

Estudo colaborativo nacional para o estabelecimento do material de referência de trabalho da vacina contra sarampo/caxumba e rubéola: evolução para a autossuficiência na produção nacional da vacina tríplice viral

National collaborative study for establishing the working reference material of the vaccine against measles/mumps and rubella: evolution to the self-sufficiency in the national production of triple viral vaccine

RIALA6/1652

Danielle da Silva ALMEIDA¹, Paulo César DICK¹, Carlos José da SILVA¹, Ingrid Pinheiro de MEDEIROS¹, Carina Cantelli Pacheco de OLIVEIRA¹, Darcy Akemi HOKAMA¹, Jarbas Emilio dos SANTOS², Patricia dos Santos ALVES², Lucia Maria Correa WERNECK², Lilia Ribeiro SERÓDIO³, Karen FRIEDRICH⁴, Katherine Antunes de MATTOS^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Controle de Qualidade, Departamento da Qualidade, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, RJ, CEP: 21040-900. Tel: 21 3882-9355. E-mail: katherine.antunes@bio.fiocruz.br

²Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

³Núcleo Técnico de Produtos Biológicos, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

⁴Departamento de Toxicologia e Farmacologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 22.12.2014 - Aceito para publicação: 26.08.2015

RESUMO

A monografia farmacopeica da vacina tríplice viral (sarampo/caxumba/rubéola) exige a validação de desempenho do ensaio de potência utilizando-se apropriado material de referência (MR). Com o intuito de estabelecer o primeiro MR de trabalho (MRT) nacional para a vacina tríplice viral, foi realizado o estudo colaborativo nacional com a participação de duas únicas instituições que executam o ensaio de potência desta vacina, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos, produtor nacional) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. O material candidato (cMRT_{Bio}), preparado pelo produtor, foi avaliado pelos laboratórios participantes utilizando-se as respectivas metodologias *in-house* de determinação de potência. O cMRT_{Bio} foi considerado apropriado como MR *in-house* por estar em concordância com as especificações recomendadas nas normativas de compêndios, a saber: variações intra- (< 5 %), inter-ensaios (< 10 %) e entre laboratórios (< 10 %) abaixo dos limites aceitáveis; e potência estimada (\log_{10} CCID₅₀/DH) em 3,72 para sarampo, 4,80 para caxumba e 3,70 para rubéola. Este trabalho reflete o compromisso do único produtor nacional da vacina tríplice viral com a saúde pública, descrevendo-se a expansão da tecnologia, o cumprimento às diretrizes internacionais, o cuidado com o controle da qualidade e culminância para a autossuficiência nacional na produção de vacinas.

Palavras-chave. material de referência, potência biológica, vacina tríplice viral.

ABSTRACT

The pharmacopoeia monograph for the measles/mumps and rubella (MMR) triple vaccine demands to perform the validation of the potency assay by using the suitable reference material (MR). Aiming at establishing the first work MR (MRT) for the MMR triple vaccine, a national collaborative study was performed with the participation of the two unique national institutions working on the vaccine potency evaluation test, the Immunobiological Technology Institute (Bio-Manguinhos, national manufacturer) and the National Institute for Quality Control in Health. The candidate product (cMRT_{Bio}) prepared by the manufacturer was evaluated by the participant laboratories by employing the respective *in-house* methodologies for determining the potency. The cMRT_{Bio} was considered suitable as *in-house* MR, according to the specifications based on the normative compendia, being the intra-assay (< 5 %), inter-assay (< 10 %) and between laboratories variations (< 10 %) below the acceptable limits, and the estimate potency (\log_{10} CCID₅₀/DH) in 3.72 for measles, 4.80 for mumps and 3.70 for rubella. This study reflects the commitment of the unique national MMR vaccine producer to the public health, describing the expansion of technology, the compliance with international guidelines and the careful quality control, leading to the national self-sufficiency in the vaccine production.

Keywords. reference material, biological potency, MMR vaccine.

INTRODUÇÃO

A vacina tríplice viral (sarampo/caxumba/rubéola) fornecida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) é uma preparação mista liofilizada, na apresentação em frascos de 10 doses. Durante todas as etapas de produção há o monitoramento do produto quanto à sua qualidade requerida pelas normas nacionais e/ou internacionais vigentes, sendo o Departamento de Qualidade (DEQUA) responsável por todos os ensaios químicos e biológicos preconizados para a liberação da vacina tríplice viral, incluindo toxicidade inespecífica, esterilidade, potência, termoestabilidade, identidade, pH, umidade residual e aspecto¹.

No que diz respeito à imunogenicidade de vacinas, a determinação da concentração viral ou teste de potência, para vacinas de vírus vivo atenuado é considerada o parâmetro mais crítico, visto que o conhecimento da dose é fundamental para prever sua segurança e eficácia clínica. No caso da vacina tríplice viral, a determinação da potência é realizada desde os produtos intermediários – concentrados virais monovalentes de sarampo, caxumba e rubéola – até o produto final na forma trivalente. Além disso, conforme requerimento da Organização Mundial da Saúde (OMS)² e da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 17/2010³, em todas as etapas de produção é mandatória a utilização de um material de referência (MR) para validar o ensaio.

Os MRs são utilizados nos laboratórios para o controle das análises químicas, físico-químicas e microbiológicas, na calibração de equipamentos, acompanhamento e avaliação de analistas, controle/atribuição de valores a materiais e desenvolvimento de metodologias⁴. Os MR de trabalho (MRT) são produzidos no próprio laboratório e requeridos na rotina de acordo com o “Guideline for the *in-house* production of reference materials”⁵.

Uma vez que o padrão de qualidade exigido tem sido cada vez maior, seja através da intercambialidade do que se é produzido ou mesmo através da personalização de produtos,

faz-se necessária à busca pela autossuficiência do conhecimento nas técnicas produtivas e de medição. Para caracterizar uma medição, deve-se estar provido de sistemas confiáveis capazes de garantir um nível mínimo exigível como resultado⁶, entretanto, as variáveis inerentes aos produtos biológicos complexados a ensaios biológicos tornam complexa sua quantificação em termos de Unidades Internacionais (Le Système International d’Unités). Como alternativa, a atividade biológica ou o resultado de um ensaio biológico pode ser quantificado ou estimado em termos de MR, que é de conhecimento ser ativo ou conter o analito o qual é testado ao mesmo tempo em que a amostra teste⁷.

Assim, a necessidade de MRs no controle da qualidade de produtos imunobiológicos é notória e evidente. O MR é um recurso de alto valor agregado presente em inúmeros produtos dos mais diversos setores da indústria⁶, sendo primordiais, quando se considera as perspectivas urgentes de harmonização de metodologias entre laboratórios produtores e reguladores.

Visto que atualmente Bio-Manguinhos vem utilizando no controle da qualidade, lote a lote, da potência da vacina tríplice viral o MRT trivalente (sarampo/ caxumba/ rubéola) cedido através do acordo de transferência de tecnologia com GlaxoSmithKline (GSK) e diante do avançado estágio da transferência de tecnologia desta vacina, o objetivo do estudo foi estabelecer e validar um MRT que será utilizado na rotina como controle dos ensaios para a determinação de potência da vacina tríplice viral nos laboratórios de controle da qualidade de Bio-Manguinhos e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Esta iniciativa traz relevâncias para a saúde pública, uma vez que contribui para a harmonização dos parâmetros técnicos de controle da qualidade realizados pelas Instituições nacionais, atende o requerimento da ANVISA, que em sua Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Vigilância Sanitária⁸ propõe como estratégias o desenvolvimento de MRs e contribui para a evolução da autossuficiência nacional na produção de vacinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus e Células

A cepa Schwarz da vacina do sarampo, a cepa RIT 4385 - derivada da cepa Jeryl Lynn da vacina da caxumba e a cepa Wistar RA 27/3 da vacina da rubéola foram utilizadas para a elaboração do MRT. As três cepas são constituintes da vacina trivalente sarampo/caxumba/rubéola empregada no programa de vacinação pública no Brasil. As células de linhagem utilizadas para titulação do vírus foram a Vero para sarampo e caxumba e RK-13 para a rubéola.

Participantes

Dois laboratórios brasileiros participaram do estudo. O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos (Bio, laboratório A) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, laboratório B), responsável pela liberação de lotes de imunobiológicos utilizados no Brasil.

Candidato a material de referência de trabalho da vacina tríplice viral

O lote da vacina candidato, designado inicialmente de $cMRT_{Bio}$, foi originário de uma partida de produção de rotina. Cada dose de 0,5 mL do $cMRT_{Bio}$ reconstituído (que corresponde a dose humana, DH) contém não menos que o equivalente a 1.000, 5.000 e 1.000 $CCID_{50}$ (dose 50 % infectante em culturas de células) para o vírus do sarampo, caxumba e rubéola, respectivamente.

Materiais de referência

Os ensaios foram validados em paralelo com os MR internacional (MRI) monovalentes, provenientes do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), sendo estes designados de MRI_{NIBSC} sarampo (MRI_{NIBSC} sarampo, code: 92/648), caxumba (MRI_{NIBSC} caxumba, code: 90/534) e rubéola (MRI_{NIBSC} rubéola, code: 91/688) e com o MRT controle (MRT_{CTRL}) originário da GSK e atual MRT de Bio-Manguinhos.

Determinação da potência ou titulação viral pelo método de $CCID_{50}$

Para a titulação, por teste foram utilizados três frascos do lote $cMRT_{Bio}$, um frasco do lote MRT_{CTRL} ou um frasco do MRI_{NIBSC} reconstituídos no diluente. Os MRTs mono ou multivalentes foram diluídas consecutivamente em fator 10 seguida pelo fator 4 (laboratório A) e fator 2 (laboratório B) em antissoros específicos que permitem a neutralização dos vírus. Para a visualização do vírus da caxumba foi utilizado o antissoro do sarampo, para a visualização dos vírus do sarampo e da rubéola foi utilizado o antissoro da caxumba.

Para cada diluição da vacina, um volume de 0,5 mL foi inoculado sobre a monocamada de células Vero (caxumba e sarampo) e RK-13 (rubéola). No laboratório A as placas foram incubadas a 33 °C por 9 dias em estufa contendo 5 % de CO_2 , e os títulos dos vírus presentes na vacina calculados pelo método de Reed-Muench. No laboratório B as placas contendo células Vero foram incubadas a 36 °C por 9 dias e as placas contendo células RK-13 foram incubadas a 32 °C por 12 dias. Após incubação, o efeito citopático foi avaliado e os títulos calculados pelo método de Spearman e Karber. Com base nas leituras dos vírus do sarampo, caxumba e rubéola, a potência foi expressa em $\log_{10} CCID_{50}/DH$.

Análise da homogeneidade do lote candidato

Para a avaliação da homogeneidade do lote $cMRT_{Bio}$, dez frascos foram selecionados aleatoriamente, sendo avaliados em quadruplicata. Os resultados de potência foram analisados quanto a variabilidade inter e intra-frasco pela determinação dos desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), utilizando o modelo de efeitos aleatórios^{9,10} utilizando o software R Project.

Controle estatístico de processo

As cartas de controle foram confeccionadas para verificar se o processo de medição está sob controle estatístico, sendo

elaboradas pelas diferenças das médias das quadruplicatas do $cMRT_{Bio}$ e do padrão MRT_{CTRL} para cada um de seus componentes. Para isso foi utilizado o programa de controle estatístico de processo, SPC Explorer RT, da empresa Quality America Inc. Os limites de confiança de 2 ou 3 DP foram calculados a partir da dispersão das diferenças supracitadas até o vigésimo valor de cada gráfico, como recomendado pela OMS¹¹. Os valores que apresentam um círculo indicam que o processo deve ser revisto o que pode ocorrer em alguma das seguintes situações: 9 pontos sucessivos do mesmo lado da linha central e 6 pontos sucessivos subindo ou descendo. Quando um valor estiver localizado além da linha de 3 DP, este ensaio é considerado inválido e deve ser repetido, nesse caso o programa sinaliza com um círculo e um quadrado em volta do ponto.

Análises estatísticas

Os critérios de aceitação dos testes foram àqueles estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira¹. As avaliações gráficas realizadas permitem verificar se os resultados obtidos variam de forma diferenciada conforme o dia e a amostra testada. Visando avaliar a potência média de cada componente, considerando e quantificando as variações que são devidas aos diferentes dias e amostras foi utilizado um modelo de efeitos aleatórios¹²

utilizando o software R Project. Este modelo permite estimar a proporção da variabilidade (CV e DP) em relação aos diferentes dias e amostras, além de considerar a influência destes fatores na estimação da potência média.

A consistência dentro de cada laboratório foi determinada pelo cálculo do CV do log da potência estimada do $cMRT_{Bio}$, independentemente para os três componentes virais. A variação entre os laboratórios foi expressa pelo DP e variações (menor e maior) da potência estimada de cada laboratório. A potência foi estabelecida pela combinação de todos os frascos analisados e expressos em $\log_{10} CCID_{50} / DH$ e intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %).

RESULTADOS

Ensaio de calibração (verificação)

Visto que a OMS preconiza a calibração do MRT candidato frente ao MRI, foi realizada uma análise de equivalência entre o MRI_{NIBSC} (monovalentes) *versus* o MRT_{CTRL} (trivalente) devido à quantidade limitada do MRI_{NIBSC} . Este desenho experimental teve como objetivo utilizar o MRT_{CTRL} como referência do desempenho dos ensaios de potência do $cMRT_{Bio}$. Os resultados demonstraram equivalência da potência entre os padrões avaliados, sendo o MRT_{CTRL} validado como padrão interno de desempenho do teste de potência do $cMRT_{Bio}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Dados obtidos no ensaio de calibração do MRT_{CTRL} frente ao MRI_{NIBSC}

Vírus componente	Potência ($\log_{10} CCID_{50} / DH$)					
	Sarampo		Caxumba		Rubéola	
Potência especificada	$\geq 3,0$		$\geq 3,7$		$\geq 3,0$	
Replicata	MRI_{NIBSC}	MRT_{CTRL}	MRI_{NIBSC}	MRT_{CTRL}	MRI_{NIBSC}	MRT_{CTRL}
1	3,60	3,90	4,47	4,90	3,47	4,26
2	3,45	3,73	4,41	4,86	3,45	4,25
3	3,47	3,90	4,74	5,20	3,51	4,11
4	3,45	4,13	4,71	4,96	3,7	4,11
Média	3,49	3,90	4,58	4,98	3,53	4,18

Homogeneidade do lote candidato ao material de referência de trabalho para o teste de potência

A homogeneidade do lote $cMRT_{Bio}$ foi avaliada pelos parâmetros de variabilidade inter e intra-frascos. Os resultados obtidos foram considerados homogêneos, visto que todos os CVs foram inferiores a 10 % (Tabela 2), estando dentro do limite de aceitação¹³. Estes limites foram embasados na recomendação da OMS (1997), que aceita o valor de acima de 50 % de variabilidade para ensaios biológicos¹⁴. Em paralelo, a análise residual indica que a variância dos resíduos é constante ($p > 0,05$) e os resíduos são normais ($p > 0,05$), reforçando que as suposições do modelo (homocedasticidade e normalidade) são válidas e o lote $cMRT_{Bio}$ pode ser considerado homogêneo.

Avaliação da potência biológica

Os dados do comportamento da análise de potência do MRT_{CTRL} e $cMRT_{Bio}$ foram agrupados pelo dia de análise. As variações relativas a estes parâmetros foram quantificadas utilizando um modelo de efeitos aleatórios⁸. Baseado nestes cálculos foi possível quantificar as fontes de variabilidade que compõem a variância da potência viral, usando o DP estimado, CV e IC 95 %. O conhecimento destes componentes de variância permite melhor avaliação de respostas a diferentes ensaios, conduzidos ou não no mesmo dia. Os valores calculados individualmente para os componentes virais do $cMRT_{Bio}$ encontrados nos dois laboratórios demonstraram o mesmo

padrão de variação (Tabela 3). Baseados nestes componentes de variância, foram calculadas as potências virais individuais obtidas pelas instituições e as potências institucionais combinadas para a obtenção do cálculo final da determinação da potência viral do $cMRT_{Bio}$ ($\log_{10} CCID_{50} / DH$) (Tabela 4).

Sarampo

Baseado nos componentes de variância, a potência média para sarampo no $cMRT_{Bio}$ pôde ser estimada e o IC 95 % calculado considerando as fontes de variação estudadas para cada um dos laboratórios. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3, verificamos um DP menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter- e intra-frasco), bem como, o CV menor que 10 % em ambos os laboratórios que realizaram o ensaio.

Assim, a potência média estimada ($\log_{10} CCID_{50} / DH$) do componente sarampo obtida pelo laboratório A deste lote foi de 3,73 e IC 95 % entre 3,48 - 3,98, enquanto do laboratório B foi de 3,72 e IC 95 % entre 3,68 - 3,77 (Tabela 4). De modo a garantir a confiabilidade dos dados apresentados, foi avaliado o perfil dos resultados através do uso de cartas controle demonstrando que o processo de medição está sob o controle estatístico, permitindo ainda, uma avaliação correta da conformidade do produto¹³. Na Figura 1A é possível observar que a partir do nono valor consecutivo do mesmo lado da linha da média, apenas três valores foram

Tabela 2. Avaliação da homogeneidade do $cMRT_{Bio}$

Medidas	Vírus componente		
	Sarampo	Caxumba	Rubéola
	Potência ($\log_{10} CCID_{50} / DH$) ^a		
Média ^b	3,56	4,57	3,45
DP inter-frasco	0,138	0,421	0,074
CV inter-frasco (%)	3,88	9,21	2,13
DP intra-frasco	0,167	0,124	0,110
CV intra-frasco (%)	4,70	2,71	3,18

^aMédia referente as quadruplicatas do frasco de $cMRT_{Bio}$; ^bMédia referente às médias de cada frasco $cMRT_{Bio}$. DP: desvio-padrão; CV: coeficientes de variação

destacados pelo programa como sinal de alerta para a revisão do processo, mas que não invalidam os ensaios. Conforme os resultados estatísticos demonstrados na Tabela 4, a potência combinada de ambos os laboratórios foram similares, o CV entre eles foi de 2,65 e média ponderada de 3,72 e IC 95 % entre 3,53 - 3,91 (\log_{10} CCID₅₀/DH).

Caxumba

Na avaliação do componente caxumba, os valores da análise de variância foram estimados conforme supracitado, sendo verificadas as suposições do modelo utilizado como satisfeitas, não sendo identificados valores discrepantes. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3, verificamos um DP menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter- e intra-frasco), bem como, o CV menor que 10 %, em ambos os laboratórios que realizaram o ensaio, conforme o observado para o vírus do sarampo.

Baseado nestes componentes de variância, a potência média para caxumba no cMRT_{Bio} pôde ser estimada e IC 95 % calculado considerando as fontes de variação estudadas. Assim, a potência média estimada (\log_{10} CCID₅₀/DH) do componente caxumba para este lote foi de 4,75 e IC 95 % entre 4,57 - 4,94, enquanto do laboratório B foi de 4,81 e IC 95 % entre 4,79 - 4,84 (Tabela 4). A confiabilidade dos dados foi avaliada pela carta controle foi utilizada confirmando que o processo de medição está sob o controle estatístico e o produto em conformidade, observando-se que todos os valores encontravam-se entre as duas linhas de 2 DP (Figura 1B).

Conforme os resultados estatísticos demonstrados na Tabela 4, mostramos que as potências combinadas de ambos os laboratórios foram similares, o CV entre eles foi de 1,56 e média ponderada de 4,80 e IC 95 % entre 4,66 - 4,95 (\log_{10} CCID₅₀/DH).

Rubéola

Na avaliação do componente rubéola, os resultados da análise de variância foram estimados conforme supracitado, sendo verificadas as suposições do modelo utilizado

como satisfeitas e não sendo identificados valores discrepantes. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3, verificamos um DP menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter- e intra-frasco), bem como, o CV menor que 10 %, em ambos os laboratórios, conforme o observado para o vírus do sarampo e caxumba.

Baseado nestes componentes de variância, a potência média para rubéola no cMRT_{Bio} pôde ser estimada e seu IC 95 % calculado considerando as fontes de variação estudadas. A potência média estimada (\log_{10} CCID₅₀/DH) do componente rubéola para este lote foi de 3,67 e IC 95 % entre 3,51 - 3,83, enquanto do laboratório B foi de 3,70 e IC 95 % entre 3,67 - 3,73 (Tabela 4). A carta controle utilizada como ferramenta para acompanhar a tendência da potência do cMRT_{Bio}, confirmando que o processo de medição está sob o controle estatístico e o produto em conformidade. Na Figura 1C é possível observar que a partir do nono valor consecutivo do mesmo lado da linha da média, apenas dois valores foram destacados pelo programa como sinal de alerta para a revisão do processo, mas que não invalidam os ensaios.

Conforme os resultados estatísticos demonstrados na Tabela 4, mostramos que as potências combinadas de ambos os laboratórios foram similares, o CV entre eles foi de 2,20 e média ponderada de 3,70 e IC 95 % entre 3,54 - 3,85 (\log_{10} CCID₅₀/DH).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo foi realizado o estabelecimento do primeiro MRT da vacina tríplice viral brasileira produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos). A iniciativa de nacionalização de um MRT faz parte do processo de transferência de tecnologia e cumprimento de exigências das normativas de compêndio, uma vez que o atual MRT utilizado no controle da qualidade dos componentes virais sarampo/caxumba/rubéola para a liberação de lotes vacinais da tríplice viral pela Instituição são provenientes da empresa

Tabela 3. Componentes da variância para os vírus componentes do cMRT_{Bio}

Componente de variância	Vírus componente								
	Sarampo			Caxumba			Rubéola		
	DP	CV	IC	DP	CV	IC	DP	CV	IC
Análise realizada pelo laboratório A									
Entre dias	0,254	6,82	0,143 – 0,451	0,110	2,30	0 – 0,310	0,167	4,54	0,094 – 0,297
Inter-frasco	0,092	2,48	0,052 – 0,141	0,338	7,10	0,263 – 0,451	0,068	1,85	0,043 – 0,100
Intra-frasco	0,149	4,01	0,134 – 0,173	0,123	2,58	0,108 – 0,142	0,098	2,68	0,087 – 0,113
Análise realizada pelo laboratório B									
Entre dias	0,033	0,88	0,000-00,082	0,000	0,00	0-0,034	0,000	0,00	0-0,042
Inter-frasco	0,000	0,00	-	0,020	0,42	0-0,058	0,019	0,50	0-0,056
Intra-frasco	0,073	1,95	0,059-0,093	0,063	1,31	0,050-0,082	0,076	2,06	0,061-0,098

Laboratório A: Bio-Manguinhos e B: INCQS; DP: desvio-padrão; CV: coeficientes de variação; IC: intervalos de confiança de 95 %

Tabela 4. Média das potências estimadas dos laboratórios de todos os componentes virais cMRT_{Bio}

Vírus componente (Especificações)	Potência (log ₁₀ CCID50/ DH)					
	Sarampo (≥ 3,0)		Caxumba (≥ 3,7)		Rubéola (≥ 3,0)	
	A	B	A	B	A	B
Laboratório						
Potência média	3,73	3,72	4,75	4,81	3,67	3,70
Potência combinada	3,72		4,80		3,70	
DP	0,007		0,042		0,021	
CV	2,65		1,56		2,20	

Laboratório A: Bio-Manguinhos e B: INCQS; DP: desvio-padrão; CV: coeficientes de variação

fornecedora da tecnologia, a GSK. O lote de MRT_{Bio} produzido originou 2.000 ampolas com a mesma concentração de material suficiente para a realização dos ensaios da potência biológica da vacina de rotina. O MRT_{Bio} foi estocado de forma estável, liofilizado a - 20 °C e monitorado sua qualidade e homogeneidade. O estabelecimento do MRT_{Bio} foi obtido pelo estudo colaborativo nacional, constituído do único produtor nacional da vacina e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) demonstrando concordância entre laboratórios e ensaios, sendo considerado apropriado como MRT, segundo as normas da OMS.

Seguindo as premissas de produção e elaboração de MRs biológicos recomendados pela OMS⁴ e as adequações destas normas para MR secundários para vacinas¹⁵ foi realizado

o planejamento para o estabelecimento do candidato a MRT_{Bio}, denominado em um momento inicial de cMRT_{Bio}. Apesar da não obrigatoriedade do cMRT_{Bio} ser originário de um lote comercial, a formulação combinada similar à da vacina (trivalente) produzida atualmente pela Instituição traz vantagens na comparabilidade frente aos MRs monovalentes, além de reduzir possíveis interferentes presente em outra formulação.

Após a conclusão que o lote produzido para o preparo do cMRT_{Bio} apresentou características como integridade, composição e potência em conformidade com as especificações exigidas, a etapa seguinte recomendada pela OMS foi à verificação frente ao MRI. No contexto de ensaios biológicos e especificamente para a avaliação da potência dos componentes virais

da vacina tríplice, o MR é utilizado como controle positivo, ou seja, é um padrão para a determinação da eficácia do desempenho do ensaio¹⁵. Assim, foi elaborado o desenho experimental cruzado, onde inicialmente realizou-se a análise de equivalência entre o MRT_{CTRL} atual MRT de Bio-Manguinhos utilizado na rotina laboratorial. Uma vez reafirmada a eficiência do MRT_{CTRL} como controle do ensaio, este foi utilizado no controle de todos os ensaios de determinação da potência dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$. A importância da recalibração do MRT_{CTRL} frente ao MRT_{NIBSC} trouxe outra relevância: a revalidação do desempenho do ensaio de potência utilizado pela Instituição e previamente validado e protocolado junto a ANVISA, uma vez que, tanto o MRT_{NIBSC} como o MRT_{CTRL} apresentou resultados de potência dentro das especificações dos fornecedores.

Seguindo as etapas de caracterização do lote $cMRT_{Bio}$ foram selecionados 10 frascos aleatórios para o estudo de homogeneidade. Estes foram avaliados em quadruplicatas, sendo a variação no mesmo frasco (CV-intra-frasco) inferior a 5 % e entre os frascos (CV inter-frascos), inferior a 10 %. As variações encontradas para todos os componentes virais foram consideradas de baixa relevância quando levado em conta o quantitativo aceitável para ensaios biológicos (superior a 50 %) pela OMS¹⁴. Assim, a partir de análises estatísticas, considerando as variáveis importantes na determinação da homogeneidade de um lote candidato, o $cMRT_{Bio}$ foi considerado homogêneo.

Apesar do manual da OMS¹⁵ explicitar que é possível a elaboração do MRT sem o estudo colaborativo, quando se trata de um grande e único produtor da vacina em âmbito nacional, no presente trabalho é realizado um estudo colaborativo com o INCQS, responsável pela liberação de todos os lotes de vacina utilizados no Brasil, de modo a fortalecer o estudo e estabelecer um valor de consenso nacional da potência dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$.

Para a avaliação da potência biológica dos vírus que compõem o $cMRT_{Bio}$, optou-se pela avaliação da potência inter- e intra-frascos,

para ter um suporte quantitativo de valores de potência que reflitam o valor estimado mais próximo ao real e com menos interferentes, uma vez que as variáveis decorrentes do perfil biológico do ensaio e do MR justificarem estas variações. Em um primeiro momento, foi realizado uma análise de comportamento entre as médias dos frascos do $cMRT_{Bio}$ e MRT_{CTRL} e verificado que as potências oscilam de acordo com o dia, sendo este perfil pareado com o padrão MRT_{CTRL} . De posse deste entendimento, foi realizada uma análise das variáveis que influenciam, principalmente, os limites de potência, utilizando um cálculo de efeitos aleatórios, levando em consideração as variáveis dia, inter- e intra-frascos. Estes cálculos foram aplicados para os ensaios realizados pelas duas instituições colaboradoras. Uma vez ajustado o modelo, a potência estimada de cada componente viral do $cMRT_{Bio}$ foi calculada em $(\log_{10} CCID_{50}/DH)$ 3,72 para sarampo, 4,80 para caxumba e 3,70 para rubéola.

De modo a determinar a consistência dos valores de potência estimados, o cálculo do CV foi realizado para todos os componentes da vacina, sendo observado que os valores foram inferiores a 5 % para o CV intra-frasco e menores que 10 % para o CV inter-frascos, levando em consideração o aceitável pela OMS, estas pequenas variações intrínsecas e características de ensaios biológicos são justificadas. Corroborando com estes dados, o DP de todos os ensaios foi menor que 0,5 para todas as fontes de variação (entre dias, inter- e intra-frasco), porém, esta fonte de variação não representa um valor referencial, dificultando sua interpretação.

Devido à falta de parâmetro da variabilidade aceitável para MR biológico, a proposta de que o índice de 10 % de variação seria um ótimo resultado de confiança dos testes foi reforçada por alguns estudos colaborativos descritos na literatura. Baseado nestes dados a consistência da potência viral da vacina tríplice viral oriunda de diferentes laboratórios produtores foi determinada pelo cálculo do CV, sendo observados valores de até 7,7 % para sarampo, 11,6 % para caxumba

e 11,7 % para rubéola quando analisadas as diferentes vacinas e de 10,8 % para sarampo, 16,9 % para o vírus da caxumba e 13,7 % para o vírus da rubéola quando avaliada a média do MR_{NIBISC} entre os laboratórios participantes de um estudo colaborativo¹⁶. Em contrapartida, os CVs encontrados no estudo atual foram de 2,65 % para sarampo, 1,56 % para caxumba e 2,20 % para rubéola demonstrando que o $cMRT_{Bio}$ apresenta consistência da potência estimada com pouca variabilidade quando avaliada por diferentes laboratórios, apesar das diferenças metodológicas. Porém, a maior variabilidade encontrada no trabalho supracitado¹⁷ pode ser decorrente da pouca consistência entre os laboratórios envolvidos neste estudo colaborativo, sendo este perfil de variação já relatado previamente em um estudo internacional com variações aceitáveis pela OMS de (\log_{10}): 1,0 para sarampo, 2,0 para caxumba e 2,0 para rubéola. Assim, visto que não existe um padrão de variação definido e por se tratar de um ensaio biológico, foi considerado que os valores de CV e DP encontrados nas variáveis avaliadas são insignificantes, ponderando os valores aceitáveis pela OMS¹⁴. Isto reforça que os valores encontrados neste trabalho trazem grande credibilidade a potência estimada para os componentes virais do $cMRT_{Bio}$.

Tendo conhecimento que as variações encontradas no MR podem ocorrer por alteração da atividade do produto, do próprio método (insumos, reagentes, equipamentos, operadores, ambiente) e de outros fatores envolvidos (como linhagens celulares), o uso de uma abordagem que permita quantificar a porção da variabilidade final que é devida a cada uma destas fontes foi considerado um ganho relevante no conhecimento do perfil dos resultados do MR, na avaliação das tendências dos resultados obtidos durante os ensaios de potência biológica dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$. Nesse sentido, os valores atribuídos para o $cMRT_{Bio}$ em cada ensaio foram avaliados utilizando uma importante ferramenta estatística: a confecção de cartas controle dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$ para análise de tendências dos resultados e variações no processo de produção, sendo esta uma recomendação da OMS^{14,18}.

Visto que as potências biológicas flutuam,

principalmente, de acordo com os dias e sendo esta afirmativa embasada no perfil comparativo com o MRT_{CTRL} , foram analisadas as cartas controle do processo de caracterização do $cMRT_{Bio}$ pela diferença entre a sua potência estimada e a do MRT_{CTRL} . Esta estratégia visou o conhecimento e quantificação da interferência da variável dia na determinação dos limites de controle (2DP e 3DP), parâmetros estes utilizados na realização de testes de desempenho^{14,18}. De acordo com os gráficos, foi verificado que o desempenho dos testes estava sob o controle estatístico, apresentando flutuações dentro dos limites esperados para um produto biológico avaliado por um ensaio biológico. Esta ferramenta também é utilizada para dar suporte na avaliação do perfil de variação do MRT_{CTRL} utilizado na rotina de Bio-Manguinhos. A partir dos dados obtidos pela Instituição no ano de 2013, foi verificado que os CVs inter-frasco dos componentes virais do MRT_{CTRL} são similares aos resultados demonstrados neste estudo com o $cMRT_{Bio}$ (dados não mostrados), sendo um interessante ponto de referência interno para o estudo, uma vez que estes são dados provenientes de uma mesma rotina laboratorial.

Assim, esta ferramenta traz confiabilidade aos resultados declarados para as potências estimadas dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$ reforçando a conformidade do produto e assegurando a sua qualidade mas, principalmente, sendo mais um controle e critério de validação do ensaio e, conseqüentemente dos resultados obtidos com as amostras.

Este artigo apresenta os resultados dos estudos realizados com $cMRT_{Bio}$ da vacina tríplice viral (contra sarampo/ caxumba/ rubéola) para ser utilizada na rotina da determinação de potência da vacina tríplice viral em substituição ao atual MRT controle fornecida pelo produtor mundial e responsável pela transferência de tecnologia (GSK). Os estudos foram baseados nas normativas de compêndios que preconizam os estudos de caracterização do lote candidato utilizando ferramentas estatísticas adequadas, visando à atribuição do seu valor, atendendo aos propósitos desejados e agregando maior confiabilidade aos ensaios de potência realizados por ambos participantes.

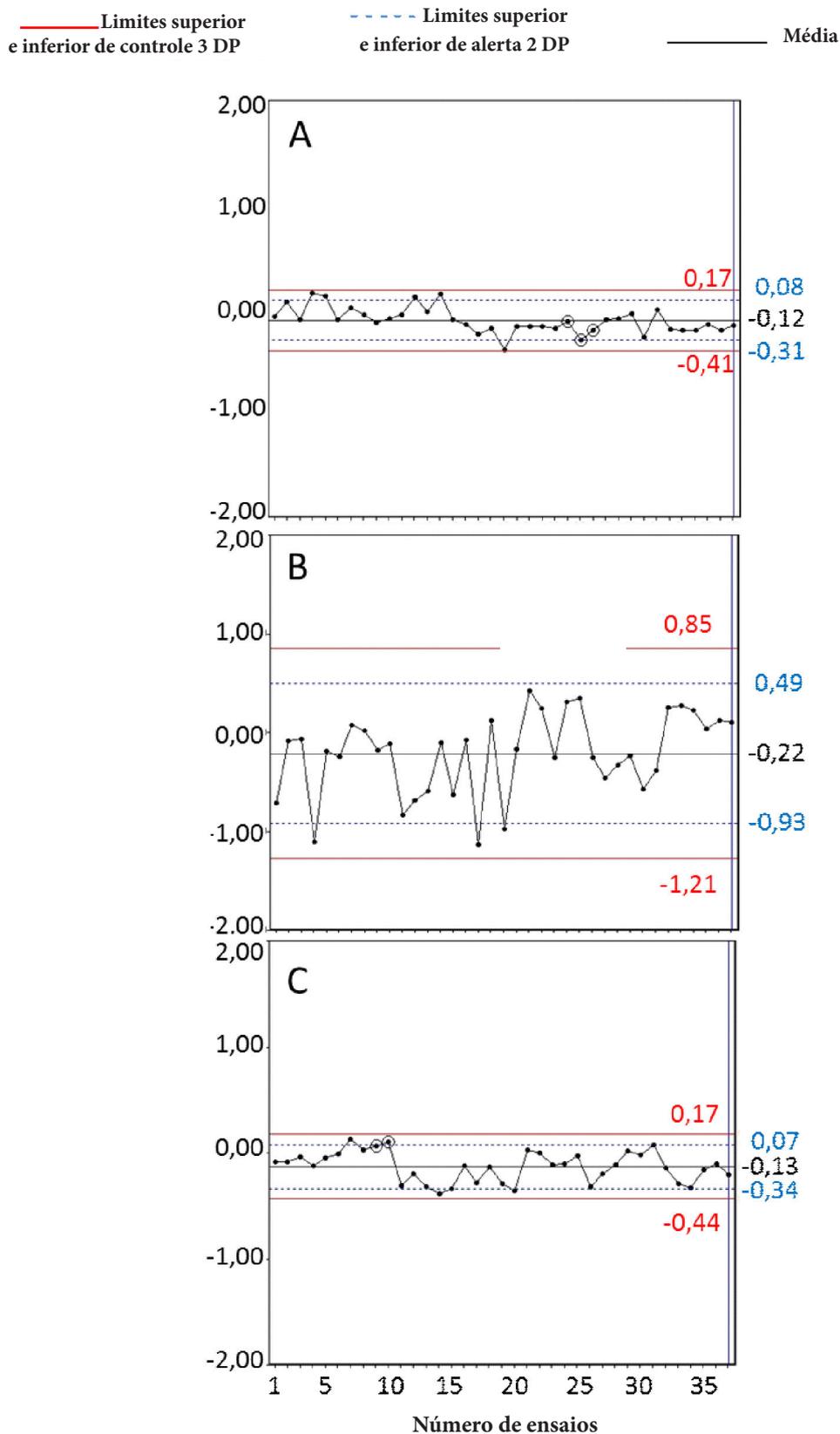


Figura 1. Cartas controle da potência biológica do componente viral sarampo (A), caxumba (B) e rubéola (C) do $cMTR_{Bio}$ comparando com o atual MTR (MTR_{CTRL})

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi verificado que o $cMRT_{Bio}$ apresentou todas as características exigidas para ser utilizado como MRT, atendendo todas as recomendações da OMS¹⁵, sendo este material protocolado e rastreável na Instituição. Com a produção e caracterização do MRT_{Bio} , a Instituição conclui mais uma etapa do processo da transferência de tecnologia da vacina tríplice viral do produtor mundial (GSK) para a Instituição nacional produtora (Bio-Manguinhos), que suprirá todo o mercado nacional. Portanto, este estudo é de extrema relevância em saúde pública, descrevendo a expansão da tecnologia, obedecendo às diretrizes internacionais, cuidado com a qualidade e evolução para a autossuficiência nacional.

AGRADECIMENTOS

À Direção e à Coordenação de Pós-Graduação do INCQS/ FIOCRUZ pelo apoio na realização deste trabalho que foi baseado na dissertação de mestrado profissional vinculado ao programa de Pós-graduação em Vigilância do INCQS no ano de 2014 e à Bio-Manguinhos/FIOCRUZ pelo suporte financeiro e técnico para realização dos ensaios. Agradecimento especial à Daniel da Silva Guedes Jr. pela revisão do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Farmacopéia Brasileira, 5. Ed. Brasília: ANVISA, 2010.
2. OMS. Organización Mundial de La salud. Boas práticas da OMS para laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos. 2010 [acesso 2015 Ago 08]. Disponível em: [http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18681pt/s18681pt.pdf].
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. [acesso 2015 Ago 08] Disponível em: [http://brasilsus.com.br/legislações/rdc/103711-17.html].
4. World Health Organization – WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Meeting. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Fifty-fifth Report. World Health Organization, n. 932; 2004.
5. International Laboratory Accreditation Cooperation – ILAC. Guideline for the in-house production of reference materials. LGC/VAM/1998/040, 1998.
6. World Health Organization – WHO. Technical Reports Series, Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. n. 932, 2006.
7. Minor P. International reference preparations for standardization of biological medicinal products. *Bundesgesundheitsbl*. 2014; 57(10):1145-51. [DOI: 10.1007/s00103-014-2027-z].
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agenda Nacional de Prioridades em Vigilância Sanitária. Núcleo de Educação, Pesquisa e Conhecimento – NEPEC/ANVISA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2011 [acesso 2015 Out 11]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3048f900474576208428d43fbc4c6735/Prioridades_de_Pesquisa_em_Vigilancia_Sanitaria.pdf?MOD=AJPERES].
9. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. 7. ed. New York: John Wiley & Sons; 2008: 680.
10. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965; 52:591-611. [DOI: 10.1093/biomet/52.3-4.591].
11. World Health Organization – WHO. Immunization surveillance, assessment and monitoring. 2012 [acesso 2014 Ago 15]. Disponível em: [http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/en/].
12. Pinheiro J, Bates D. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS (Statistics and Computing). 1 ed. Springer. 2009; 530 p.
13. World Health Organization – WHO. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: forty-first report. World Health Organization, n. 943, 1-156, 2007.

14. World Health Organization – WHO. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp.15. Validation of analytical assays. Geneva; 1997 [acesso 2015 Jul 20]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64465/2/WHO_VSQ_97.02.pdf].
15. World Health Organization – WHO. Manual for the establishment of the national and other secondary standard for vaccines. Geneva, World Health Organization, WHO/IVB/11.03; 2011.
16. Joseph L, Velayudhan A, Charuvila MV, Vayalappil MC. Reference biomaterials for biological evaluation. *J Mater Sci Mater Med*.2009; 20(1:S9-17). [DOI 10.1007/s10856-008-3522-2].
17. Forsey T, Health Alan B, Mino PD. A European collaborative study to assess the proficiency of laboratory estimates of potency of live measles, mumps and rubella tri-valent vaccines. *Biologicals*. 1993; 21(3):239-49. [DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.017].
18. World Health Organization – WHO. The Mumps Vaccine. 2009 [acesso 2014 Jul 10]. Disponível em: [http://www.who.int/vaccines-diseases/diseases/mumps_vaccine.shtm].