1 lado (two 1-sided test – TOST) SCHUIRMAN (1981) usado em testes de equivalência farmacêutica (USP, 2010). Porém, BOULANGER et al. (2007) consideram a adoção dos limites (A, B) de 66,7% sugerido por HOFFMAN & KRINGLE (2007) inapropriado e para garantir que 90% das corridas sejam aceitas quando o processo de medida continua válido, o mínimo seria 80%, tornando as normas de decisão mais consistentes.

No presente estudo, foram adotados os níveis de conteúdo e de confiança de 95%, mais comumente adotados em estudos biológicos e os mesmos adotados por GIBELIN et al. (2009) para a validação de um ensaio de detecção de atividade viral em células, porém com um limite de aceitação A e B de 20%, enquanto aqueles autores adotaram 30%, como sugerido para o sistema de detecção de ensaios de ligação de antígenos. Nossos resultados demonstraram uma variabilidade menor no ensaio de potencia para OPV do que o encontrado por aqueles autores para a detecção do Vírus da Leucose Aviária durante o processo de produção de vacina contra este vírus.

Os intervalos de confiança calculados de 18,88% (Trivalente), 14,60% (Tipo I), 14,29% (Tipo II) e 15,22% (Tipo III) foram menores que os limites de aceitação de $\pm 20\%$. Desta forma, os ensaios para os quatro componentes virais podem ser considerados com precisão satisfatória para a intenção de uso.

A análise estatística das diferenças absolutas entre os resultados obtidos pelo laboratório Produtor e pelo INCQS para a potência do componente Trivalente em \log_{10} CCID₅₀/dose de 39 lotes da OPV demonstrou que os resultados apresentaram distribuição normal para os três componentes virais e assim como a variação geral foi inferior ao limite de aceitação de 20% quando a reprodutibilidade foi avaliada nos três componentes virais. Nossos gráficos de controle das diferenças não detectaram tendências não aleatórias nos componentes Trivalente, Tipo II e Tipo III. Obtivemos

alguns resultados fora dos limites de controle de 3 desvios padrões, que são previsíveis. Detectamos uma aparente tendência na diferença dos resultados no componente viral Tipo I. No entanto, nestes casos é necessário um aumento na supervisão, que envolveria revisão de todos os dados de ensaios (buscando e.g. mudanças de equipamentos, lotes de reagentes relevantes, analistas etc.), uma vez que as diferenças se mantiveram dentro dos limites de aceitação preconizados pela OMS (WHO, 2004) que estabelece que em titulações seriadas de vacinas de referência e/ou teste de polio vírus, os títulos não devem variar mais do que $\pm 0,5$ Log₁₀.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os critérios de aceitação da SFSTP, no que diz respeito ao conceito do Erro Total para validação de métodos, oferecem várias vantagens sobre critérios baseados na estimação de pontos para avaliar a Exatidão e Precisão. A abordagem do intervalo de confiança prove um controle maior dos riscos associados em aceitar um procedimento inadequado e rejeitar um método aceitável. Apesar das várias vantagens da abordagem do Erro Total, certos pontos devem ser levados em consideração antes de sua adoção e utilização universal. Estes incluem prover instruções aos cientistas, no sentido de maior entendimento e interpretação destes critérios, para um maior consenso entre indústria farmacêutica e agências regulatórias na aplicabilidade da abordagem. Assim como, na disponibilidade de softwares validados.

O ensaio de potência para OPV apresenta satisfatórias: exatidão, repetitividade, precisão intermediária, precisão total e reprodutibilidade. É um método confiável e conveniente para avaliar a potência destas vacinas.

A principal perspectiva da utilização dos conhecimentos adquiridos em nosso trabalho é a adoção destas ferramentas pelo Laboratório de Vacinas Virais do INCQS efetivamente, estendendo sua aplicação na validação de ensaios de potência de outros imunobiológicos controlados no INCQS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaios e calibração. 2005.

ANDRÉ, F.E. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. **Vaccine**, n. 21, p. 593-595, 2003.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. Therapeutic Goods Administration, Finished Product (Medicine) Analytical Procedure Validation for Complementary Medicines, March, 2006 – Disponível em: <http://www.tga.gov.au/cm/finishval.pdf>. Acesso em: 10/04/2010.

BALLS, M. et al. Report and recommendations of an international workshop on promotion of the regulatory acceptance of validated non-animal toxicity test procedures. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)** v.18, p. 339–344, 1990.

BATSON, H.C.; BROWN, M.; OBERSTEIN, M. An adaptation of quality control chart methods to bacterial vaccine potency testing. **J Bacteriol.** v.61,n.4, p. 407-19, 1951.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Técnico. Campanha Nacional de vacinação contra poliomielite. 2008. Disponível em: http://www.ses.se.gov.br/userfiles/informe_tcnico_poliomielite_1_etapa.pdf. Acesso em: 14/05/2010.

BOULANGER, B. et al. Risk management for analytical methods: Conciliating objectives of validation phase and routine decision rules. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.86; p.198-207, 2007.

BOULANGER, B. et al. **Pharm Biom Anal.** v.32, n.4-5, 8, p. 753-765. 2003.

CAMPOS, A. L. V. de; NASCIMENTO, D. R. do, MARANHÃO, E. A história da poliomielite no Brasil e seu controle por imunização. **História, Ciências, Saúde — Manguinhos**, v.10, supl. 2, p. 573-600, 2003.

CASTLE, P. Alternatives to animal testing: achievements and recent developments in the European Pharmacopoeia. **Developments in Biological Standardization**, v. 86, p. 21-9, 1996.

CHAPUZET, E. et al. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: Stratégie de validation Rapport d'une commission SFSTP. S.T.P. **Pharm. Pratiq.** v.7, p.169-194, 1997.

_____. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques Exemple d'application de la stratégie de validation Rapport d'une commission SFSTP. S.T.P. **Pharm. Pratiq.** v.8 p. 81–107, 1998.

CHUMAKOV, K.; EHRENFELD, E. New generation of Inactivated poliovirus Vaccines for Universal Immunization after Eradication of poliomyelitis. **Clinical Infectious Diseases**, v.47, p.1587-1592, 2008.

COUNCIL OF EUROPE. Combination of assay results. (Chapter 5.3 Statistical analysis). In: **The European Pharmacopoeia**, 2008, 6^a ed. Strasbourg, France. p 593-

DE JESUS, N.H. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis **Virology Journal**, v.4, n.70, 2007.

DRUTZ, J.E; LIGON, B.L. Polio: Its History and Its Eradication .**Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 280-286, 2000.

DUTTA, A. Epidemiology of poliomyelitis - Options and update. **Vaccine**. v.26, p.5767–5773, 2008.

EMA, Virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. **EMA**, London. CPMP/BWP/268/95. (<http://www.ema.europa.eu/>) 1996.

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES (EDQM) – Council of Europe, COMBISTATS v4.0, www.combistats.eu

FALLEIROS-CARVALHO, L.H.; WECKX, L.Y. Vacina inativada contra pólio. **Jornal de Pediatria**. v. 82, supl. 3, 2006.
FARMACOPÉIA Brasileira, 4^o ed. Brasília: ANVISA, 2003.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, 1158; 174–183; 2007.

Food and Drug Administration, International Conference on Harmonization. Fed. Regist. 60 (1995), pp. 11260–11262.

Food and Drug Administration, International Conference on Harmonization. Fed. Regist. 62 (1997), pp. 27463–27467.

FRAZIER, J.M. Scientific criteria for validation of in vitro toxicity tests. OECD Environment Monograph Number 36. Paris: **Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)** 36, 1–62, 1990.

GIBELIN, N.; DUPONT, D.; IMBERT, S.; ROZET, E. Use of Total Error concept in the validation of viral activity in cell cultures. **Journal of Chromatography** 8, 877, 2407-2411, 2009.

GOVINDARAJULU, Z. **Sataistical techniques in bioassay**. 2nd ed. Karger, Basel, Switzerland. 2001. 234p.

HENDRIKSEN, C; ARCINIEGA, J.L; BRUCKNER, L; CHEVALIER, M; COPPENS,E; The consistency approach for the quality control of vaccines. **Biologicals** 36 :73 e 77, 2008.

HENDRIKSEN, C.F.M.; SPIESER, J.M.; AKKERMANS, A. et al. Validation of Alternative Methods for the Potency Testing of Vaccines, **ATLA** 26, 747-761, 1998.

HENDRIKSEN, C.F.M. Towards eliminating the use of animals for regulatory required vaccine quality control. **Alternatives to Animal Testing and Experimentation (ALTEX)**; v. 23, p. 187-91, 2006.

HINMAN AR: Mass vaccination against polio. **JAMA** 251:2994-2996, 1984.

HIRATA, Y. S. Gráficos de controle para laboratórios de ensaios. **Palestra - O Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.183-185, jul./dez., 2002.

HOFFMAN, D. and KRINGLE, R. A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. **Pharmaceutical Research**, Vol. 24, No. 6. p. 1157-63. 2007.

HUBERT, Ph.; CHIAP, P.; CROMMEN, J. et al., The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta** 391 (1999) 135–148.

HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part I. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 36 (2004) 579-86.

HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part II. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 45. 70-78, 2007a.

HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part III. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 45 82-96. 2007b.

HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal Part IV. Examples of application. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 48. 760–71. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3400.002**: Gráficos de controle para medidas individuais e amplitudes móveis em ensaios biológicos. Rio de Janeiro, 2008. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS – **POP 65.1120-078**, DESCARTE DE RESÍDUOS BIOLÓGICOS E MATERIAL PERFURO-CORTANTE. Rio de Janeiro, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology, Geneva, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q5A (R1): viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, Geneva, 1999.

ISO 5725, Application of the statistics-accuracy (trueness and precision) of the results and methods of measurement - Part 1 to 6, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 1994.

KLEIN, J.; CAPEN, R.; MANCINELLI, R.; ROBINETT, R.; PATRICIA, J. et al. Validation of assay for use with combination vaccines, **Biologicals** 27. 35-41. 1999.

LAURENTIE, M. & DELMAS, JM. The accuracy profile, a tool for choosing an analytical method and evaluating its validity, EuroReference, No.3, ER03-10 R01. 2010. <http://www.afssa.fr/euroreference/numero3/PN5010.htm>.

MAUMY, M.; BOULANGER, B.; DEWE, W.; GILBERT, A. & GOVAERTS, B. Dans Actes du congrés de Chimométrie 2005 - Risk management for analytical methods: conciliating objectives of methods, validation phase and routine decision rules, France - 2007. Disponível em: <http://arxiv.org/abs/0801.0207v1>

MEE R., W. Estimation of the percentage of a normal distribution lying outside a specified interval. *Communication in Statistics – Theory and Methods*, 17(5), 1465-1479. 1988.

METZ, B. Structural characterisation of diphtheria toxoid. Thesis. PrintPartners Ipskamp B.V., Enschede, Netherlands; 2005.

METZ, B.; HENDRIKSEN, C.F.M.; JISKOOT, W.; KERNSTEN, G.F.A. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* v. 20, p. 2411-2430, 2002.

METZ, B.; JISKOOT, W., HENNINK, W.E., et al. Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccine*;12:156-67. 2003.

MINNOR, P. Vaccine-derived poliovirus (VDPV): impact on poliomyelitis eradication. *Vaccine*, 2649 – 2652, 2009.

NAVORD Report. Report 492, The quality control chart technique. Navy Department, Bureau of Ordnance, Washington, D.C. 1949.

NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences), Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the validation of alternative methods, NIH Publication No. 97-3981, NIEHS, Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A., 1997. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/validate.pdf.

OLIVEIRA, A.C.B.; QUADROS, A.A.J. Síndrome pós-polio (SPP) Orientações para profissionais de saúde -- São Paulo: SES/SP, 2008.

PAUL JR: A HISTORY OF POLIOMYELITIS. NEW HAVEN, CT AND LONDON,

UK, YALE UNIVERSITY PRESS, 1971.

P. Chiap, Ph. Hubert, B. Boulanger and J. Crommen. Validation of an automated method for the liquid chromatographic determination of atenolol in plasma: application of a new validation protocol. **Anal. Chim. Acta** 391: 227–238 1999.

PONTE, C. F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos** (Rio J). Vol. 10 (Supl. 2): 619-653, 2003.

PYZDEK, T. Pyzdek's guide to SPC, Quality Publishing, LLC, **Tucson. Vol 1, Fundamentals, Ch 9, Control charts for individuals**, pp 102-109. 1998.

REY, M.; GIRARD, M. The global eradication of poliomyelitis: Progress and problems. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** 31, 317–325, 2008.

ROBINSON. J. Bioassays – A continuously developing field. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, 676-678, 2003.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, E.; RUDAZ, S. BOULANGER, B.; HUBERT, P.; **J. Chromatogr. A**; Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept. 1158, 126-37. 2007.

ROZET, E.; WASCOTTE, V.; LECOUTURIER, N.. PRÉAT, V; DEWÉ, W.; Boulanger, B. and Hubert, Ph. Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation: Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts **Anal. Chim. Acta** 591; 239-47, 2007.

ROZET, E.; C. HUBERT, A. CECCATO et al., **J. Chromatogr, A**. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. 1158; 111-25, 2007.

SABIN AB, OLITSKY PK: Cultivation of poliomyelitis virus in vitro in human embryonic nervous tissue. **Proc Soc Exp Biol Med** 34:357-359, 1936

SABIN AB: Oral poliovirus vaccine: History of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. **J Infect Dis** 151:420-436, 1985.

SALK JE, KRECH U, YOUNGNER JS, BENNETT BL, LEWIS LJ, BAZELEY PL. Formaldehyde and safety testing of experimental poliomyelitis. vaccines. **Am. J Public Health**.44:563-70, 1954.

SCHUIRMANN, D. J. On hypothesis testing to determine if the mean of a normal distribution is contained in a known interval. **Biometrics** 37, 617. 1981.

SFSTP, Committee report; Substances biologiques de reference. **STP Pharma Pratiques**, v 6, n2. pp 99-105, 1996.

SFSTP, Commission report, B. RAYMOND, A. GAILLANDRE, N. GIBELIN, N. et al. Guideline for the validation of biological assay methods; **STP Pharma Pratiques**, v15, n5. pp 364-83; 2005.

SMITH, W.C.; SITTAMPALAM, G.S. Conceptual and Statistical Issues in the Validation of Analytical Dilution Assays for Pharmaceutical Applications. **Journal of Biopharmaceutical Statistics**, 8(4), 509-532. 1998.

The College of Physicians of Philadelphia; History of Vaccines Hilleman Timeline Bibliography. 2010. Available from:
<http://www.historyofvaccines.org/content/timelines/hilleman>. Assessed in 13/10/2010.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 1913. (21 U.S.C. 151-159) The Viruses, Serums, Toxins, Antitoxins, and Analogous Products Act, The

Act of March 4, ch. 145, sec. 1. Disponível em:
<http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/html/vsta.html> .Acesso em 01 dez. 2008.

USDHHS - DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - Food and Drug Administration (FDA) - Guidance for industry: bioanalytical method validation. 2001. Available from:
www.fda.gov/.../GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf

USP, UNITED STATES PHAMACOPOEIA, mon. 1033; Biological Assay Validation. 2010.

VISWANATHAN, C.T.; S. BANSAL, B. BOOTH, et al. Workshop/Conference Report — Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices

for Chromatographic and Ligand Binding Assays. AAPS J. 9; E30-E42; 2007. Disponível em <http://www.aapsj.org/default/issueView.asp?vol=09&issue=01>. V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector, Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. **Pharm. Res.** 9 :588/592, 1992.

WALD, A. & WOLFOWITZ, J. Tolerance limits for a normal distribution. **Ann. Math. Stat.** 17: 208–215, 1946.

WHO - World Health organization, **Polio Laboratory Manual 4th Edition**, 2004.

WHO, World Health organization, Manual of Laboratory Methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization, Live Oral Polio Vaccine, pp 59-64. WHO/VSQ/97.04. Geneva, 1997.

WHO, World Health Organization, WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp. 15, **Validation of analytical assays**. WHO, Geneva, pp. 65–73. 1997a.

WHO - Health Canada Consultation on Vaccine Lot Release, Meeting report. Ottawa, 2007. Available from: http://www.who.int/entity/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/lot_release/en/index.html

WHO - World Health organization, EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION, Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities – Draft. Meeting is going to held on oct-2010, Geneva. 2010. Available from: www.who.int/entity/biologicals/BS2128_Lot_Release_CLEAN.pdf