

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

FRANCIS CARAZZAI REISDÖRFER

**Estudo visando à extensão do prazo de validade da vacina febre amarela
(atenuada) 05 e 10 doses**

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

Rio de Janeiro

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ – RJ

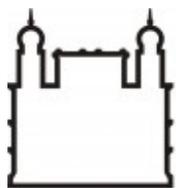
Reisdörfer, Francis Carazzai

Estudo visando à extensão do prazo de validade da vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses / Francis Carazzai Reisdörfer. – Rio de Janeiro, 2011.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.

1. Vacina febre amarela. 2. Estabilidade. 3. Prazo de validade. 4. Potência.

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento de Controle de Qualidade, sob a orientação do Prof. Dr. Akira Homma e do Prof. Dr. Geraldo Marcelo da Cunha.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

FRANCIS CARAZZAI REISDÖRFER

**Estudo visando à extensão do prazo de validade da vacina febre amarela
(atenuada) 05 e 10 doses**

Orientadores: Prof. Dr. Akira Homma

Prof. Dr. Geraldo Marcelo da Cunha

Dissertação aprovada em 07 de junho de 2011.

Prof^a. Dr^a. Luciane Pinto Gaspar

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) / Fiocruz

Presidente da Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Frassinetti Guimarães de Sá

Universidade Paulista (UNIP)

Prof. Dr. Luiz Antônio Bastos Camacho

Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) / Fiocruz

Rio de Janeiro

2011

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

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida, pelos estudos, pelas grandes oportunidades e pelas pessoas admiráveis com quem pude conviver e aprender.

A Bio-Manguinhos / Fiocruz pelo financiamento e todo suporte técnico-científico.

Ao diretor de Bio-Manguinhos, Dr. Artur Roberto Couto, e aos coordenadores do mestrado, Dra. Sheila Farage e Dr. Ricardo Galler, pela oportunidade da realização deste mestrado.

Ao Dr. Akira Homma e Dr. Geraldo Marcelo da Cunha, pela orientação e incentivo.

A Darcy Akemi Hokama e Lilia Ribeiro Serodio, pelo grande auxílio no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

A todos os colaboradores do Departamento de Controle de Qualidade, pela atenção e dedicação na realização dos testes necessários.

Aos amigos que conquisei ao longo dos últimos anos, Carina Cantelli Pacheco de Oliveira, Joyce Brito de Carvalho, Michelle Clarina Teixeira, Paulo César Dick, Marisol Simões, Renata Fajardo Bonin e Talytta da Silva Feitosa Rocha, pelo grande auxílio e ombro amigo em todos os momentos.

A Cláudia Maria Dias, Patrícia de Oliveira Machado, Edwiges Lira Salles e Nivia Maria Faustino, pela compreensão nos momentos em que fiquei ausente.

Aos colegas de mestrado da turma 2009, pela amizade, conversas e contribuições.

A Ana Carolina Tramontina, Paola Mello, Paula Andrade, Fernanda Becker e Aline Matter, pela amizade incondicional sempre.

A Pablo Orrico, pela compreensão, incentivo, amor e carinho ao longo dos últimos anos.

A minha irmã, Verônica Carazzai Reisdörfer, pelo amor, carinho e amizade sempre.

A meu pai, Paulo Reisdörfer, e minha mãe, Maria Cristina Carazzai Reisdörfer, pelo exemplo, amor e estímulos recebidos.

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas, que de alguma forma, contribuíram para viabilizar este trabalho.

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia, e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos" (Fernando Pessoa).

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Febre amarela	1
1.1.1. Breve histórico	1
1.1.2. Aspectos epidemiológicos	4
1.1.3. Agente etiológico	7
1.1.4. A vacina	9
1.1.5. Produção da vacina em Bio-Manguinhos	10
1.2. Estudos de estabilidade.....	14
1.2.1. Histórico e características da vacina febre amarela (atenuada) com relação a estabilidade.....	14
1.2.2. Tipos de estudos de estabilidade.....	16
1.2.3. Legislação sobre estudos de estabilidade.....	18
1.3. Demanda nacional e internacional de vacina febre amarela (atenuada).....	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. METODOLOGIA.....	23
3.1. Seleção dos dados.....	23
3.2. Amostras e vacina de referência.....	23
3.3. Protocolo do estudo	24

3.3.1. Estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses.....	24
3.3.2. Estudo de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses.....	25
3.3.3. Estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses.....	26
3.4. Testes críticos realizados durante o estudo de estabilidade.....	28
3.4.1. Determinação da potência e termoestabilidade.....	29
3.4.1.1. Método de Unidades Formadoras de Placas (UFP).....	29
3.4.1.2. Vacina de referência.....	30
3.4.1.3. Critério de aceitação.....	31
3.4.2. Determinação da umidade residual.....	32
3.4.2.1. Método de Karl Fischer.....	32
3.4.2.2. Critério de aceitação.....	33
3.4.3. Teste de esterilidade.....	33
3.4.3.1. Método direto para verificação do crescimento bacteriano e fúngico.....	33
3.4.3.2. Critério de aceitação.....	33
3.5. Análise Estatística.....	34
3.5.1. Modelo de conformidade.....	34
3.5.2. Modelo de estimativa.....	34
3.5.2.1. Regressão linear.....	34
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Potência do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.....	38
4.2. Potência do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.....	40
4.3. Potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 36 meses.....	42
4.4. Potência do estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 48 meses.....	48
4.5. Potência do estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.....	50

4.6. Termoestabilidade do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses	52
4.7. Termoestabilidade do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses	53
4.8. Diferença entre a potência e a termoestabilidade (perda) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses	55
4.9. Diferença entre a potência e a termoestabilidade (perda) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses	57
4.10. Extrapolação dos dados de potência dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.....	58
4.11. Extrapolação dos dados de termoestabilidade dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses	60
4.12. Umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses	61
4.13. Umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses	63
4.14. Identidade, esterilidade, endotoxinas bacterianas, ovoalbumina residual e nitrogênio proteico do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses	66
4.15. Potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 06 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada.....	68
4.16. Potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a -20°C em sua forma liofilizada.....	70
4.17. Potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada.....	72
4.18. Esterilidade do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses	73
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ANCOVA: análise de covariância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BM: Bio-Manguinhos

C: capsídeo

CAS: caldo de caseína-soja

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CP: consulta pública

CQ: controle de qualidade

DCVMN: *Development Countries Vaccine Manufacturer Network*

DEQUA: Departamento de Controle de Qualidade

DI: documento interno

DL: dose letal

DNA: ácido desoxirribonucleico

E: envelope

EDQM: *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*

EE: estudo de estabilidade

EMA: *European Medicines Agency*

EP: *egg passage*

FA: febre amarela

FAS: febre amarela silvestre

FAU: febre amarela urbana

FDA: *Food and Drug Administration*

FLA: fase de leitura aberta

IC: intervalo de confiança

ICH: *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

IP: intervalo preditivo

LE: limite de especificação

LT: lote teste

MS: Ministério da Saúde

NIBSC: *National Institute for Biological Standards and Control*

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

PNI: Programa Nacional de Imunizações

pré-M: pré-membrana

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

r-DNA: DNA recombinante

RE: Resolução Especial

RNA: ácido ribonucleico

RNC: região não codificante

SEAMO: Seção de Amostragem

SEPIN: Seção de Esterilidade, Processos e Insumos

SEPOT: Seção de Potência

TGC: meio fluido de tioglicolato

UFP: unidades formadoras de placas

UI: unidades internacionais

VR: vacina de referência

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Especificações da vacina febre amarela (atenuada).....	13
Tabela 1.2. Especificações do diluente para vacina febre amarela (atenuada).....	13
Tabela 1.3. Quantitativo de doses de vacina febre amarela (atenuada) 05, 10 e 50 doses entregue por Bio-Manguinhos ao Ministério da Saúde e o quantitativo exportado, desde 1987 até 2010.	20
Tabela 1.4. Quantitativo de doses de vacina febre amarela (atenuada) 05, 10 e 50 doses solicitados pelo Ministério da Saúde e para exportação, de 2011 até 2020.	20
Tabela 3.1. Matriz do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses para as amostras armazenadas a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.....	25
Tabela 3.2. Teste de potência utilizado no estudo de acompanhamento anual da estabilidade das amostras de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses, armazenadas a -20C por 36 meses.	25
Tabela 3.3. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade das amostras de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses, armazenadas a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.	26
Tabela 3.4. Matriz do estudo de estabilidade pós-reconstituição realizado no ano de 2006, com amostras de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenadas na sua forma liofilizada por 06 meses a 2-8°C e posteriormente armazenados na sua forma reconstituída por mais 08 horas a 2-8°C.	27
Tabela 3.5. Matriz do estudo de estabilidade pós-reconstituição realizado no ano de 2010, com amostras de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenadas na sua forma liofilizada por 48 meses a -20°C e a 2-8°C.	27
Tabela 4.1. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.	38
Tabela 4.2. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de potência dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses.	40

Tabela 4.3. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.	41
Tabela 4.4. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de potência dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses.	42
Tabela 4.5. Teste de potência utilizado no estudo de acompanhamento anual da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 36 meses.	43
Tabela 4.6. Subdivisão das amostras de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenadas por 36 meses a -20°C, de acordo com o ano da produção, para a realização da análise estatística.	43
Tabela 4.7. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 48 meses.	49
Tabela 4.8. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.	51
Tabela 4.9. Teste de termoestabilidade utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.	52
Tabela 4.10. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de termoestabilidade (UI/dose) dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses.	53
Tabela 4.11. Teste de termoestabilidade utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.	54
Tabela 4.12. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de termoestabilidade (UI/dose) dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses.	55
Tabela 4.13. Perda do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.	55
Tabela 4.14. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de perda dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses.	56
Tabela 4.15. Perda do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.	57
Tabela 4.16. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de perda dos lotes de vacina 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses.	58

Tabela 4.17. Teste de umidade residual utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.	61
Tabela 4.18. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de umidade residual dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses.	62
Tabela 4.19. Teste de umidade residual utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.	63
Tabela 4.20. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de umidade residual dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses.	65
Tabela 4.21. Teste de identidade utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.....	67
Tabela 4.22. Teste de esterilidade utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.....	67
Tabela 4.23. Teste de endotoxinas bacterianas (UE/dose) utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.....	67
Tabela 4.24. Teste de ovoalbumina residual ($\mu\text{g}/\text{dose}$) utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.	67
Tabela 4.25. Teste de nitrogênio proteico (mg/dose) utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.	68
Tabela 4.26. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 06 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada.....	69
Tabela 4.27. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a -20°C em sua forma liofilizada.....	70
Tabela 4.28. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenadas por 48 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribuição do vetor urbano da febre amarela (<i>Aedes aegypti</i>) nas Américas: 1930, 1970 e 2001	3
Figura 1.2. Mapa das áreas com e sem recomendação de vacina contra febre amarela na África, 2010.	4
Figura 1.3. Mapa das áreas com e sem recomendação de vacina contra febre amarela nas Américas, 2010.....	5
Figura 1.4. Mapa das áreas com e sem recomendação da vacina contra febre amarela no Brasil, 2008-2009	6
Figura 1.5. História das passagens dos vírus da febre amarela 17DD utilizados para a produção de vacinas no Brasil	11
Figura 1.6. Fluxograma de produção e controle da vacina febre amarela (atenuada) em Bio-Manguinhos.	12
Figura 3.1. Esquema para realização do estudo de estabilidade pós-reconstituição das amostras de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses, armazenadas, após sua reconstituição, a 2-8°C por 08 horas.	28
Figura 4.1. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.	39
Figura 4.2. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.	40
Figura 4.3. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.	41
Figura 4.4. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.	42

- Figura 4.5. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses fabricados em 2003 e armazenados a -20°C por 36 meses..... 44
- Figura 4.6. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses fabricados em 2004 e armazenados a -20°C por 36 meses..... 45
- Figura 4.7. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses fabricados em 2005 e armazenados a -20°C por 36 meses..... 46
- Figura 4.8. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses fabricados em 2006 e armazenados a -20°C por 36 meses..... 47
- Figura 4.9. Teste de potência utilizado no estudo de acompanhamento anual da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 36 meses plotada em um gráfico contendo o intervalo preditivo (IP) de 95% do lote 067VFC003Z, armazenado a -20°C por 48 meses (pior caso)..... 48
- Figura 4.10. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 48 meses plotada em um gráfico contendo o intervalo preditivo (IP) de 95% do lote 067VFC003Z, armazenado a -20°C por 48 meses (pior caso). 50
- Figura 4.11. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses plotada em um gráfico contendo o intervalo preditivo (IP) de 95% do lote 067VFC001Z, armazenado a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses (pior caso). 51
- Figura 4.12. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de termoestabilidade do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses..... 53
- Figura 4.13. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de termoestabilidade do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses..... 54
- Figura 4.14. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados da perda (diferença entre os títulos de potência e termoestabilidade) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses. 56

- Figura 4.15. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados da perda (diferença entre os títulos de potência e termoestabilidade) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses..... 58
- Figura 4.16. Retas de regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos preditivos (IP) obtidos a partir da extrapolação dos resultados de potência dos lotes 067VFC003Z (-20°C / 48 meses) e 067VFC001Z (2-8°C / 48 meses). dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses. 59
- Figura 4.17. Retas de regressão, intervalos de confiança (IC) e intervalos preditivos (IP) obtidos a partir dos resultados de potência dos lotes 067VFC003Z (-20°C / 48 meses) e 067VFC001Z (2-8°C / 48 meses).dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses. 60
- Figura 4.18. Retas de regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos preditivos (IP) obtidos a partir da extrapolação dos resultados de termoestabilidade dos lotes 067VFC003Z (-20°C / 48 meses) e 067VFC001Z (2-8°C / 48 meses) dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses..... 61
- Figura 4.19. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses..... 62
- Figura 4.20. Reta de regressão, intervalo de confiança (IC) e intervalo preditivo (IP) obtidos a partir dos resultados de umidade residual do lote 067VFC003Z (-20°C / 48 meses) (pior caso) dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses. 63
- Figura 4.21. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses..... 64
- Figura 4.22. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses, excluindo-se o valor obtido para o lote 067VFC001Z em T12..... 65
- Figura 4.23. Reta de regressão, intervalo de confiança (IC) e intervalo preditivo (IP) obtidos a partir dos resultados de umidade residual do lote 067VFC003Z (2-8°C / 48 meses) (pior caso) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses. 66

- Figura 4.24. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 06 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada. 69
- Figura 4.25. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a -20°C em sua forma liofilizada. 71
- Figura 4.26. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada. 72

RESUMO

A febre amarela (FA) é uma doença viral aguda, transmitida por mosquitos vetores, que pode causar doença grave e morte. O vírus da FA é um membro da família *Flaviviridae* do gênero *Flavivírus*. No Brasil, todas as regiões já apresentaram casos da doença e o número de casos fatais tem aumentado. Até hoje, a vacinação é o meio mais eficaz para prevenir e controlar a FA. A partir de 2011, o quantitativo solicitado tanto pelo Ministério da Saúde quanto para exportação aumentou, e este é um dos motivos que leva a discussão para a formação de um estoque estratégico deste produto em Bio-Manguinhos. Portanto, para que seja garantido o suprimento da vacina febre amarela (atenuada) aos órgãos nacionais e internacionais em momentos de maior demanda, assim como aumentar a oferta e melhorar o aproveitamento de doses distribuídas, evitando o desperdício de uma vacina estável, estudos de estabilidade foram realizados visando à extensão do prazo de validade das vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses de 24 para 36 meses, quando armazenadas a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$. Para a análise da estabilidade da vacina 10 doses, foram avaliados dados retrospectivos de potência, termoestabilidade, umidade residual, e outros parâmetros menos críticos, obtidos a partir de estudos de estabilidade longa duração (-20°C e $2-8^{\circ}\text{C}$ / 48 meses) e pós-reconstituição ($2-8^{\circ}\text{C}$ / 08 horas), assim como dados obtidos nos períodos de 2009 e 2010. Para a análise da estabilidade da vacina 05 doses, foram avaliados dados retrospectivos de potência obtidos de estudos de acompanhamento da estabilidade realizados entre 2003 e 2009 (-20°C / 36 meses), além de estudos complementares de acompanhamento da estabilidade, realizados com lotes produzidos entre 2005 e 2006 (-20°C e $2-8^{\circ}\text{C}$ / 48 meses). Os dados obtidos para ambas as apresentações puderam ser comparados, pois elas são constituídas pela mesma formulação, diferenciando-se somente no volume de envase. Para a análise estatística dos dados foram utilizados a regressão linear, a análise de covariância (ANCOVA), além do cálculo de intervalos de confiança, intervalos preditivos e extrapolação de dados. Os resultados de potência e termoestabilidade tanto para a vacina 05 doses quanto para a 10 doses decaem ao longo do tempo de armazenamento em ambas as temperaturas, entretanto permanecem de acordo com as respectivas especificações. Já os resultados de umidade residual obtidos para a vacina 10 doses revelaram um incremento na umidade ao longo do tempo, mas também se mantêm de acordo com a respectiva especificação. Os resultados de potência e esterilidade, obtidos para a vacina 10 doses em estudos pós-reconstituição, também demonstraram a estabilidade deste produto armazenado por 08 horas a $2-8^{\circ}\text{C}$. Portanto, o prazo de validade das vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses pode ser estendido para 36 meses, quando armazenado a -20°C ou a $2-8^{\circ}\text{C}$, sem alteração de sua qualidade.

ABSTRACT

Yellow fever (YF) is an acute viral disease, transmitted by mosquitoes, which can cause serious illness and death. The YF virus is a member of the *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus. In Brazil, all regions have already had cases of the disease and the number of fatalities has increased. Until now, vaccination is the only effective means to prevent and control YF. From 2011, the amount of vaccine requested by Ministry of Health and for exports increased, and this is one of the reasons leading the discussion for the formation of a strategic stock of this product in Bio-Manguinhos. Therefore, to ensure the regular supply of yellow fever vaccine (attenuated) to the national and international agencies in times of high demand, as well as increase supply and improve the use of doses distributed, avoiding the waste of a stable vaccine, stability studies were performed to propose the extension of the shelf-life of yellow fever vaccine 05 doses (YFV-05) and 10 doses (YFV-10) from 24 to 36 months when stored at -20°C and $2-8^{\circ}\text{C}$. For the stability analysis of YFV-10 were evaluated retrospective potency, thermostability and residual moisture data, and other parameters less critical, obtained from studies of long-term stability (-20°C and $2-8^{\circ}\text{C}$ / 48 months) and after reconstitution ($2-8^{\circ}\text{C}$ / 08 hours) as well as data obtained during the periods of 2009 and 2010. To analyze the stability of YFV-05 were evaluated retrospective potency data obtained from annual stability studies conducted between 2003 and 2009 (-20°C / 36 months) in addition to complementary annual stability studies, carried out with batches produced between 2005 and 2006 (-20°C and $2-8^{\circ}\text{C}$ / 48 months). The data obtained for both presentation could be compared because both have the same formulation, differing only in filling volume. For the statistical analysis were used linear regression, analysis of covariance (ANCOVA), and the calculation of confidence intervals, predictive intervals and data extrapolation. The results of potency and thermostability for both YFV-05 and YFV-10 decay over time at both storage temperatures and remain according to specifications. However, the results obtained for residual moisture to YFV-10 revealed an increase in moisture over time, but remaining according to specification. Analysis of potency and sterility obtained for YFV-10 after reconstitution study also demonstrated the stability of the product stored for 08 hours to $2-8^{\circ}\text{C}$. Therefore, the shelf-life of yellow fever vaccine 05 and 10 doses may be extended for 36 months when stored at -20°C or $2-8^{\circ}\text{C}$, without changing its quality.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Febre amarela

1.1.1. Breve histórico

Estudos recentes utilizando novas técnicas de biologia molecular comprovaram que a origem do vírus da febre amarela (FA) é africana (MS 2010). Entretanto, devido à inexatidão das descrições clínicas e epidemiológicas desta doença, não se sabe exatamente em que época ela teve início (Craig 1932 e MS 2010).

Os primeiros registros de epidemia de uma doença com sintomas semelhantes àqueles da FA foram encontrados em manuscritos Mayas de 1648, em Yucatan, no México (Craig 1932, Monath 2004 e MS 2010). Na Europa, a FA já havia se manifestado antes dos anos 1700, mas foi em 1730, na Península Ibérica, que se deu a primeira epidemia, causando a morte de 2.200 pessoas. Nos séculos XVIII e XIX, os Estados Unidos também foram acometidos repetidas vezes por epidemias devastadoras da enfermidade, em consequência do trânsito de navios procedentes da América Central e do Caribe (MS 2010).

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

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

Em 1881, o médico cubano Carlos Finlay, sugeriu que o *Aedes aegypti* era o transmissor da FA, o que foi confirmado, em 1900, por Walter Reed. Com base nisso, em 1901, Emílio Ribas iniciou a primeira campanha contra a FA no interior de São Paulo adotando medidas específicas contra o *Aedes aegypti* (Reed 1900, Brasil 1999 e Benchimol 2001).

Em 1903, Oswaldo Cruz, então Diretor Geral de Saúde Pública, iniciou uma luta orientada contra o vetor da doença febre amarela. Em 1909, a doença foi eliminada do Rio de Janeiro que, na ocasião, era a capital federal. Em 1919, foram detectados surtos de FA em seis estados do nordeste, o que determinou a instalação do Serviço Antiamarílico em Recife (Calheiros 1988 e Brasil 1999).

As medidas tomadas nos anos anteriores para extinguir a doença do Brasil foram diminuídas, o que causou o ressurgimento da febre amarela urbana (FAU) no Rio de Janeiro em 1928. Coube, então, ao professor Clementino Fraga organizar uma nova campanha contra a doença, cuja base era o combate ao mosquito na sua fase aquática, que culminou com a eliminação desta epidemia no Rio de Janeiro no ano de 1929 (Calheiros 1988).

Em 1931, o governo brasileiro assinou um convênio com a Fundação Rockefeller e desta forma, o Serviço de Profilaxia de Febre Amarela foi sendo estendido, ao longo dos anos, a todo o território brasileiro (Benchimol 2001, 2007). Em 1937, foi iniciada a utilização da vacina antiamarílica no Serviço de Profilaxia de Febre Amarela. Em 1938, foi demonstrado que os mosquitos silvestres *Haemagogus capricornii* e *Haemagogus leucocelaenus* poderiam ser transmissores da febre amarela silvestre (FAS) e, posteriormente, comprovou-se que *Haemagogus spegazzinii*, *Aedes scapularis*, *Aedes fluviatilis* e *Sabethes cloropterus* também eram transmissores silvestres (Brasil 1999).

Em 1940, foi proposta a erradicação do *Aedes aegypti* como resultado do sucesso alcançado pelo Brasil na erradicação do *Anopheles gambiae*, transmissor da malária. Em 1942, foram registrados os últimos 3 casos de FAU no Brasil, em Sena Madureira, no Acre. Em 1955, o último foco de *Aedes aegypti* no Brasil foi eliminado e, em 1958, na XV Conferência Sanitária Panamericana, realizada em Porto Rico, foi declarado que o *Aedes aegypti* estava erradicado do território brasileiro (Brasil 1999). A distribuição do *Aedes aegypti* nas Américas entre 1930 e 2001, é apresentada na Figura 1.1.

Entretanto, em 1967, houve a reintrodução do *Aedes aegypti* na cidade de Belém, capital do Pará. E, somente em 1973, o último foco do mosquito foi novamente eliminado. Assim, o vetor foi mais uma vez considerado erradicado do território brasileiro (Brasil 1999).

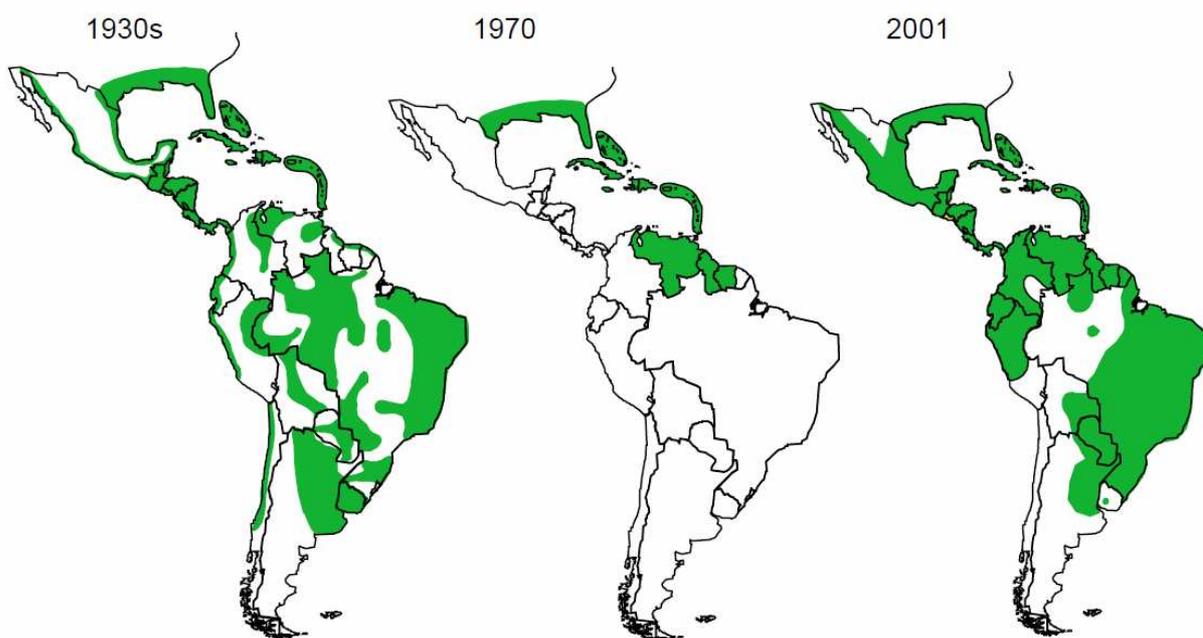


Figura 1.1. Distribuição do vetor urbano da febre amarela (*Aedes aegypti*) nas Américas: 1930, 1970 e 2001 (Gluber 2002).

Em 1976, houve nova reintrodução do vetor no Brasil, em Salvador e, nos anos seguintes, foi registrada a presença do vetor em quase todos os estados brasileiros, com exceção da região amazônica e extremo sul do país (Brasil 1999).

Em julho de 1986, foi encontrado pela primeira vez no Brasil o *Aedes albopictus*, em Itaguaí, estado do Rio de Janeiro. Esta espécie é considerada um vetor potencial da FA, funcionando como um elemento de ligação entre o ciclo selvagem e o urbano, e, atualmente, sua dispersão atinge cerca de 1.400 municípios brasileiros (Brasil 1999).

Embora a FAU não ocorra no Brasil desde 1942, considera-se crescente o risco de sua re-emergência devido ao crescimento demográfico nas zonas enzoóticas, a expansão dos centros urbanos a sua aproximação com áreas endêmicas, baixas coberturas vacinais, aumento do trânsito de pessoas entre áreas urbanas e de floresta, reintrodução e dispersão do *Aedes aegypti*, inclusive em regiões onde nunca havia sido encontrado. A situação é agravada pela possível resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas, dificultando a tomada de ações de vigilância e combate ao vetor, além do custo crescente dessas medidas (Brasil 1999, WHO 2000, Barrett *et al* 2007 e MS 2010).

1.1.2. Aspectos epidemiológicos

A FA é uma doença viral aguda, transmitida por mosquitos vetores infectados, que pode causar doença grave e morte. O vírus da FA é um membro da família *Flaviviridae* do gênero flavivírus (WHO 2000 e Brasil 2009c). A incidência da FA predomina nas zonas tropicais da África (Figura 1.2) e Américas (Figura 1.3) (Caride *et al* 2008). No Brasil, todas as regiões já apresentaram casos da doença, entretanto só há recomendação da vacina para a área verde do mapa (Figura 1.4). A letalidade da doença varia de 10% a 50% e pode chegar a 100% (Brasil 1999 e Monath 2004).



Figura 1.2. Mapa das áreas com e sem recomendação de vacina contra febre amarela na África, 2010. Para a população das áreas em amarelo, a vacinação é recomendada e para a população das áreas em cinza a vacinação não é recomendada. Para a população das áreas em vermelho, a vacinação contra a FA geralmente não é recomendada, entretanto a vacinação pode ser considerada para as pessoas que viajam para estas áreas e que estão em maior risco de exposição ao vírus devido a viagem prolongada, forte exposição aos mosquitos ou incapacidade para evitar picadas de mosquitos (Adaptado de CDC 2011).



Figura 1.3. Mapa das áreas com e sem recomendação de vacina contra febre amarela nas Américas, 2010. Para a população das áreas em amarelo, a vacinação é recomendada e para a população das áreas em cinza a vacinação não é recomendada. Para a população das áreas em vermelho, a vacinação contra a FA geralmente não é recomendada, entretanto a vacinação pode ser considerada para as pessoas que viajam para estas áreas e que estão em maior risco de exposição ao vírus devido a viagem prolongada, forte exposição aos mosquitos ou incapacidade para evitar picadas de mosquitos (adaptado de CDC 2011).

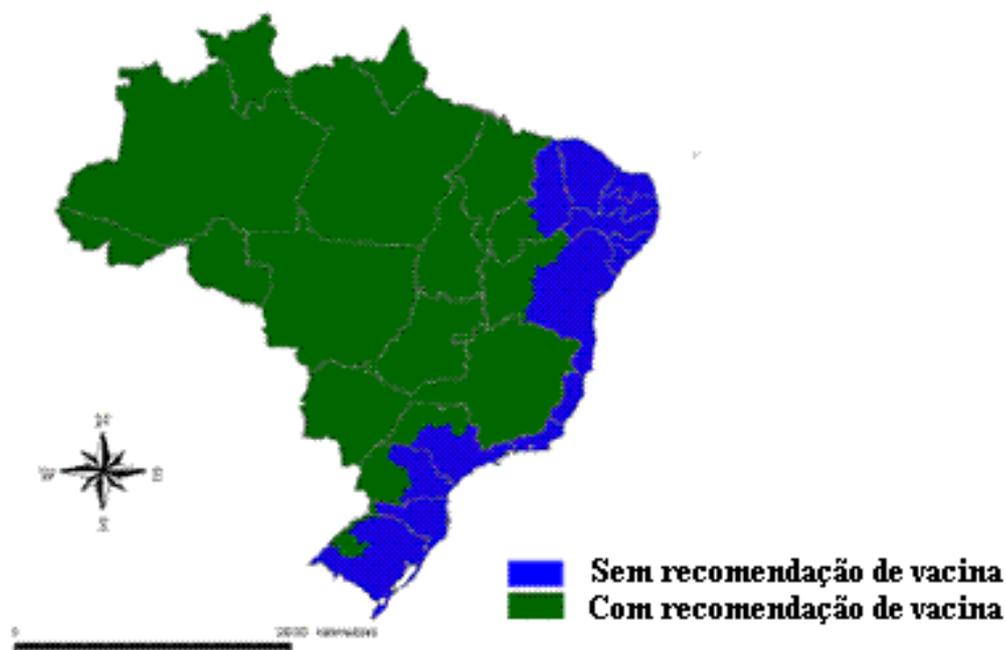


Figura 1.4. Mapa das áreas com e sem recomendação da vacina contra febre amarela no Brasil, 2008-2009 (MS 2009).

Aspectos epidemiológicos indicam a existência de duas formas da doença: a FAS e a FAU, que se distinguem no que diz respeito ao ciclo de manutenção, ou seja, o tipo de hospedeiro e espécies de vetores envolvidos na transmissão dessa arbovirose (“*arthropod-borne viruses*”) (Bier 1990 e Brasil 2009c).

A FAS é uma zoonose endêmica nas regiões tropicais da África e das Américas e tem caráter sazonal, ocorrendo com maior frequência entre os meses de janeiro a abril, quando fatores ambientais propiciam o aumento da densidade populacional dos vetores (Brasil 2009c e MS 2011). Por ser silvestre, é dificilmente erradicável, pois o vírus é mantido por um ciclo enzoótico entre mosquitos e macacos (Brasil 2005c). No Brasil, os principais vetores são os mosquitos da espécie *Haemagogus janthinomys* (Monath 2005 e Brasil 2009c), enquanto que os principais hospedeiros são os macacos dos gêneros *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix* (Brasil 2005c). Entre humanos, o aparecimento de casos é precedido de epizootias, que ocorre quando um grande número de macacos é acometido pela doença (Brasil 2009c).

Indivíduos não vacinados que entram em áreas endêmicas podem ser infectados com o vírus da FA pela picada de mosquitos infectados. Esses indivíduos, então hospedeiros, quando entram em área urbana, podem transmitir o vírus aos mosquitos da espécie *Aedes aegypti* - vetores urbanos da doença - dando início à FAU (Monath 2005, BM 2011 e WHO 2011).

Algumas ferramentas importantes, tais como erradicação dos vetores, vigilância epidemiológica e vacinação, podem ser utilizadas para dificultar a manifestação da FAU (Collier 2000 e Brasil 2005c). Historicamente, já foram realizadas várias campanhas com êxito na erradicação do mosquito *Aedes aegypti* da maioria dos centros urbanos do continente americano (Brasil 1999, Braga e Valle 2007 e WHO 2011). No entanto, esse vetor se reinstalou nessas áreas urbanas, tornando-as novamente suscetíveis à FAU (WHO 2011).

A vigilância epidemiológica tem desempenhado um papel importante na prevenção de surtos de FA em humanos. Segundo a Lei 8080/1990 (Brasil 1990), vigilância epidemiológica é um conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou a prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva e tem a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças e agravos (Brasil 1990). Fazem parte da vigilância epidemiológica, a vigilância de epizootias, entomológica e de casos humanos (Brasil 2005c).

O controle e a prevenção da FA podem ser realizados pela vacinação e pelo controle dos mosquitos vetores. A vacinação confere proteção individual e coletiva à população, bloqueia a propagação geográfica da doença, criando uma barreira de imunidade, e previne epidemias (MS 2005). Uma vez instalada a doença, o tratamento é somente sintomático, pois não existe nenhum tratamento específico e efetivo contra a doença FA (WHO 2011).

O controle dos mosquitos vetores pode ser realizado utilizando medidas para sua eliminação. Entre as medidas utilizadas, pode-se citar a eliminação de criadouros tendo como método de primeira escolha o controle mecânico como remoção e destruição; aplicação de larvicidas autorizados como medida complementar; o uso de repelentes e telas protetoras por parte da população; além da orientação da população com relação aos meios de evitar a proliferação dos vetores (Brasil 2001a e Romanos 2008).

1.1.3. Agente etiológico

Os flavivírus são vírus de 40 a 60 nm de fita simples de RNA de senso positivo, envelopados e esféricos. O genoma do vírus da FA é muito estável e contém 10.862 nucleotídeos (nt), composto de uma região não codificante (RNC) 5', uma única fase de leitura aberta (FLA) de 10.233 nt e uma RNC 3'. A FLA codifica uma poliproteína que dará origem a três proteínas estruturais (capsídeo [C], pré-membrana [pré-M] e envelope [E]) e sete não-estruturais. As proteínas estruturais fazem parte do “*virion*” maduro, enquanto que as proteínas não estruturais

são responsáveis pela replicação e processamento da poliproteína. Após a tradução completa da poliproteína no retículo endoplasmático rugoso, esta é clivada originando as proteínas virais (Lee *et al* 2000 e Monath 2004).

Os flavivírus se replicam após penetração na célula por um mecanismo denominado endocitose mediada por receptores, formando vesículas. Os nucleocapsídeos são liberados das vesículas diretamente no citoplasma, onde se fusionam com a membrana do retículo endoplasmático rugoso. O RNA de senso positivo é então traduzido através da síntese de uma fita de RNA complementar, a qual serve de molde para as demais fitas. Esse RNA codifica replicases, helicases e outras enzimas essenciais para a replicação, além de proteases envolvidas no processo pós-tradução e proteínas estruturais que formam o “*virion*”. As partículas virais são transportadas em vesículas intracelulares até a membrana plasmática, a partir da qual são liberadas pelo processo de exocitose (Lee *et al* 2000 e Monath 2004).

A virulência do vírus da FA é determinada por genes estruturais e não-estruturais. Mutações nos domínios I, II e III da proteína E têm sido associadas com atenuação da virulência dos flavivírus (Mandl *et al* 2000 e Monath 2004). Além disso, é importante salientar que mutações em sequências terminais envolvidas na clivagem da poliproteína também podem resultar em significativas atenuações da infecciosidade e virulência (Lee *et al* 2000 e Monath 2004).

A infecção do mosquito se inicia com a ingestão de sangue que, contendo uma concentração mínima de vírus, resulta na introdução do mesmo no epitélio do intestino. O vírus é então liberado na hemolinfa e espalha-se para outros tecidos, principalmente para o trato reprodutivo e glândulas salivares. Entre sete e dez dias após a ingestão, o vírus é secretado na saliva, o que torna o mosquito capaz de transmitir o agente infeccioso no momento em que se alimenta do sangue do hospedeiro. A infecção dos tecidos reprodutivos do mosquito permite a transmissão transovariana do vírus da FA (transmissão vertical), ou seja, as fêmeas podem infectar sua prole. Além disso, fêmeas infectadas podem contaminar machos através da copulação (Aitken *et al* 1979, Cornet *et al* 1979, Beaty *et al* 1980 e Monath 2004).

Turell (1988) demonstrou que o mosquito, ao se alimentar do sangue de um hospedeiro, inocula aproximadamente 10^3 “*virions*”. Estes vírus são depositados principalmente em células dendríticas da pele, iniciando a replicação. Entram no sistema linfático através do qual são levados até os linfonodos. Em indivíduos vacinados, a pequena quantidade de vírus inoculada encontrará anticorpos no transudato e na linfa, sugerindo que um baixo nível de imunidade é suficiente para proteger o hospedeiro da enfermidade (Monath *et al* 2002 e Monath 2004).

Outro fato interessante é que a expressão de anticorpos neutralizantes contra a FA em mosquitos é diferente da expressão em células de mamíferos. Esta diferença permite que mosquitos infectados com o vírus da FA impeçam que os anticorpos neutralizantes ingeridos através do sangue do hospedeiro tenham algum efeito (Barret *et al* 1990 e Monath 2004).

1.1.4. A vacina

A vacina febre amarela (atenuada) foi inicialmente desenvolvida nos Estados Unidos, em 1936, por meio da adaptação à passagem seriada do vírus selvagem em embriões de camundongos e ovos de galinha embrionados, dando origem a cepa 17D. Neste mesmo ano, iniciaram-se os estudos preliminares com esta vacina em humanos (Theiler e Smith 1937). Os resultados foram tão favoráveis que imediatamente iniciaram-se as vacinações na América do Sul (Smith *et al* 1938, Bica 1988 e Post *et al* 2001). No ano seguinte, a Fundação Rockefeller inaugurou o Serviço Especial de Profilaxia da Febre Amarela no campus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), onde foi iniciada a produção brasileira da vacina. O grupo de técnicos e pesquisadores brasileiros deste laboratório contribuiu para o aperfeiçoamento desta vacina (Bica 1988 e Benchimol 2007).

Apesar das polêmicas que desde então envolveram a vacina, ela constituiu um dos mais bem sucedidos empreendimentos na área dos imunobiológicos no Brasil. Ao longo do tempo as técnicas de fabricação foram aperfeiçoadas e o Brasil introduziu modificações importantes para incrementar o rendimento em várias fases do processo, especialmente no cultivo do vírus. Até meados de 1944, o laboratório esteve em constante desenvolvimento tecnológico e, em 1950, foi incorporado ao IOC que, em 1974, passaria a se chamar Fundação Oswaldo Cruz (Benchimol 2007).

Desde o final da década de 60, a vacina febre amarela (atenuada) constituiu a linha de produção mais bem sucedida daquele instituto. Ali era produzido o equivalente a 80% da produção mundial, suprimindo não somente às necessidades nacionais, como também às de outros países suscetíveis. Em 1976, criou-se o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) que seria responsável pela produção de vacinas bacterianas e virais e que assumiu a tarefa de continuar a produção da vacina para febre amarela (Benchimol 2007).

Bio-Manguinhos (BM) é o único produtor nacional que, além de suprir a demanda do Programa Nacional de Imunização (PNI), exporta o excedente para governos e instituições públicas estrangeiras. Em 2001, após a pré-qualificação da vacina pela Organização Mundial da

Saúde (OMS), passou a deter o direito de fornecê-la para as agências das Nações Unidas. Nestes últimos trinta anos, participou ativamente para aperfeiçoar tanto o processo de produção quanto o desenvolvimento tecnológico da vacina (Benchimol 2007).

A vacina febre amarela (atenuada) é considerada segura e eficaz, e proporciona, em 95% dos vacinados, imunidade efetiva contra a doença no prazo de uma semana (WHO 2011). Segundo o calendário básico de vacinação determinado pelo PNI, os bebês devem ser vacinados aos nove meses de idade e as demais faixas etárias a cada 10 anos. Entretanto, só é obrigatória para as populações que vivem em áreas endêmicas e para indivíduos que viajarão para estas áreas.

Segundo Poland *et al* (1981) e WHO (2011), uma única dose de vacina febre amarela (atenuada) pode fornecer proteção de 30 a 35 anos ou mais, e, provavelmente, para toda a vida, para a maioria dos vacinados. Embora sejam relatados efeitos adversos graves após a vacinação, o risco de morte pela própria doença é muito maior do que os riscos relacionados à vacinação (WHO 2011).

1.1.5. Produção da vacina em Bio-Manguinhos

A produção da vacina febre amarela (atenuada) é baseada no sistema de lote semente. Este sistema foi implementado com a finalidade de diminuir a variabilidade genética do vírus vacinal, limitando a um mínimo o número de passagens (WHO 1998, Benchimol 2001, Post *et al* 2001, Dias 2005, Marchevsky *et al* 2006 e EDQM 2008).

Desde 1944, a cepa 17DD E.P. (*egg passage*) é a única empregada em vacinações no Brasil (Benchimol 2001). Esta cepa é derivada de uma cepa Asibi após 195 passagens em cultura de células. O lote semente EPF374 representa a 281^o passagem do vírus Asibi em cultura e 38^o passagem consecutiva em ovo embrionado de galinha. Passagens subseqüentes realizadas exclusivamente em ovos embrionados deram origem ao lote semente E749 que, por sua vez, gerou o lote E774. Deste, 09 lotes semente foram produzidos - E-816, M1, M2, M3, M5, M6, P1, P2 e P3 – a partir da 41^o passagem em ovos. O lote semente primário P3 foi utilizado para preparar o lote semente secundário 102/84. Este lote semente secundário foi utilizado para produção de vacinas comerciais entre 1984 e 2002. Neste período, foi produzido o lote de vacina 993FB013Z, referente a 286^o passagem (43^o passagem em ovos) que foi denominado lote semente trabalho e atualmente é utilizado como fonte de vírus para a produção de vacinas febre amarela (atenuada) em BM (Figura 1.5) (Freire 2004 e Marchevsky *et al* 2006).

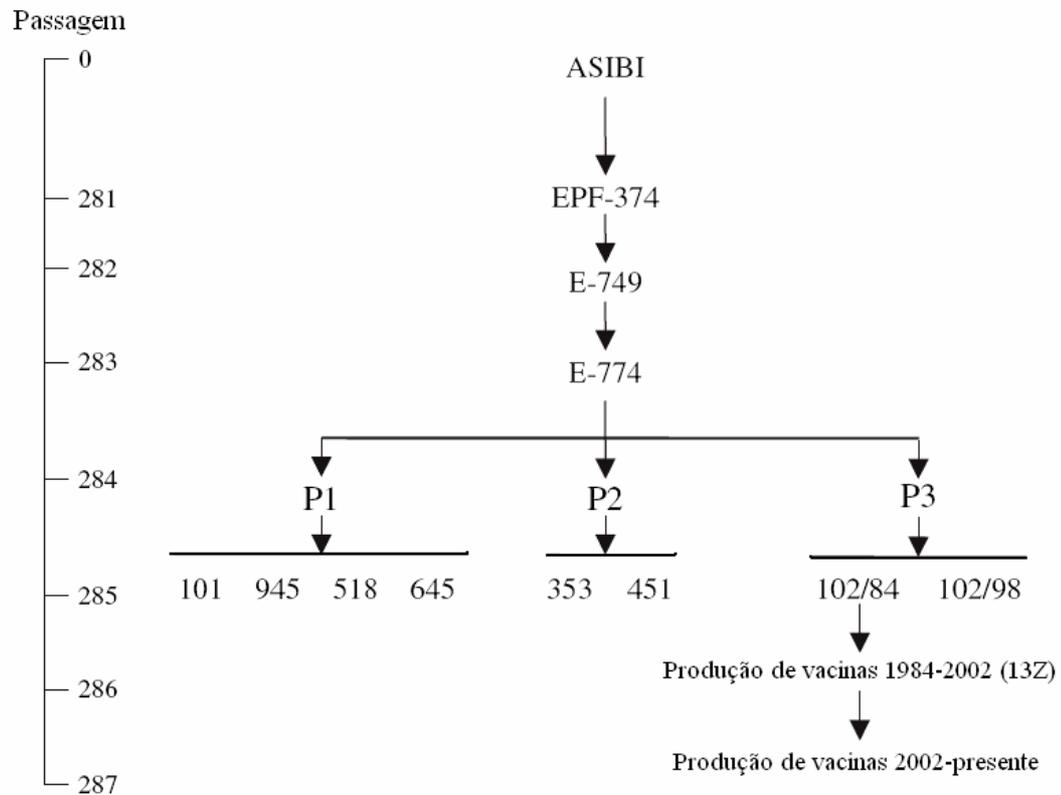


Figura 1.5. História das passagens dos vírus da febre amarela 17DD utilizados para a produção de vacinas no Brasil (adaptado de Marchevsky *et al* 2006).

A produção e controle da vacina febre amarela (atenuada) são realizados em diversas etapas, conforme representadas na Figura 1.6. Primeiramente, os ovos SPF (“*specific pathogen free*”) são incubados e após o 9º dia ocorre a inoculação do vírus. Após mais 03 dias de incubação, ocorre a coleta dos embriões, trituração e centrifugação, para separação da suspensão viral. Nesta etapa, são adicionados os estabilizadores, dando origem a suspensão viral estabilizada. Este produto intermediário deve ser testado pelo controle de qualidade (CQ) e, se aprovado, deve ser armazenado a -70°C por até 05 anos. Para produção do produto a granel, a suspensão viral estabilizada é descongelada e a ela são adicionados outros estabilizadores, além de antibióticos. Este produto também deve passar pelo CQ, e deve ser armazenado a $2-8^{\circ}\text{C}$ por até 24 horas. Após esta etapa, ocorre o envase do produto e posterior liofilização, dando origem ao produto terminado, que também é controlado pelo CQ. Após a aprovação pelo CQ, os frascos são rotulados e embalados (WHO 1998 e Brasil 2010b).

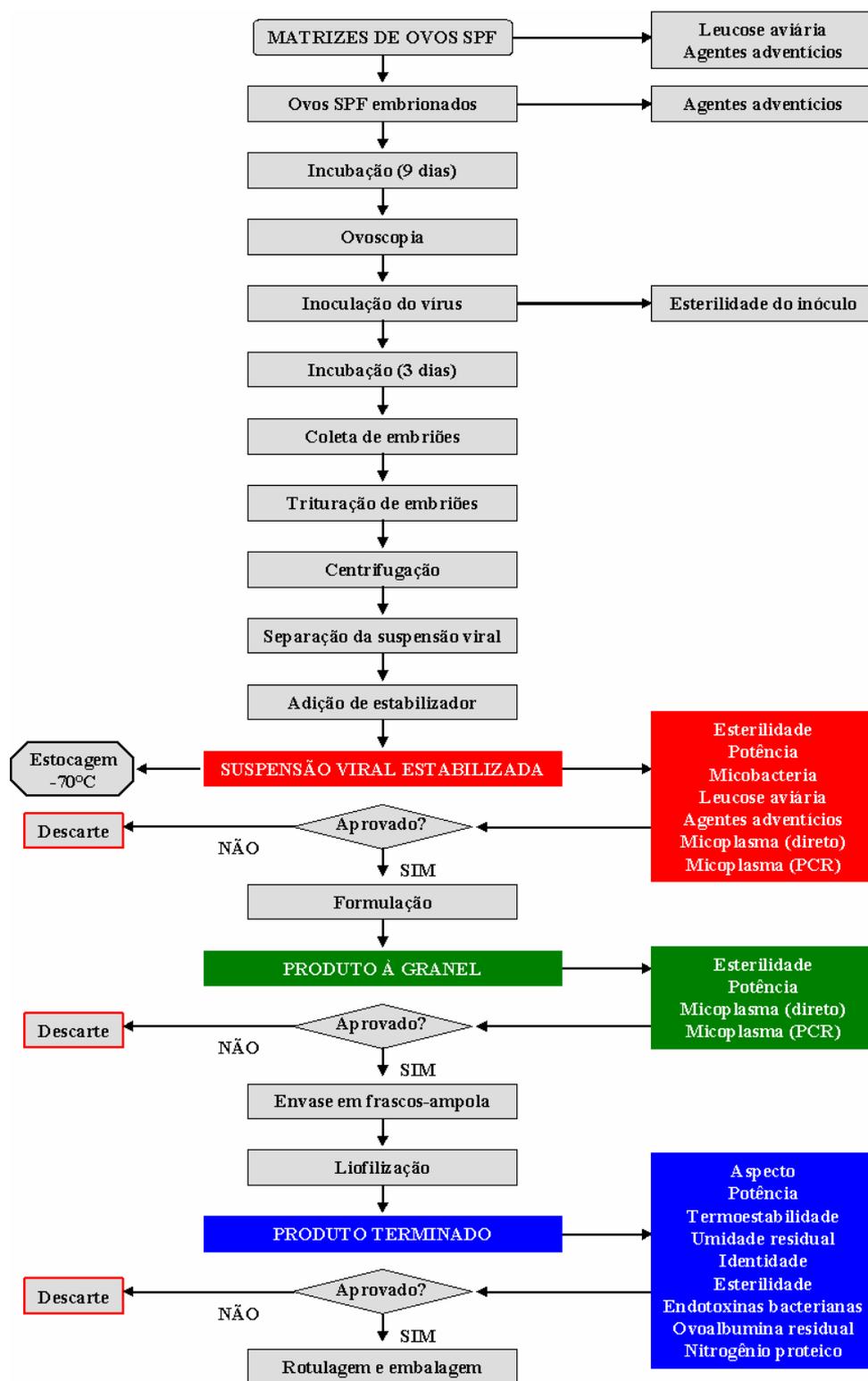


Figura 1.6. Fluxograma de produção e controle da vacina febre amarela (atenuada) em Bio-Manguinhos.

As especificações adotadas para a liberação do produto terminado de vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses estão descritas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Especificações da vacina febre amarela (atenuada).

Teste	Especificação
Aspecto	Forma liofilizada que após a reconstituição pode apresentar coloração
Potência	1000 DL ₅₀ equivalente a 3,73 UFP/dose ou 3,00 UI/dose
Termoestabilidade	Após permanecer por 14 dias armazenada a 37°C, a vacina deve estar com o título de 1000 DL ₅₀ equivalente a 3,73 UFP/dose ou 3,00 UI/dose e não menos que 1 log 10 em relação ao título da potência
Umidade residual	No máximo 3%
Identidade	Positivo
Esterilidade	Ausência de crescimento bacteriano e fúngico
Endotoxinas bacterianas	No máximo 10 UE/mL
Ovoalbumina residual	Menor ou igual a 5 µg/dose
Nitrogênio proteico	Menor ou igual a 0,25 mg/dose

O diluente utilizado na reconstituição das vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses é água esterilizada para injeção, que cumpre com as especificações adotadas pela Farmacopéia Brasileira, conforme descrito na Tabela 1.2. A água esterilizada para injeção é a *Água para injetáveis* que, após esterilização, foi armazenada em recipientes inertes, como o aço inox 316L polido, mantidos fechados, em temperatura de 80-85°C e sob recirculação, por um período máximo de 24 horas, em condições para assegurar que o produto ainda cumpre com o teste para endotoxinas bacterianas. A água esterilizada é livre da adição de qualquer substância (Brasil 2010b). Para isso, a água para injetáveis é coletada em dorna de aço inoxidável, filtrada e envasada em ampola de vidro neutro, lavado e despirogeneizado. Após o processo de envase, as ampolas são submetidas à esterilização por autoclavação. Posteriormente, são inspecionadas uma a uma em revisora automática e então liberadas pelo CQ (BM 2008).

Tabela 1.2. Especificações do diluente para vacina febre amarela (atenuada).

Teste	Especificação
Características	Líquido límpido, incolor, insípido e inodoro
Acidez	A solução não desenvolve coloração vermelha após a adição de vermelho de metila SI
Alcalinidade	A solução não desenvolve coloração azul após a adição de solução de azul de bromotimol SI
Substâncias oxidáveis	A solução remanescente é fracamente rosada após ser fervida com ácido sulfúrico e ser adicionado permanganato de potássio 0,02 M
Condutividade da água	No máximo 1,3 µS/cm a 25,0°C ± 0,5°C
Amônio	No máximo 0,2 ppm
Cálcio e magnésio	No máximo 1 ppm
Cloretos	A solução não apresenta alterações na aparência por, pelo menos, 15 minutos
Sulfatos	A solução não apresenta alterações na aparência por, pelo menos, 1 hora
Contaminação por partículas:	No máximo 6000 partículas maiores ou iguais a 10 µm
partículas sub-visíveis	No máximo 600 partículas maiores ou iguais a 25 µm
Endotoxinas bacterianas	No máximo 0,25 UI de endotoxinas por mL
Esterilidade	Ausência de crescimento bacteriano e fúngico

1.2. Estudos de estabilidade

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

Os estudos de estabilidade (EE) são realizados com a finalidade de fornecer evidências de como a qualidade do produto em questão varia com o tempo (ICH 2003a). Historicamente, os testes de estabilidade das vacinas eram baseados somente na sensibilidade destes produtos à temperatura (Jadhav *et al* 2009). Atualmente, a influência de outros fatores ambientais como umidade e luz, também pode ser avaliada. Além disso, os fatores relacionados ao próprio produto, como as propriedades físicas e químicas das substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica, composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, também devem ser considerados na avaliação final (ICH 2003a e Brasil 2005a). Com base nos dados obtidos, pode-se prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade dos produtos farmacêuticos além de suas condições ideais de armazenamento (ICH 2003a e Brasil 2005a).

1.2.1. Histórico e características da vacina febre amarela (atenuada) com relação a estabilidade

Há anos, estudos para verificação da termoestabilidade das diferentes formulações de vacina contra febre amarela vêm sendo realizados. Além da verificação da estabilidade, mudanças no processo produtivo e na formulação também tem sido realizados, com a finalidade de aumentar a sua termoestabilidade.

Burfoot *et al* (1977), demonstraram que amostras de vacinas contra febre amarela produzidas pelo “*Wellcome Laboratory*” com diferentes formulações de estabilizadores, apresentaram perda não significativa da infecciosidade após armazenamento a -20°C e a 4°C por 24 meses. As vacinas produzidas deste modo foram consideradas mais estáveis que as vacinas não estabilizadas comerciais já fabricadas pelo laboratório. Em 2000, Perraut *et al* (2000), utilizando amostras de vacinas produzidas pelo “*Institut Pasteur*”, em Dakar, Senegal,

demonstraram que este prazo poderia ser estendido para 36 meses, se os produtos fossem armazenados nestas duas temperaturas.

Ainda segundo Burfoot *et al* (1977), Finter *et al* (1978) e WHO (2006b), a vida média estimada da infecciosidade da vacina é de 3 a 10 meses em temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), de 10 a 20 dias a 37°C e cerca de 02 dias a 46°C.

Em 1987, outro estudo com 11 vacinas contra a febre amarela foi enviado à OMS pelos fabricantes do produto, o qual demonstrou uma grande diferença entre a estabilidade das vacinas. Neste estudo foi verificado que o número de dias necessário para reduzir o título inicial de 1000 unidades infecciosas, quando as vacinas foram mantidas a 37°C, variou de um a cinco dias em quatro vacinas, de 13 a 21 dias em duas vacinas, e de 38 a 146 dias em cinco vacinas. Dois produtos permaneceram estáveis com relação ao título de potência por 36 meses armazenados a 2-8°C, por 09 meses a 25°C e por 72 dias a 37°C (WHO 2006b).

Em 1990, Ishak e Howard (1990) realizaram testes de termoestabilidade com duas vacinas comerciais contra febre amarela. Uma fabricada em Bio-Manguinhos com a cepa 17DD (50 doses) e outra fabricada pela “*Wellcome Laboratory*” produzida com a cepa 17D-204 (unidade e 05 doses). Ambas foram testadas tanto em sua forma liofilizada – expostas a temperaturas de 31°C, 37°C e 45°C –, como em sua forma pós-reconstituída – expostas a temperaturas de 8°C, 21°C, 31°C e 37°C. Os resultados encontrados em UFP/dose foram analisados por regressão linear e os valores obtidos para a taxa de degradação foram inseridos na equação de Arrhenius e testados frente a outras temperaturas. Os resultados teóricos demonstraram que existia diferença na termoestabilidade entre as duas vacinas comerciais testadas na sua forma liofilizada, provavelmente devido a presença de estabilizadores e a produção mais moderna da vacina da “*Weelcome Laboratory*” (17D-204), quando comparada à vacina produzida em Bio-Manguinhos. Quando foram analisados os dados da vacina reconstituída 05 doses (cepa 17D-204), esta teria um prazo de validade estimado de mais de 06 dias se armazenada a 0°C.

No entanto, Burfoot *et al* (1977) e Ishak e Howard (1990) demonstraram também que quando a vacina reconstituída é exposta a temperaturas elevadas, se deteriora rapidamente. A 37°C, 31°C e 27°C, a vacina reconstituída perde 50% de sua infecciosidade após 1,5, 3,1 e 4,9 horas. A exposição da vacina reconstituída por uma hora a 46°C resultou em uma perda de 0,5 log 10, e após duas horas de exposição, a perda de infecciosidade ultrapassou 1 log 10 (Burfoot *et al* 1977). Independente da estabilidade das vacinas reconstituídas, é recomendável que, devido ao risco de contaminação, esses produtos sejam mantidos refrigerados e sejam descartados ao final de uma sessão de imunização de 6 horas (Brasil 2001b).

Em 1998, Adebayo *et al* (1998) testaram a termoestabilidade de vacinas contra febre amarela produzidas pelo “*Robert Koch Institut*”, em Berlim, utilizando 06 formulações diferentes de estabilizadores. As amostras foram incubadas a 37°C por até 28 dias e a 4°C por até 96 dias. As vacinas liofilizadas tiveram diferentes taxas de queda do título, dependendo da formulação de estabilizadores utilizada. Além disso, demonstraram que a vacina reconstituída deveria ser descartada após uma hora, pois é muito instável nestas condições.

Cada vez mais o desenvolvimento tem permitido a introdução de vacinas com maior estabilidade. A introdução de estabilizadores melhoraram consideravelmente a estabilidade térmica das vacinas contra febre amarela 17D liofilizadas. Essas vacinas estabilizadas podem ser empregadas com grande sucesso em campanhas de vacinação em diferentes condições no campo.

1.2.2. Tipos de estudos de estabilidade

Os EE podem ser divididos em longa duração, acelerado, estressado, pós-reconstituição e acompanhamento (ICH 1995, Brasil 2005a e WHO 2006a).

O EE de longa duração é projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade proposto. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento, que no caso da vacina febre amarela (atenuada) é de 24 meses, a 2-8°C ou a -20°C. Devem ser realizados os testes pertinentes à especificação do produto e a frequência mais comumente utilizada é 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses para os testes considerados mais críticos e, para aqueles considerados menos críticos, apresentar estudo no prazo de validade requerido comparativo ao momento zero. Outras frequências também podem ser utilizadas, devendo-se avaliar caso a caso (Brasil 2005a).

O EE acelerado é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento (por exemplo, 25°C). Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições normais. Além disso, estes estudos são necessários e podem fornecer dados importantes sobre a estabilidade de um determinado produto durante a etapa de desenvolvimento ou quando ocorrerem mudanças no processo produtivo. Devem ser realizados os testes pertinentes ao produto utilizando a seguinte frequência: 0, 3 e 6 meses para os ensaios considerados mais críticos e, para as demais provas, apresentar estudo aos 6 meses comparativo ao momento zero. Como no estudo de estabilidade de

longa duração, a frequência pode ser modificada analisando-se caso a caso (ICH 1995, Brasil 2005a e WHO 2006a).

O EE estressado é realizado para verificar o impacto das condições ambientais extremas, como temperaturas baixas ou altas e luz, na qualidade de um produto. Este estudo não é item obrigatório para registro do produto na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entretanto pode ser utilizado para fornecer dados relativos a estabilidade quando o produto permanece fora das condições ideais de armazenamento por períodos curtos, como durante o transporte (ICH 1995 e ICH 2003a).

O EE pós-reconstituição, aplicado aos produtos liofilizados, é realizado para estabelecer o tempo e a temperatura de armazenamento adequados, de modo a garantir a qualidade e eficácia do produto reconstituído com o diluente apropriado, fornecendo assim dado importante, no caso de vacinas multídose, para a jornada de imunização (ICH 1995).

O EE de acompanhamento é realizado para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos EE longa duração. Este estudo tem início assim que o EE longa duração é finalizado e os testes pertinentes ao produto devem ser realizados a cada 12 meses (Brasil 2005a).

O prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um EE longa duração de acordo com os parâmetros definidos na resolução pertinente. Por ocasião do registro, poderá ser concedido um prazo de validade provisório de 24 meses, se:

- (1) a ANVISA aprovar o relatório de EE longa duração de 12 meses, ou
- (2) a ANVISA aprovar o relatório de EE acelerado de 6 meses acompanhado dos resultados preliminares do EE longa duração, conforme parâmetros de temperatura e umidade pré-definidos (Brasil 2005a).

O prazo de validade deve ser confirmado mediante a apresentação de um relatório de EE longa duração, protocolado na forma de complementação de informações ao processo de registro. No caso de renovação do registro também é necessário apresentar EE (Brasil 2005a).

O estudo de acompanhamento somente poderá ser realizado se o produto não sofrer nenhuma alteração após a conclusão do EE de longa duração. Caso ocorra qualquer alteração no produto, uma investigação deverá ser realizada, e um novo EE longa duração poderá ser necessário (Brasil 2005a).

Os imunobiológicos como as vacinas fazem parte de uma classe heterogênea de produtos, e têm como princípio ativo proteínas, polissacarídeos, toxóides, antígenos de r-DNA (antígenos produzidos utilizando a tecnologia do DNA recombinante), além de microorganismos inativados

e vivos atenuados (WHO 2006a e Jadhav *et al* 2009). Considerando estas peculiaridades, os EE devem ser adaptados analisando-se caso a caso (WHO 2006a).

1.2.3. Legislação sobre estudos de estabilidade

Para que seja possível a comercialização de um medicamento, várias etapas devem ser seguidas. No Brasil, todas estas etapas, desde o desenvolvimento, passando pelo registro, fabricação e comercialização, são amparadas por atos regulatórios determinados pela ANVISA. O registro, por exemplo, é normatizado pela RDC 55/2010 (Brasil 2010c). Já as alterações pós-registro e revalidações de registro para produtos biológicos terminados são regulamentadas pela RDC 315/2005 (Brasil 2005b). O controle e a garantia da qualidade durante o processo de fabricação, por sua vez, são regulamentados pela RDC 17/2010 (Brasil 2010a), a qual revogou a RDC 210/2003.

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

Entretanto, a RE 1/2005 (Brasil 2005a) não é específica para produtos biológicos e, por isso, seguindo a tendência mundial, a ANVISA lançou em 4 de novembro de 2009 a Consulta Pública (CP) nº 72 (Brasil 2009b). Esta CP traz uma proposta de resolução que dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos.

Enquanto esta legislação não é publicada, a ANVISA utiliza os critérios internacionalmente estabelecidos pelo Mercosul e pela OMS. Como referências complementares, são considerados os critérios estabelecidos pelo EMA, ICH e FDA. Algumas das legislações internacionais existentes que tratam do assunto EE são as seguintes:

(1) ICH Q1A (R2): “*Stability Testing of New Drug Substances and Products*” (ICH 2003a).

(2) ICH Q1B: “*Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products*” (ICH 1996a).

(3) ICH Q1C: “*Stability Testing for New Dosage Forms*” (ICH 1996b).

(4) ICH Q1D: “*Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drugs Substances and Products*” (ICH 2002).

(5) ICH Q1E: “*Evaluation of Stability Data*” (ICH 2003b).

(6) ICH Q1F: “*Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV*” (ICH 2003c).

(7) ICH Q5C: “*Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products*” (ICH 1995).

(8) “*Guidelines on Stability Evaluation of Vaccines*” (WHO 2006a).

Estes guias são mais específicos e estabelecem as condições sob as quais os estudos de estabilidade devem ser realizados, levando em consideração as características dos produtos biológicos. Além disso, o Guia Q1E/2003 (ICH 2003b) é específico para a análise estatística dos dados de estabilidade, assunto que não é abordado pela RE 1/2005 (Brasil 2005a).

1.3. Demanda nacional e internacional de vacina febre amarela (atenuada)

A FA é um dos grandes problemas de saúde pública no mundo (Barrett *et al* 2007). Na África, onde tem maior disseminação, é endêmica em 34 países. Na América do Sul, sua ocorrência tem sido registrada em 09 países, nos últimos 20 anos: Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Venezuela e Argentina (MS 2011).

O Brasil possui a maior área enzoótica de FA do mundo e no período de 1990 a 2010 ocorreram 587 casos com 259 óbitos. O maior número de casos ocorreu em Minas Gerais (n=104), seguido do Maranhão (n=90), Goiás (n=88), Pará (n=84), e Amazonas (n=43), entretanto foram registrados casos também nos estados do Acre, Roraima, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, São Paulo, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e no Distrito Federal (MS 2011).

A Tabela 1.3 apresenta o quantitativo de doses de vacina febre amarela (atenuada) 05, 10 e 50 doses entregue por BM ao Ministério da Saúde (MS) e o quantitativo exportado, desde 1987 até 2010.

Tabela 1.3. Quantitativo de doses de vacina febre amarela (atenuada) 05, 10 e 50 doses entregue por Bio-Manguinhos ao Ministério da Saúde e o quantitativo exportado, desde 1987 até 2010.

Ano	Mercado Interno (quantidade de doses)				Mercado Externo (quantidade de doses)			
	05 doses	10 doses	50 doses	Total / ano	05 doses	10 doses	50 doses	Total / ano
1987	X	x	28.000.000	28.000.000	X	x	x	X
1988	x	x	5.000.000	5.000.000	X	x	x	X
1989	x	x	10.000.000	10.000.000	X	x	x	X
1990	x	x	6.000.000	6.000.000	X	x	x	X
1991	x	x	17.994.000	17.994.000	X	x	x	X
1992	x	x	8.800.000	8.800.000	X	x	x	X
1993	x	x	18.239.000	18.239.000	X	x	x	X
1994	x	x	20.977.000	20.977.000	X	x	x	X
1995	x	x	7.979.000	7.979.000	X	x	x	X
1996	x	x	10.080.000	10.080.000	X	x	x	X
1997	x	x	24.402.000	24.402.000	X	x	x	x
1998	x	x	53.440.000	53.440.000	X	x	x	x
1999	x	x	65.000.000	65.000.000	X	x	x	x
2000	6.051.000	x	32.386.650	38.437.650	X	x	x	x
2001	1.173.300	x	9.283.900	10.457.200	82.000	x	150.000	232.000
2002	10.141.145	x	2.883.600	13.024.745	3.171.900	x	2.188.700	5.360.600
2003	29.120.250	x	x	29.120.250	7.856.150	x	1.100.000	8.956.150
2004	15.879.750	x	x	15.879.750	26.310.100	x	150.000	26.460.100
2005	x	x	x	x	22.061.150	x	940.000	23.001.150
2006	6.796.050	x	x	6.796.050	13.040.950	x	x	13.040.950
2007	9.469.850	x	x	9.469.850	14.170.150	x	3.000.000	17.170.150
2008	15.609.170	3.837.400	12.079.550	31.526.120	3.912.250	3.451.000	1.693.500	9.056.750
2009	16.852.370	9.193.100	5.597.950	31.643.420	4.059.400	6.493.600	4.000.000	14.553.000
2010	16.717.650	11.798.500	x	28.516.150	X	1.554.900	z	1.554.900
Total	127.810.535	24.829.000	338.142.650		94.664.050	11.499.500	13.222.200	

Até 2011, o MS vinha solicitando em torno de 15 milhões de doses anuais, para possibilitar a vacinação da população de áreas endêmicas. Entretanto, com a ampliação da região endêmica, vem aumentando a solicitação para 30 milhões de doses anuais, com a possibilidade de um incremento para até 50 milhões de doses anuais (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Quantitativo de doses de vacina febre amarela (atenuada) 05, 10 e 50 doses solicitados pelo Ministério da Saúde e para exportação, de 2011 até 2020.

Ano	Mercado Interno (quantidade de doses)				Mercado Externo (quantidade de doses)			
	05 doses	10 doses	50 doses	Total / ano	05 doses	10 doses	50 doses	Total / ano
2011	8.123.500	2.611.125	3.771.625	14.506.250	X	2.100.000	x	2.100.000
2012	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	12.000.000	10.000.000	x	22.000.000
2013	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	12.000.000	10.000.000	x	22.000.000
2014	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	20.000.000	10.000.000	20.000.000	50.000.000
2015	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	20.000.000	10.000.000	x	30.000.000
2016	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	25.000.000	10.000.000	20.000.000	55.000.000
2017	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	20.000.000	10.000.000	x	30.000.000
2018	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	20.000.000	10.000.000	x	30.000.000
2019	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	20.000.000	10.000.000	x	30.000.000
2020	18.900.000	9.000.000	2.100.000	30.000.000	20.000.000	10.000.000	x	30.000.000
Total	178.223.500	83.611.125	22.671.625		169.000.000	92.100.000	40.000.000	

O aumento do quantitativo solicitado pelo MS e para exportação a partir de 2011 é um dos motivos que leva à discussão da formação de um estoque estratégico de vacina febre amarela (atenuada) 5 e 10 doses, o que seria de extrema importância, principalmente, em casos de surtos e epidemia da doença e possibilitaria a imunização imediata da população sob ameaça.

Para garantir o suprimento desta vacina em momentos de maior demanda, além de aumentar a oferta e melhorar o aproveitamento de doses distribuídas evitando o desperdício de uma vacina estável, o aumento do prazo de validade deste produto de 24 para 36 meses é de extrema importância. Desta forma, BM teria condições de manter um estoque estratégico e ainda ofertar vacina com maior capacidade de uso, suprimindo toda a demanda do MS, Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e da OMS, os quais distribuem esta vacina, respectivamente, para o Brasil, as Américas e a África.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a possibilidade de extensão do prazo de validade das vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses de 24 para 36 meses quando armazenadas às temperaturas de -20°C e 2-8°C.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses liofilizada, armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses, com base nos resultados de potência, termoestabilidade e umidade residual.
- Verificar se os parâmetros menos críticos – identidade, esterilidade, endotoxinas bacterianas, ovoalbumina residual e nitrogênio proteico – da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses liofilizada são mantidos de acordo com as respectivas especificações, após 48 meses armazenada a -20°C e a 2-8°C.
- Avaliar a estabilidade pós-reconstituição de amostras da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenadas por 06 meses na sua forma liofilizada, comparando-se os resultados de potência e esterilidade com aqueles obtidos nas amostras que permaneceram por 48 meses armazenadas na sua forma liofilizada às temperaturas de -20°C e 2-8°C.
- Avaliar a estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses liofilizada armazenada a -20°C por 36 meses, analisando-se resultados de potência.
- Avaliar a estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses liofilizada armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses, analisando-se resultados de potência.
- Comparar a estabilidade de ambas as apresentações da vacina febre amarela (atenuada) mantidas a -20°C e a 2-8°C.

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção dos dados

Para a análise da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses, foram avaliados dados retrospectivos e atuais de estudos de estabilidade longa duração e de estudos de estabilidade pós-reconstituição.

O estudo de estabilidade longa duração da vacina 10 doses foi iniciado em 2006 e concluído em 2008, gerando dados de amostras armazenadas por 24 meses a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$. Visando o objetivo deste trabalho, as amostras continuaram armazenadas nas mesmas temperaturas por mais 24 meses, totalizando 48 meses de armazenamento a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$, e novos dados foram gerados nos anos de 2009 e 2010. Além disso, foram avaliados dados de estudos pós-reconstituição, obtidos em 2006, quando as amostras permaneceram na sua forma reconstituída armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 08 horas, assim como dados gerados em 2010.

Para a análise da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses, foram avaliados dados retrospectivos de estudos de acompanhamento anual da estabilidade realizados com lotes produzidos nos anos de 2003, 2004, 2005 e 2006 e armazenados a -20°C por 36 meses. Estes estudos foram concluídos, respectivamente, em 2006, 2007, 2008 e 2009. Além disso, lotes de vacina 05 doses produzidos entre 2005 e 2006 e armazenados a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$ foram selecionados do arquivo de retenção para realização, respectivamente, em 2009 e 2010, do teste de potência, o qual é considerado o parâmetro mais crítico dentre os ensaios quantitativos realizados na vacina.

3.2. Amostras e vacina de referência

Para a realização dos estudos de estabilidade longa duração e pós-reconstituição da vacina 10 doses foram selecionadas amostras de 03 lotes. São eles: 067VFC001Z, 067VFC002Z e 067VFC003Z.

Para a realização dos estudos de acompanhamento anual da estabilidade da vacina 05 doses foram selecionados amostras de 10 lotes, os quais são 037VFA063Z, 038VFA076Z, 03PVFA137Z, 049VFA108P, 04UVFA156Z, 04UVFA158Z, 05PVFA135Z, 05UVFA142Z, 06UVFA130Z e 06UVFA132Z.

Para a realização dos estudos complementares de acompanhamento da estabilidade da vacina 05 doses foram selecionados outros 20 lotes. São eles: 05OVFA119Z, 05OVFA120Z, 05OVFA121Z, 05OVFA122Z, 05OVFA123Z, 05PVFA128Z, 05PVFA129Z, 05PVFA130Z, 05PVFA131Z, 05PVFA132Z, 05UVFA141Z, 05UVFA143Z, 05UVFA144Z, 05UVFA145Z, 05UVFA146Z, 061VFA001Z, 061VFA002Z, 061VFA003Z, 061VFA004Z e 061VFA005Z.

O lote de vacina referência “*in house*” utilizado nos testes de potência e termoestabilidade foi o 004 / Bio-Manguinhos. Este lote é um lote comercial de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses, originalmente codificado como 027VFA036Z e produzido em 2002.

O diluente utilizado foi água esterilizada para injeção, o qual é o mesmo indicado para reconstituição da vacina na rotina de vacinação. As amostras de vacina 10 doses foram reconstituídas com 5,0 mL enquanto que as de vacina 05 doses, com 2,5 mL.

3.3. Protocolo do estudo

3.3.1. Estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses

A vacina 10 doses, registrada na ANVISA em 2007, teve seu estudo de estabilidade longa duração finalizado em 2008. Entretanto, como haviam amostras armazenadas nas temperaturas a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$ suficientes para avaliar por mais 24 meses, o estudo foi estendido até o ano de 2010, totalizando 48 meses de armazenamento nas respectivas temperaturas. O estudo foi realizado conforme Tabela 3.1.

Na época da liberação do produto (T_0), amostras dos 03 lotes de vacina 10 doses foram enviadas pela Seção de Amostragem (SEAMO) aos laboratórios do Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA), para aprovação pelo CQ. Foram realizados todos os testes descritos na Tabela 1.1 e os 03 lotes foram aprovados pelo CQ.

A cada período subsequente, outras amostras foram enviadas pela SEAMO para os respectivos laboratórios do DEQUA, para realização dos testes. Os testes de potência, termoestabilidade e umidade residual foram os parâmetros quantitativos críticos avaliados neste estudo. Os respectivos procedimentos de teste estão descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

Tabela 3.1. Matriz do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses para as amostras armazenadas a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.

Testes	Tempo (meses)											
	T0	T3	T6	T9	T12	T15	T18	T24	T30	T36	T42	T48
	Jul 2006	Out 2006	Jan 2007	Abr 2007	Jul 2007	Out 2007	Jan 2008	Jul 2008	Jan 2009	Jul 2009	Jan 2010	Jul 2010
Potência												
Termoestabilidade												
Umidade Residual												
Identidade												
Esterilidade												
Endotoxinas bacterianas												
Ovoalbumina residual												
Nitrogênio proteico												

T0 Testes realizados na liberação do produto pelo Controle de Qualidade (CQ).

 Testes realizados nestes tempos.

 Testes alternados por lote/tempo.

 Testes não previstos para estes tempos.

3.3.2. Estudo de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses

No caso da vacina 05 doses, foi possível utilizar dados retrospectivos do estudo de acompanhamento anual da estabilidade, realizado entre 2003 e 2009, cujos 10 lotes foram mantidos a -20°C por 36 meses. O parâmetro de análise estudado neste caso foi o teste de potência e o estudo foi realizado conforme Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Teste de potência utilizado no estudo de acompanhamento anual da estabilidade das amostras de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses, armazenadas a -20C por 36 meses.

Lotes	Tempo (meses)			
	T0	T12	T24	T36
037VFA063Z	Jul / 2003	Jul / 2004	Jul / 2005	Jul / 2006
038VFA076Z	Ago / 2003	Ago / 2004	Ago / 2005	Ago / 2006
03PVFA137Z	Nov / 2003	Nov / 2004	Nov / 2005	Nov / 2006
049VFA108P	Set / 2004	Set / 2005	Set / 2006	Set / 2007
04UVFA156Z	Dez / 2004	Dez / 2005	Dez / 2006	Dez / 2007
04UVFA158Z	Dez / 2004	Dez / 2005	Dez / 2006	Dez / 2007
05PVFA135Z	Nov / 2005	Nov / 2006	Nov / 2007	Nov / 2008
05UVFA142Z	Dez / 2005	Dez / 2006	Dez / 2007	Dez / 2008
06UVFA130Z	Dez / 2006	Dez / 2007	Dez / 2008	Dez / 2009
06UVFA132Z	Dez / 2006	Dez / 2007	Dez / 2008	Dez / 2009

T0 Testes realizados na liberação do produto pelo Controle de Qualidade (CQ).

 Testes realizados nestes tempos.

Para complementar o estudo e alcançar 48 meses de armazenamento (T48) às temperaturas de -20°C e 2-8°C, 20 lotes produzidos entre 2005 e 2006 e aprovados pelo controle de qualidade, foram selecionados do arquivo de retenção e submetidos a retestes entre 2009 e 2010, para verificação da potência (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade das amostras de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses, armazenadas a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.

Lotes	Tempo (meses)	
	T0	T48
05OVFA119Z	Out/2005	Out/2009
05OVFA120Z	Out/2005	Out/2009
05OVFA121Z	Out/2005	Out/2009
05OVFA122Z	Out/2005	Out/2009
05OVFA123Z	Out/2005	Out/2009
05PVFA128Z	Nov/2005	Nov/2009
05PVFA129Z	Nov/2005	Nov/2009
05PVFA130Z	Nov/2005	Nov/2009
05PVFA131Z	Nov/2005	Nov/2009
05PVFA132Z	Nov/2005	Nov/2009
05UVFA141Z	Dez/2005	Dez/2009
05UVFA143Z	Dez/2005	Dez/2009
05UVFA144Z	Dez/2005	Dez/2009
05UVFA145Z	Dez/2005	Dez/2009
05UVFA146Z	Dez/2005	Dez/2009
061VFA001Z	Jan/2006	Jan/2010
061VFA002Z	Jan/2006	Jan/2010
061VFA003Z	Jan/2006	Jan/2010
061VFA004Z	Jan/2006	Jan/2010
061VFA005Z	Jan/2006	Jan/2010

T0 Testes realizados na liberação do produto pelo Controle de Qualidade (CQ).

Testes realizados nestes tempos.

3.3.3. Estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses

O estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina 10 doses, para fins de registro foi realizado em 2006 conforme Tabela 3.4, o qual consta o procedimento de uso e sua validade na bula deste produto.

Tabela 3.4. Matriz do estudo de estabilidade pós-reconstituição realizado no ano de 2006, com amostras de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenadas na sua forma liofilizada por 06 meses a 2-8°C e posteriormente armazenados na sua forma reconstituída por mais 08 horas a 2-8°C.

Testes	Tempo (horas)			
	T0	T3	T6	T8
Potência				
Esterilidade				

T0 Testes realizados na liberação do produto pelo Controle de Qualidade (CQ).

Testes realizados nestes tempos.

Para comprovar a estabilidade da vacina após 48 meses de armazenamento na sua forma liofilizada a -20°C e a 2-8°C, foi realizado novamente o estudo pós-reconstituição, conforme Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Matriz do estudo de estabilidade pós-reconstituição realizado no ano de 2010, com amostras de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenadas na sua forma liofilizada por 48 meses a -20°C e a 2-8°C.

Testes	Tempo (horas)			
	T0	T3	T6	T8
Potência				
Esterilidade				

T0 Testes realizados na liberação do produto pelo Controle de Qualidade (CQ).

Testes realizados nestes tempos.

Para a realização deste estudo, 28 amostras foram reconstituídas com o diluente água esterilizada para injeção em uma bancada do laboratório, fora da cabina de segurança biológica, simulando o procedimento realizado nos postos de saúde. Dentre as amostras, 16 foram segregadas para determinação da potência e 12 para esterilidade (Figura 3.1).

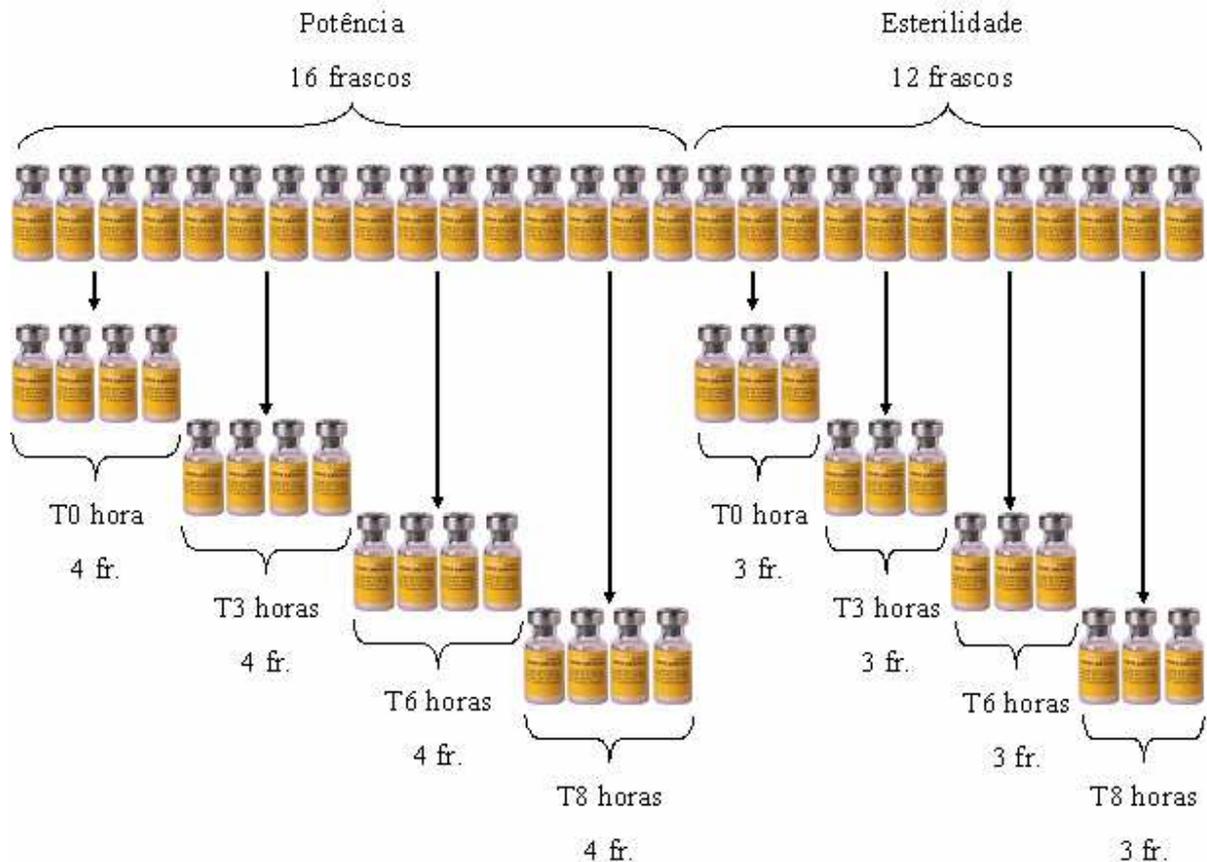


Figura 3.1. Esquema para realização do estudo de estabilidade pós-reconstituição das amostras de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses, armazenadas, após sua reconstituição, a 2-8°C por 08 horas.

No momento da reconstituição (T0), 04 amostras foram enviadas à Seção de Potência (SEPOT) para determinação da potência e 03 foram enviadas à Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN) para teste de esterilidade. Os procedimentos dos testes estão descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.3, respectivamente. As demais amostras foram armazenadas a 2-8°C.

Após 03 horas de armazenamento a 2-8°C, outras 04 amostras foram enviadas ao SEPOT e 03 para o SEPIN, para realização dos testes referentes ao T3. Após 06 e 08 horas, foram realizados os mesmos procedimentos, referentes aos T6 e T8.

3.4. Testes críticos realizados durante o estudo de estabilidade

Nos itens a seguir, estão descritos minuciosamente todos os ensaios críticos realizados para avaliar a estabilidade das vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses. São eles: potência, termoestabilidade, umidade residual e esterilidade. Os resultados dos demais testes foram

considerados para verificar a qualidade do produto ao final do prazo de validade proposto, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (Brasil 2010b).

3.4.1. Determinação da potência e termoestabilidade

O objetivo deste teste é determinar a concentração de partículas virais na vacina febre amarela (atenuada) e a perda de título após armazenamento por 14 dias a 37°C. Para isso, o teste foi realizado de acordo com o “DI 0183 - Determinação da potência do produto acabado a granel, produto final e termoestabilidade da vacina contra febre amarela de 5, 10 e 50 doses”.

3.4.1.1. Método de Unidades Formadoras de Placas (UFP)

Para a realização do teste de potência, 04 frascos da vacina liofilizada foram submetidos ao método de unidades formadoras de placas (UFP). Em paralelo, foi titulado um frasco de vacina de referência in house, de potência conhecida, calibrado com o padrão internacional. A vacina foi reconstituída com água esterilizada para injeção e diluída aplicando-se fator 4. Inoculou-se cada diluição em, pelo menos, três orifícios em placas de 06 orifícios contendo células Vero previamente cultivadas em monocamada. A concentração da linhagem celular pode variar de 150.000 a 300.000 células por mL, conforme o dia de sua utilização, e a monocamada deve estar uniforme e íntegra. Após o período de adsorção do vírus, o inóculo de cada poço foi aspirado e então foi adicionado meio de cultura contendo carboximetilcelulose a 3%. As células foram incubadas por sete dias, à temperatura de 37°C, em ambiente de CO₂ a 5% e umidade relativa de 95%. Após o período de incubação, as células foram fixadas com formaldeído a 3% por 20 minutos e lavadas por imersão em água corrente. Em seguida, foram coradas com cristal violeta a 1% por 20 minutos, lavadas por imersão em água corrente e secas para contagem das placas. A potência da vacina foi calculada pela média do número de placas de, pelo menos, duas diluições e o resultado foi expresso em log 10 UFP/dose.

Para a determinação ser considerada válida, é necessário que: (1) o controle de cultura de células apresente monocamada inalterada, (2) a variação de potência entre as duas amostras da vacina não seja maior que 0,5 log 10 UFP, (3) a potência da vacina de referência não varie mais que 0,5 log 10 UFP do seu título médio, e (4) o número de UFP seja decrescente em relação as diluições crescentes.

O título da vacina referência em UFP também foi calculado e teve como função validar o teste realizado e determinar o título da vacina teste em unidades internacionais por dose (UI/dose).

Para a realização do teste de termoestabilidade, 04 frascos de vacina liofilizada foram armazenados por 14 dias a 37°C. Após este período, foram testados conforme descrito acima, juntamente com as amostras armazenadas de forma convencional.

A média dos títulos encontrados para as amostras armazenadas a 37°C foi comparada com a média encontrada para as amostras armazenadas a -20°C e a 2-8°C, a fim de verificar a termodegradação, que constitui um dos parâmetros para liberação deste produto.

3.4.1.2. Vacina de referência

Os resultados dos testes de potência e termoestabilidade da vacina febre amarela (atenuada) geralmente são quantificados em UFP/dose equivalente em DL₅₀/dose. Entretanto, em 2003, foi realizado um estudo colaborativo que sugeriu a adoção de unidades internacionais (UI) para expressar os resultados de potência e termoestabilidade, devido a várias razões (Ferguson e Heath 2004). São elas:

(1) A exigência da potência mínima atual é de 1000 DL₅₀ por dose. Entretanto, muitos laboratórios produtores de vacina febre amarela (atenuada) testam a potência de seus lotes em cultura de células (UFP). Esta prática requer análise periódica, em animais, das vacinas de referência utilizadas nos testes em cultura de células, a fim de determinar a relação entre DL₅₀ e UFP;

(2) Os resultados de um estudo colaborativo internacional para avaliar a adequação de um candidato como vacina referência internacional de FA, mostraram uma significativa variabilidade interlaboratorial nos títulos expressos em DL₅₀. Contudo, as potências determinadas em ensaios de placa e expressas em UI não indicaram variações tão significativas;

(3) As especificações para liberação de vacinas produzidas por diferentes laboratórios variam consideravelmente, já que a relação entre DL₅₀ e UFP é diferente para cada produtor. Esta variação poderia ser mais limitada se os laboratórios utilizassem resultados expressos em UI/dose (WHO 2008).

O lote da vacina referência “*in house*” utilizado atualmente para análise dos lotes comerciais de vacina febre amarela (atenuada) de BM é identificado como 004 / Bio-Manguinhos. O título nominal desta vacina foi obtido frente à vacina de referência internacional

de FA do “*National Institute for Biological Standards and Control*” (NIBSC), cujo título nominal é de 4,5 log 10 UI/mL, correspondendo a 4,2 log 10 UI/dose (Ferguson e Heath 2004 e NIBSC 2010).

O primeiro padrão internacional de vacina febre amarela (atenuada), código NIBSC 99/616, foi estabelecido como o primeiro padrão internacional de vacina febre amarela (atenuada) pelo “*Expert Committee of Biological Standards*” da OMS. Esta vacina foi produzida a partir de um produto a granel típico derivado da cepa 17D-204 e deve ser armazenadas a -20°C (Ferguson e Heath 2004 e NIBSC 2010).

Para validar a vacina de referência 004 / Bio-Manguinhos, foram realizados 22 testes de potência. Em cada teste foram analisados a vacina referência “*in house*”, a vacina de referência internacional (NIBSC) e um lote comercial, conforme recomendação da OMS (NIBSC 2010).

O título médio encontrado para a vacina de referência internacional (NIBSC) foi 4,48 log 10 UFP/dose, correspondendo a 4,20 log 10 UI/dose, enquanto que a média dos títulos obtidos na vacina referência “*in house*” 004 / Bio-Manguinhos foi 4,81 UFP/dose. Portanto, considerando-se a relação de 0,33 entre ambas, foi possível atribuir um valor equivalente a 4,53 log 10 UI/dose para a vacina referência “*in house*”.

Esta relação foi utilizada para ajuste dos resultados encontrados nos testes de potência e termoestabilidade do estudo de estabilidade, conforme descrito abaixo:

$$[\text{Título LT (log UFP/dose)} - \text{Título VR (log UFP/dose)}] + 4,53 \text{ UI/dose} = \text{Título LT (UI/dose)}$$

onde

LT = lote teste

VR = vacina referência “*in house*” 004 / Bio-Manguinhos

3.4.1.3. Critério de aceitação

O título da potência e da termoestabilidade é dado a partir da média geométrica das determinações realizadas. Considerando que a relação entre DL₅₀ e UFP determinada em BM é de 0,73, o título médio dos frascos de vacina acondicionados às temperaturas de -20°C, 2-8°C e 37°C deve ser maior que 3,73 log 10 UFP/dose, que é equivalente a 1000 DL₅₀ em camundongos e a 3,00 log 10 UI/dose.

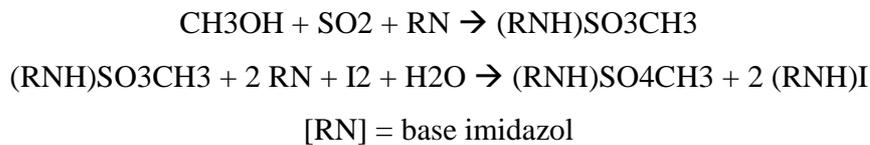
Além disso, a média encontrada para termoestabilidade não deve apresentar diferença maior de 1 logaritmo quando comparado com a média encontrada para a potência nas temperaturas -20°C e 2-8°C.

3.4.2. Determinação da umidade residual

O objetivo deste teste é determinar a umidade residual no líófilo da vacina febre amarela (atenuada). Para isso, o teste foi realizado de acordo com o “DI 1037 - Determinação da umidade residual”, que descreve o método de Karl Fischer, utilizado para a determinação da umidade residual de vacinas febre amarela (atenuada) em sua forma liofilizada.

3.4.2.1. Método de Karl Fischer

O método utilizado é a titulação coulométrica de Karl Fisher, que é baseada nas seguintes equações de reação padrão:



Na coulometria, no entanto, o iodo é gerado eletroquimicamente por oxidação anódica:



A geração de iodo ocorre no eletrodo gerador incorporado na célula próxima ao eletrodo de medida (eletrodo de pino duplo de platina para determinar o ponto final da reação) na célula de titulação de vidro.

O reagente de Karl Fisher contém dióxido de enxofre, imidazol, metanol e iodo.

O teste é realizado individualmente, utilizando-se 5 amostras armazenadas em cada temperatura, além de um padrão de umidade. Após o teste, faz-se a média dos resultados.

3.4.2.2. Critério de aceitação

Para vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses, o valor encontrado para a média das cinco amostras não deve ser superior a 3%.

3.4.3. Teste de esterilidade

O objetivo deste teste é verificar a presença ou ausência de contaminação bacteriana e fúngica em amostras de vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses.

3.4.3.1. Método direto para verificação do crescimento bacteriano e fúngico

O método direto consiste em inocular diretamente em meios de cultura, alíquotas da vacina reconstituída. São utilizados dois meios de cultura: meio fluido de tioglicolato (TGC) e caldo de caseína-soja (CAS). O primeiro é para crescimento especialmente de anaeróbios, embora haja crescimento de aeróbios, leveduras e até fungos. O segundo é para crescimento de aeróbios, leveduras e fungos.

Para a realização do teste, 03 frascos de vacina foram colocados em cabina de segurança biológica. De cada frasco foram retirados 2 mL, dos quais 1 mL foi inoculado em tubo contendo 18 mL de TGC e 1 mL em tubo contendo 18 mL de CAS. Após este procedimento, os 03 tubos de TGC e os 03 de CAS, foram armazenados por 14 dias a 30-35°C e a 20-25°C, respectivamente.

Após três dias de incubação, foram feitos repiques de todos os tubos. Para isso, foram retirados 2 mL de cada tubo, tanto de TGC quanto de CAS, dos quais 1 mL foi inoculado em outro tudo de 18 mL de TGC e outro tudo de 18 mL de CAS. Após este procedimento, os tubos foram novamente armazenados por 14 a 30-35°C e a 20-25°C, respectivamente.

A presença de crescimento microbiano foi verificada diariamente e evidenciada pela turvação dos meios.

3.4.3.2. Critério de aceitação

Ausência de crescimento bacteriano e fúngico.

3.5. Análise Estatística

3.5.1. Modelo de conformidade

A determinação do prazo de validade de produtos pode ser realizada utilizando-se o modelo de conformidade. Neste caso, vários lotes de vacina são testados em diferentes períodos de tempo e o prazo de validade é determinado como o último período de tempo no qual todos os lotes apresentaram resultados satisfatórios, quando comparados as especificações do produto (Jadhav *et al* 2009 e Krause 2009).

Este modelo tem algumas limitações, já que não leva em consideração as incertezas, como a variabilidade do teste e a taxa da perda (Jadhav *et al* 2009).

3.5.2. Modelo de estimativa

Os Guias Q1A(R2)/2003 (ICH 2003a) e Q1E/2003 (ICH 2003b), fornecem uma abordagem mais abrangente para análise de dados obtidos a partir de estudos de estabilidade. Enquanto a abordagem do “modelo de conformidade” utiliza apenas um dado como determinante do prazo de validade, o modelo conhecido como “modelo de estimativa” considera a variabilidade de todo o grupo de dados obtido no estudo (Krause 2009). O “*Developing Countries Vaccine Manufacturers Network*” (DCVMN) incentiva o uso desta abordagem para análise de estudos de estabilidade (Jadhav *et al* 2009).

3.5.2.1. Regressão linear

Segundo o Guia Q1E/2003 (ICH 2003b) a análise por regressão linear é considerada uma abordagem apropriada para a avaliação dos dados obtidos a partir de estudos de estabilidade, a fim de estabelecer o prazo de validade do produto em questão (ICH 2003b). Ela representa o estudo da dependência, ou seja, é utilizada quando há razões para supor uma relação de causa-efeito entre duas variáveis quantitativas e se deseja expressar matematicamente essa relação (Callegari-Jacques 2003 e Weisberg 2005). Neste estudo, os valores da variável independente (x) geralmente são escolhidos, e para cada valor escolhido observa-se o valor da variável dependente (y) correspondente (Callegari-Jacques 2003).

Geralmente, a relação entre certas variáveis quantitativas e o tempo é considerada como linear e será este o princípio que adotaremos para análise dos dados de estabilidade obtidos neste estudo (ICH 2003b). Ainda segundo este guia, uma abordagem apropriada para estimar o prazo de validade é analisar uma variável quantitativa, determinando em que tempo, com 95% de confiança, o intervalo para a média intercepta o critério de aceitação proposto.

O modelo de regressão pode ser expresso pela seguinte equação:

$$y = \beta_0 + \beta_1.lote_2 + \beta_2.lote_3 + \beta_3.tempo + \beta_4.lote_2.tempo + \beta_5.lote_3.tempo$$

onde y é a variável dependente.

A análise da covariância (ANCOVA) é um procedimento que combina a análise de variância com a regressão (Montgomery 2009). É aplicada para verificar se as inclinações e os interceptos têm diferença estatisticamente significativa. O teste deve ser realizado utilizando um nível de significância de 0,25 para termos relacionados aos lotes, para compensar o baixo poder esperado para o desenho cujo tamanho de amostra é típico de um estudo de estabilidade normal, ou seja, baixo (ICH 2003b e Lee *et al* 2010). Para termos não relacionados ao lote, como a verificação da influência do tempo, deve-se utilizar um nível de significância de 0,05 (ICH 2003b). Para análise das inclinações, as hipóteses testadas são:

$$H_0: \beta_4 = \beta_5 = 0$$

$$H_1: \beta_4 \text{ ou } \beta_5 \neq 0$$

Se não rejeitarmos H_0 , indica que as retas possuem a mesma inclinação. Deste modo, devemos verificar se possuem o mesmo intercepto, utilizando o mesmo raciocínio acima. As hipóteses testadas são:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \text{ ou } \beta_2 \neq 0$$

De acordo com os resultados da análise, deve-se adotar uma das seguintes abordagens:

- Inclinação ($p\text{-valor} \geq 0,25$) e intercepto ($p\text{-valor} \geq 0,25$). Neste caso, nenhuma diferença é indicada e, por isso, os dados de todos os lotes podem ser agrupados, obtendo uma reta única. Desta forma, um único prazo de validade pode ser estimado a partir deste grupo de dados.
- Inclinação ($p\text{-valor} \geq 0,25$) e intercepto ($p\text{-valor} < 0,25$). Neste caso, os dados de todos os lotes podem ser agrupados para estimar a inclinação comum, obtendo três retas paralelas. Entretanto, o prazo de validade deve ser estimado individualmente para cada lote, e a menor estimativa entre os lotes deve ser escolhida como sendo o prazo de validade aplicável a todos os lotes.
- Inclinação ($p\text{-valor} < 0,25$) e intercepto ($p\text{-valor} \geq 0,25$), ou inclinação ($p\text{-valor} < 0,25$) e intercepto ($p\text{-valor} < 0,25$). Neste caso, não é recomendado agrupar os dados de todos os lotes. Desta forma são obtidas três retas concorrentes e, assim, o prazo de validade deve ser estimado individualmente para cada lote. Do mesmo modo, a menor estimativa entre os lotes deve ser escolhida como sendo o prazo de validade aplicável a todos os lotes (Lee *et al* 2010). A ANCOVA foi utilizada para avaliar cada grupo de dados separadamente. O objetivo era verificar se existia ou não diferença estatisticamente significativa entre as inclinações das retas, obtidas pela regressão linear, e os interceptos.

Após esta etapa, a mesma análise foi realizada novamente, porém para comparar os diferentes grupos entre si, correlacionando os parâmetros analisados com a estabilidade do produto em questão. Outras análises como o cálculo dos intervalos de confiança (IC), intervalos preditivos (IP) e extrapolação de dados foram realizadas com o objetivo de complementar os resultados obtidos pela ANCOVA.

Quando avalia-se o valor de um parâmetro da população, baseado em valores de uma amostra, o que se tem é uma estimativa pontual. Entretanto, o valor estimado na maior parte das vezes não será exatamente igual ao valor verdadeiro. Por isso, calcula-se o IC desta estimativa, que fornece um intervalo de valores plausíveis para o parâmetro em análise baseado nos dados amostrais. O IC de 95% é o mais utilizado e fornece um intervalo no qual estaríamos 95% confiantes da cobertura do verdadeiro valor do parâmetro ou que 95% de todos os IC que construirmos conterão o verdadeiro valor do parâmetro (Montgomery *et al* 2001 e Weisberg 2005). No caso em análise, o IC de 95% foi obtido para as médias dos parâmetros analisados, ou seja, para a média da potência, da termoestabilidade, da perda e da umidade residual.

Outra importante aplicação do modelo de regressão, é a predição de novas observações da variável dependente (y) correspondentes a determinado valor variável independente (x). Para calcular o intervalo para as futuras observações, o IC não é adequado, pois este intervalo é

estimado para a média de y (parâmetro em questão). Assim, se faz necessário o uso de um IP, que é um intervalo para futuras observações. O IP pode ser visto como um IC para futuras observações. Comparando ambos os intervalos, observa-se que o IP é sempre mais amplo que o IC, porque o IP é influenciado tanto pelo erro do modelo ajustado quanto pelo erro das futuras observações (Montgomery *et al* 2001 e Weisberg 2005).

Para realização das análises descritas acima foi utilizado o software R, gratuito e disponível em <http://www.r-project.org>.

4. RESULTADOS

4.1. Potência do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses

O teste de potência é pré-requisito para a liberação de vacinas febre amarela (atenuada). Os resultados de potência são a média geométrica de 04 resultados individuais e são apresentados em UI/dose, a partir da correção dos dados obtidos originalmente em UFP/dose, conforme descrito no item 3.4.1.

Para a realização do estudo de estabilidade longa duração, foram realizados testes de potência e termoestabilidade em períodos pré-determinados em 03 lotes consecutivos de vacina 10 doses. Os lotes testados foram o 067VFC001Z, 067VFC002Z e 067VFC003Z. Os dados de potência para as amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses estão descritos na Tabela 4.1 e apresentados graficamente na Figura 4.1.

Tabela 4.1. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

		Tempo (meses)											
		T0	T3	T6	T9	T12	T15	T18	T24	T30	T36	T42	T48
Lotes teste	067VFC001Z	4,68	4,72	4,63	4,44	4,58	4,45	4,65	4,49	4,46	4,81	4,49	4,48
	067VFC002Z	4,70	4,84	4,85	4,64	4,71	4,68	4,73	4,52	4,64	4,62	4,63	4,58
	067VFC003Z	4,66	4,67	4,73	4,51	4,54	4,61	4,71	4,50	4,45	4,59	4,31	4,45

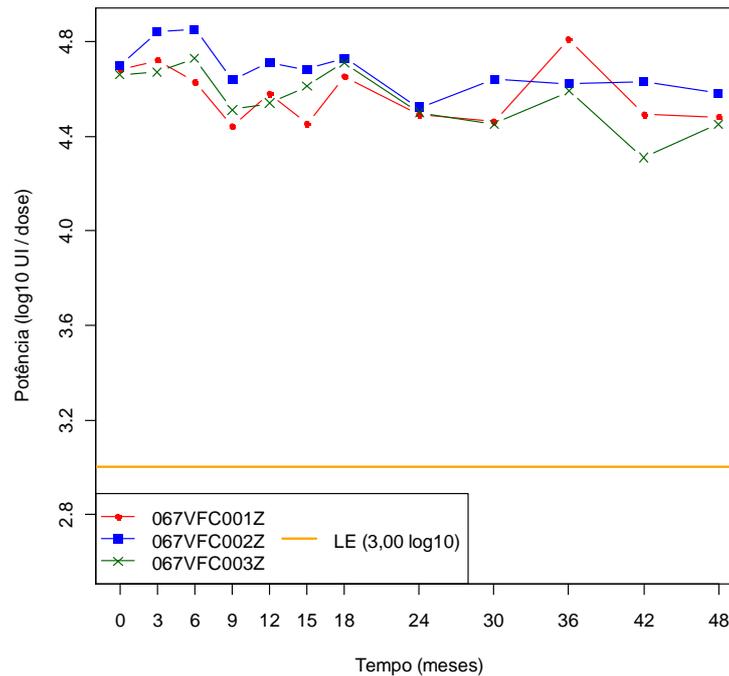


Figura 4.1. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

De acordo com a Tabela 4.1 e com a Figura 4.1, todos os resultados encontrados para o teste de potência estão acima do limite de especificação (LE) mínimo de $3,00 \log_{10}$ UI/dose, equivalente a 1000 DL_{50} e a $3,73 \log_{10}$ UFP/dose. Quando aplicou-se a ANCOVA com nível de significância $\alpha = 0,25$, o teste não rejeitou H_0 ($p\text{-valor} = 0,4100$), ou seja, não foi encontrada diferença significativa entre as inclinações das retas dos 03 lotes, podendo-se ajustar retas paralelas. Entretanto, quando foi aplicado o mesmo teste para avaliação dos interceptos, o teste rejeitou H_0 ($p\text{-valor} = 0,0100$), o que significa que foi encontrada diferença significativa entre os interceptos para os 03 lotes, sugerindo a obtenção de 03 retas paralelas com interceptos distintos. As retas com os diferentes interceptos estão representadas na Figura 4.2.

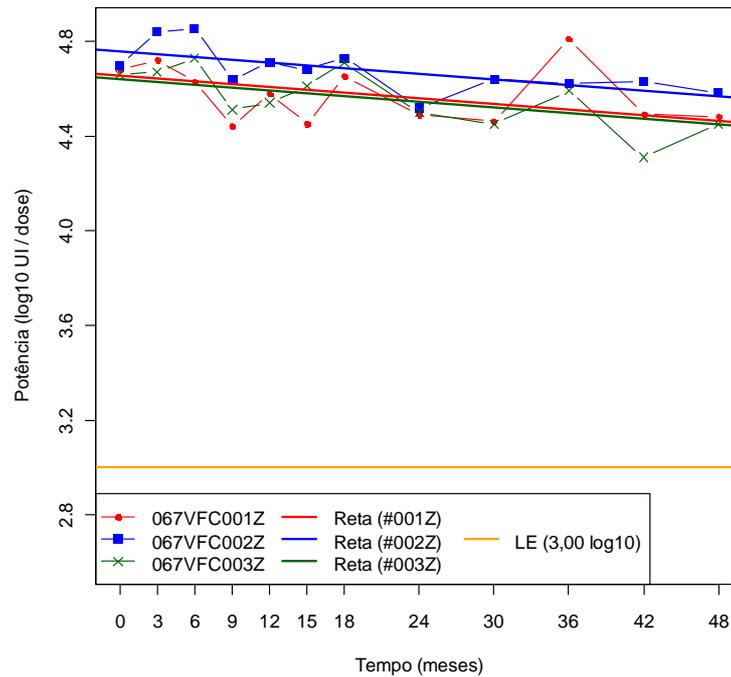


Figura 4.2. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

Desta forma, a inclinação comum das 03 retas é $-0,0040$. Para avaliar a influência do tempo na perda de título, foi utilizada a ANCOVA, porém com um nível de significância $\alpha = 0,05$. Foi obtido um $p\text{-valor} = 0,0010$, sugerindo que há uma perda de título ao longo do tempo de armazenamento. Já os interceptos variam, e estão descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de potência dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses.

Lotes teste	Interceptos
067VFC001Z	4,6534
067VFC002Z	4,7584
067VFC003Z	4,6409

4.2. Potência do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses

Analisando-se os resultados de potência das amostras de vacina 10 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses, verificou-se que todos os resultados estão acima de $3,00 \log_{10} \text{UI/dose}$. Os dados estão descritos na Tabela 4.3 e apresentados graficamente na Figura 4.3.

Tabela 4.3. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

		Tempo (meses)											
		T0	T3	T6	T9	T12	T15	T18	T24	T30	T36	T42	T48
Lotes teste	067VFC001Z	4,68	4,72	4,57	4,52	4,43	4,35	4,64	4,35	4,44	4,72	4,24	4,28
	067VFC002Z	4,70	4,76	4,82	4,65	4,67	4,67	4,70	4,44	4,55	4,40	4,53	4,52
	067VFC003Z	4,66	4,65	4,74	4,47	4,54	4,58	4,60	4,43	4,38	4,62	4,29	4,36

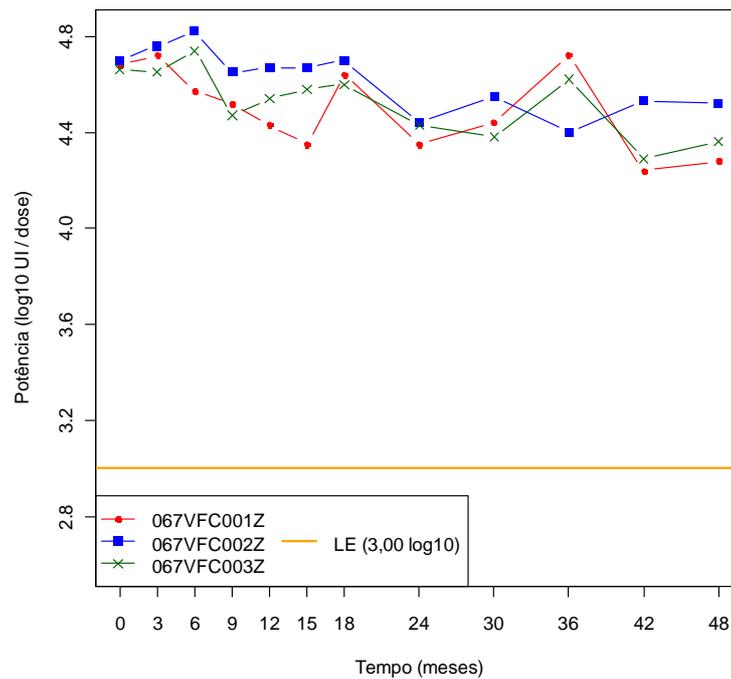


Figura 4.3. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

Para este grupo, o teste de hipótese aplicado não rejeitou H_0 para a inclinação (p -valor = 0,9900) e rejeitou H_0 para os interceptos das retas de regressão (p -valor = 0,0300). Estes resultados indicam que não foi encontrada diferença significativa entre as inclinações das retas, enquanto que a diferença nos interceptos foi significativa. Nesta situação, pôde-se combinar os dados com o propósito de estimar uma inclinação comum, conforme Figura 4.4.

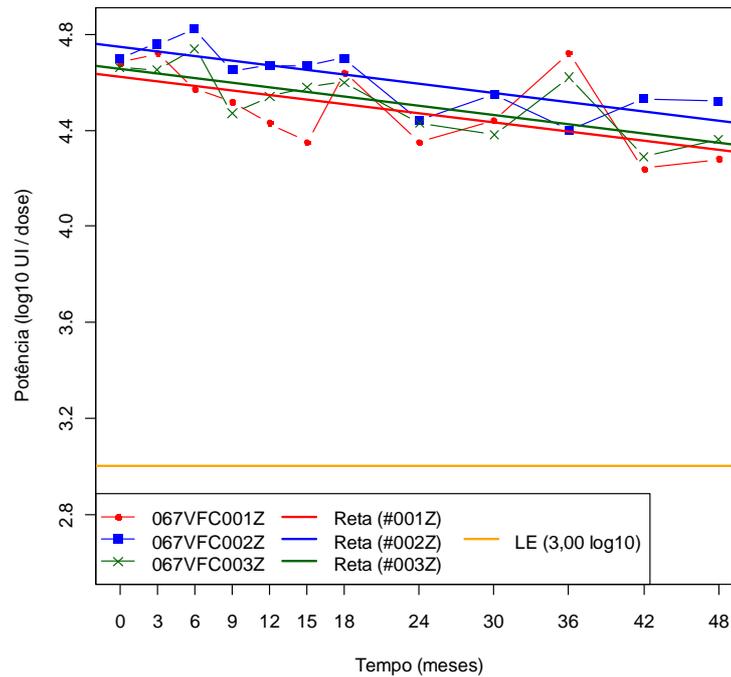


Figura 4.4. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

A inclinação comum das retas é $-0,0064$, sugerindo que o tempo tem influência no título da vacina (p -valor = $0,0336$), ou seja, há um decréscimo do título ao longo do tempo de armazenamento. Já os interceptos variam e estão descritos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de potência dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses.

Lotes teste	Interceptos
067VFC001Z	4,6246
067VFC002Z	4,7471
067VFC003Z	4,6563

4.3. Potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 36 meses

Para a realização do estudo de acompanhamento anual da estabilidade, foram realizados anualmente testes de potência em 10 lotes de vacina 05 doses fabricados em 2003, 2004, 2005 e 2006. Os lotes testados e fabricados em 2003 foram o 037VFA063Z, 038VFA076Z e 03PVFA137Z, os lotes fabricados em 2004 foram o 049VFA108P, 04UVFA156Z e

04UVFA158Z, os lotes de 2005 foram o 05PVFA135Z e 05UVFA142Z e os lotes de 2006 foram o 06UVFA130Z e 06UVFA132Z. Os dados de potência para as amostras de vacina 05 doses armazenadas a -20°C por 36 meses estão descritos na Tabela 4.5 e todos os resultados estão acima de $3,00 \log 10 \text{ UI/dose}$.

Tabela 4.5. Teste de potência utilizado no estudo de acompanhamento anual da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 36 meses.

Lotes teste	Tempo (meses)			
	T0	T12	T24	T36
037VFA063Z	4,56	4,52	4,45	4,59
038VFA076Z	4,68	4,61	4,63	4,61
03PVFA137Z	4,52	X	4,29	4,34
049VFA108P	4,68	4,66	4,77	4,66
04UVFA156Z	4,70	4,72	4,71	4,63
04UVFA158Z	4,75	4,66	4,74	4,67
05PVFA135Z	4,65	4,68	4,69	4,35
05UVFA142Z	4,78	4,79	4,67	4,39
06UVFA130Z	4,51	4,78	4,44	4,94
06UVFA132Z	4,47	4,35	4,35	4,92

X: Teste não realizado.

Quando aplicamos ANCOVA para este grupo, verificamos que o H_0 foi rejeitado tanto para as inclinações ($p\text{-valor} = 0,1520$) quanto para os interceptos ($p\text{-valor} = 0,0990$), ou seja, deve-se ajustar uma reta para cada lote. Com o objetivo de verificar se os comportamentos dos lotes produzidos no mesmo ano eram semelhantes, dividiu-se o grupo como descrito na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Subdivisão das amostras de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenadas por 36 meses a -20°C , de acordo com o ano da produção, para a realização da análise estatística.

Grupo	Descrição
(a)	Lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses produzidos em 2003 – Potência
(b)	Lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses produzidos em 2004 – Potência
(c)	Lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses produzidos em 2005 – Potência
(d)	Lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses produzidos em 2006 – Potência

Os dados obtidos a partir da aplicação da ANCOVA para o grupo (a) estão apresentados na Figura 4.5.

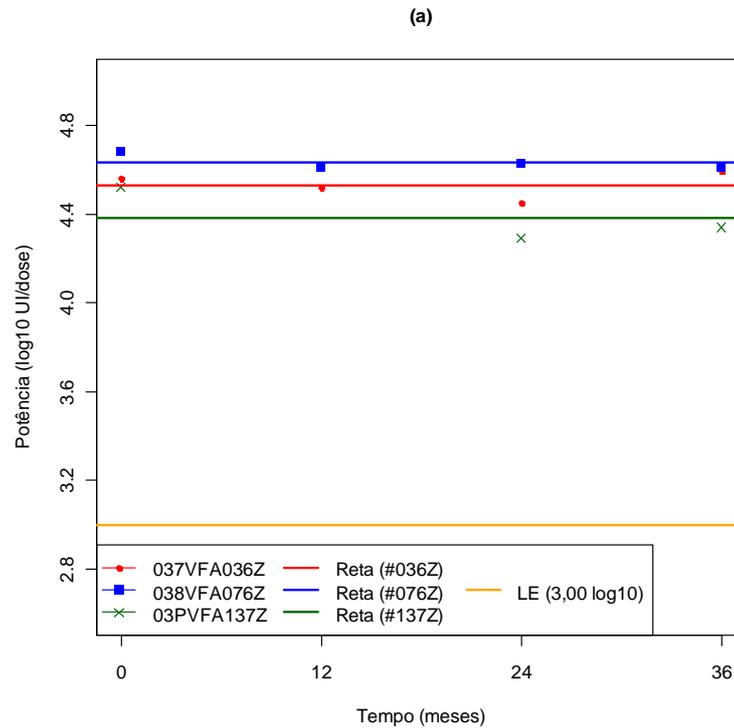


Figura 4.5. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses fabricados em 2003 e armazenados a -20°C por 36 meses.

Analisando-se estatisticamente os dados apresentados na Figura 4.5, verificou-se que para o grupo (a) pôde-se ajustar retas com a mesma inclinação ($p\text{-valor} = 0,3050$), porém os interceptos tem diferença significativa ($p\text{-valor} = 0,0100$). Além disso, o tempo não tem influência no título ($p\text{-valor} = 0,1601$), ou seja, pode-se admitir que a inclinação é zero, sugerindo que o título permanece estável ao longo do período de armazenamento. Outro fator relevante é a quantidade reduzida de dados, que pode não representar adequadamente o comportamento dos lotes analisados.

Os dados obtidos para o grupo (b) estão apresentados na Figura 4.6.

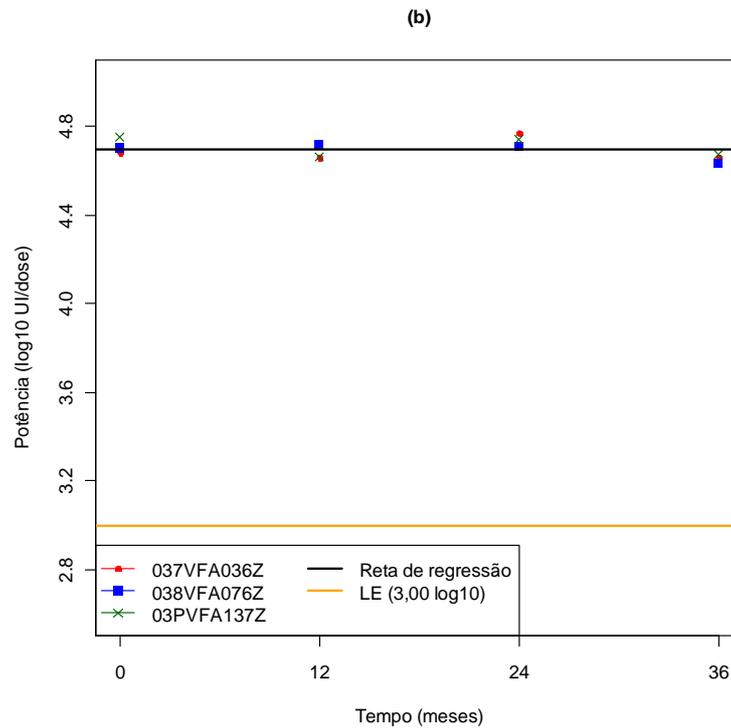


Figura 4.6. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses fabricados em 2004 e armazenados a -20°C por 36 meses.

Conforme demonstrado no gráfico do grupo (b) (Figura 4.6), pudemos ajustar uma única reta para os 03 lotes ($p\text{-valor} = 0,7000$ para as inclinações e $p\text{-valor} = 0,9090$ para os interceptos), ou seja, pode-se considerar os resultados dos três lotes como um único grupo. Além disso, demonstrou que o tempo não tem influência sobre a perda da potência ($p\text{-valor} = 0,4403$), podendo-se admitir que a inclinação é zero, sugerindo que a potência permanece constante com o passar do tempo de armazenamento.

Os dados do grupo (c) estão descritos na Figura 4.7.

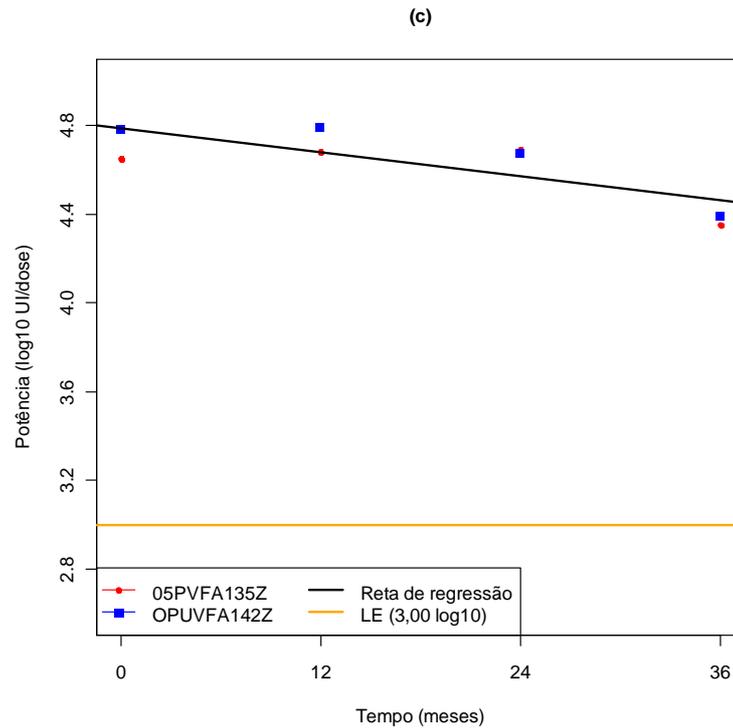


Figura 4.7. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses fabricados em 2005 e armazenados a -20°C por 36 meses.

Para o grupo (c), também pôde-se ajustar uma única reta para os 03 lotes (p-valor = 0,6350 para as inclinações e p-valor = 0,4970 para os interceptos), sugerindo que os 03 lotes possuem comportamentos iguais. Entretanto, neste caso, o tempo tem influência sobre a perda (p-valor = 0,0490), e como a inclinação é negativa, isto sugere que ocorre perda de título com o passar do tempo. Entretanto, mesmo com a queda da potência ao longo do tempo, esta permanece bem acima do LE, após 36 meses armazenada a -20°C .

Os dados do grupo (d) estão representados na Figura 4.8.

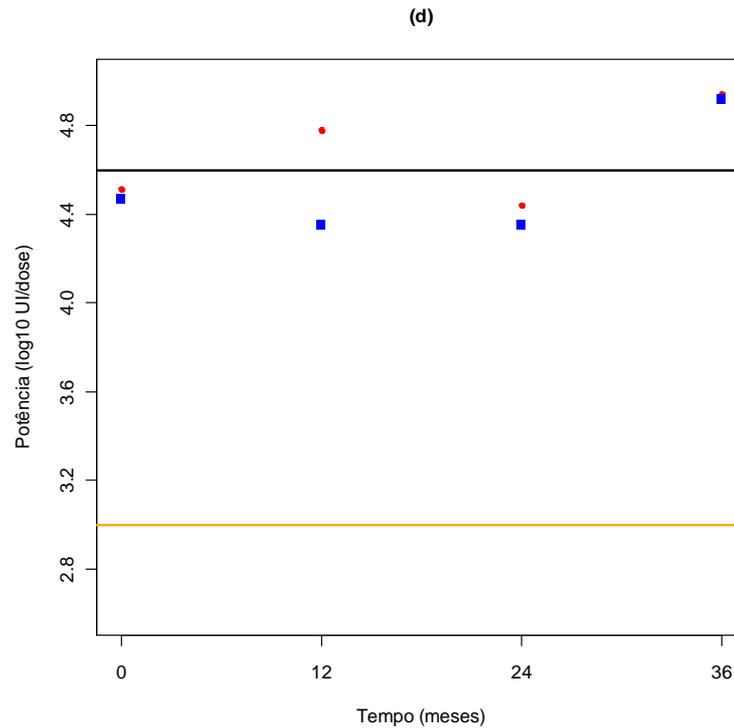


Figura 4.8. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de acompanhamento anual da estabilidade dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses fabricados em 2006 e armazenados a -20°C por 36 meses.

Para o grupo (d), conforme demonstra a Figura 4,8, pudemos ajustar uma única reta para os três lotes, ou seja, nem a inclinação ($p\text{-valor} = 0,8120$) nem os interceptos ($p\text{-valor} = 0,4560$) apresentaram diferença significativa. Neste caso, o tempo também não tem influência no título ($p\text{-valor} = 0,2176$), admitindo-se que a inclinação é igual a zero e que o título permaneceria estável ao longo do tempo.

A variação encontrada entre os lotes de 05 doses e demonstrada acima pode estar relacionada a reduzida quantidade de resultados de potência obtidos por lote, por se tratar de um estudo anual de acompanhamento da estabilidade, além do número reduzido de lotes em estudo. Entretanto, com a finalidade de comparar estes resultados com aqueles obtidos para as amostras dos lotes de vacina 10 doses armazenadas na mesma temperatura, ou seja, a -20°C por 48 meses, utilizou-se a abordagem estatística sugerida por Schofield (2009), que utiliza o intervalo preditivo (IP) de 95%. Para este estudo, utilizamos o pior caso, ou seja, aquele lote que possui os resultados mais próximos do LE mínimo. No caso das vacinas 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses, o pior caso foi o lote 067VFC003Z.

Quando foi plotado o IP de 95% do lote 067VFC003Z e os resultados obtidos para as amostras dos 10 lotes de vacina 05 doses armazenadas a -20°C por 36 meses, a fim de comparar os dados de ambos os grupos, foi observado que a maioria dos resultados obtidos estão acima do limite inferior do IP de 95%, demonstrando a estabilidade também dos lotes de vacina 05 doses armazenados a -20°C por 36 meses (Figura 4.9).

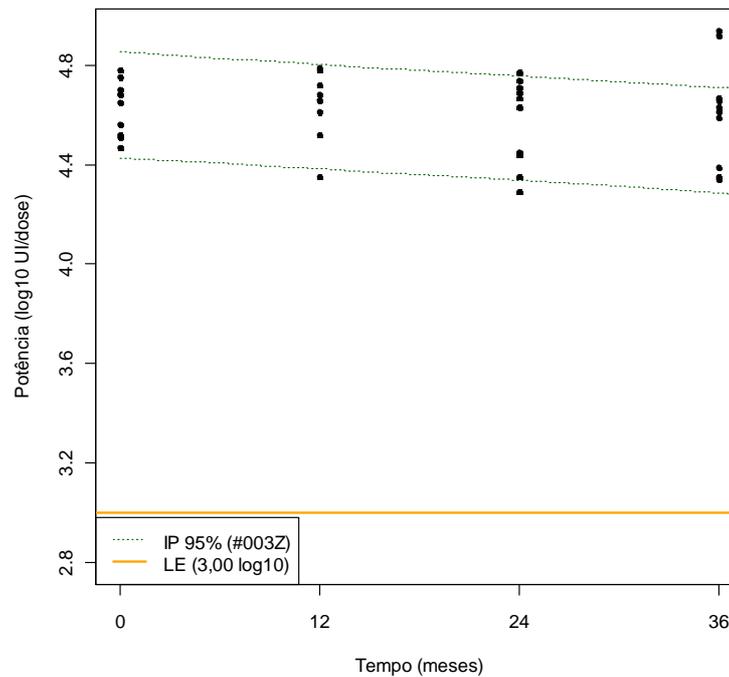


Figura 4.9. Teste de potência utilizado no estudo de acompanhamento anual da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 36 meses plotada em um gráfico contendo o intervalo preditivo (IP) de 95% do lote 067VFC003Z, armazenado a -20°C por 48 meses (pior caso).

4.4. Potência do estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 48 meses

Além do estudo de acompanhamento anual da estabilidade, um estudo complementar de acompanhamento da estabilidade foi realizado com amostras de vacinas 05 doses. Neste caso, foram selecionados 20 lotes produzidos em 2005 e 2006 e armazenados a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses. Foram realizados testes de potência na liberação do produto (T0) e após 48 meses de armazenamento em ambas as temperaturas (T48).

Os resultados de potência obtidos para as amostras de vacina 05 doses armazenadas a -20°C por 48 meses estão descritos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

Lotes teste	Tempo (meses)	
	T0	T48
05OVFA119Z	4,85	4,91
05OVFA120Z	4,88	4,84
05OVFA121Z	4,85	4,83
05OVFA122Z	4,50	4,83
05OVFA123Z	4,56	4,67
05PVFA128Z	4,63	4,87
05PVFA129Z	4,62	4,80
05PVFA130Z	4,59	4,83
05PVFA131Z	4,57	4,79
05PVFA132Z	4,73	4,82
05UVFA141Z	4,75	4,56
05UVFA143Z	4,43	4,70
05UVFA144Z	4,48	4,75
05UVFA145Z	4,55	4,57
05UVFA146Z	4,49	4,79
061VFA001Z	4,43	4,64
061VFA002Z	4,45	4,77
061VFA003Z	4,48	4,76
061VFA004Z	4,48	4,75
061VFA005Z	4,47	4,86

A mesma abordagem utilizada para avaliação dos resultados do estudo de acompanhamento anual da estabilidade foi utilizada para avaliação dos resultados deste grupo. Desta forma, novamente plotou-se em um gráfico o IP de 95% do lote 067VFC003Z (pior caso entre os lotes de vacina 10 armazenados a -20°C por 48 meses) e os resultados obtidos para as amostras de vacina 05 doses armazenadas a -20°C por 48 meses. O gráfico está representado na Figura 4.10.

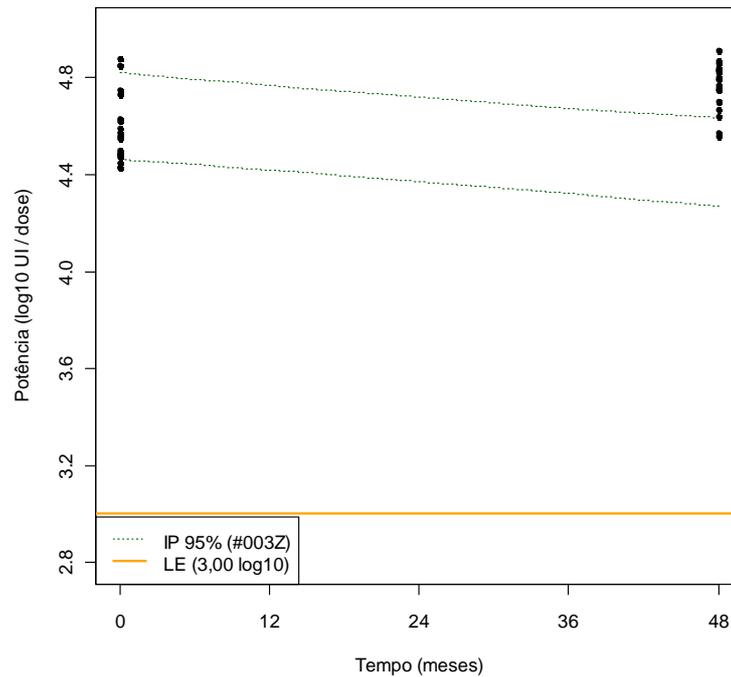


Figura 4.10. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a -20°C por 48 meses plotada em um gráfico contendo o intervalo preditivo (IP) de 95% do lote 067VFC003Z, armazenado a -20°C por 48 meses (pior caso).

Na Figura 4.10, verifica-se que a maioria dos resultados obtidos estão acima do limite inferior do IP de 95%, demonstrando também a estabilidade das amostras dos lotes de vacina 05 doses armazenadas a -20°C por 48 meses.

4.5. Potência do estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses

Os resultados de potência obtidos para as amostras do estudo complementar de acompanhamento da estabilidade de vacina 05 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses estão descritos na Tabela 4.8.

A mesma abordagem utilizada anteriormente foi novamente aplicada. Nesta caso, plotou-se em um gráfico o IP de 95% do lote 067VFC001Z, que é o pior caso entre os lotes de vacina 10 armazenados a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses, além dos resultados obtidos para as amostras de vacina 05 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses. O gráfico está representado na Figura 4.11.

Tabela 4.8. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

Lotes teste	Tempo (meses)	
	T0	T48
05OVFA119Z	4,85	4,88
05OVFA120Z	4,88	4,79
05OVFA121Z	4,85	4,77
05OVFA122Z	4,50	4,74
05OVFA123Z	4,56	4,74
05PVFA128Z	4,63	4,76
05PVFA129Z	4,62	4,66
05PVFA130Z	4,59	4,78
05PVFA131Z	4,57	4,61
05PVFA132Z	4,73	4,81
05UVFA141Z	4,75	4,29
05UVFA143Z	4,43	4,61
05UVFA144Z	4,48	4,62
05UVFA145Z	4,55	4,53
05UVFA146Z	4,49	4,58
061VFA001Z	4,43	4,61
061VFA002Z	4,45	4,78
061VFA003Z	4,48	4,72
061VFA004Z	4,48	4,72
061VFA005Z	4,47	4,83

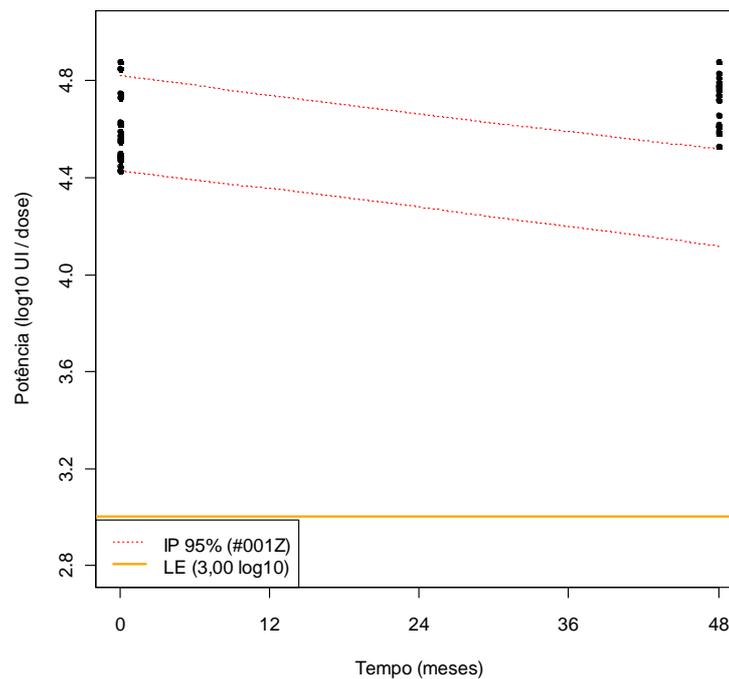


Figura 4.11. Teste de potência utilizado no estudo complementar de acompanhamento da estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses plotada em um gráfico contendo o intervalo preditivo (IP) de 95% do lote 067VFC001Z, armazenado a 2-8°C por 48 meses (pior caso).

Na Figura 4.11, verifica-se que a maioria dos resultados obtidos estão acima do limite inferior do IP de 95%, demonstrando também a estabilidade das amostras dos lotes de vacina 05 doses armazenadas a 2-8°C por 48 meses.

4.6. Termoestabilidade do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses

O teste de termoestabilidade também é um pré-requisito para a liberação do lote para o mercado. Este teste é realizado da mesma forma que o teste de potência. A diferença entre as duas determinações é que as amostras que sofrerão o teste de termoestabilidade devem permanecer por 14 dias armazenadas a 37°C. Os dados de termoestabilidade também são a média geométrica de 04 resultados individuais e são apresentados em UI/dose, a partir da correção dos dados obtidos originalmente em UFP/dose, conforme descrito no item 3.4.1.

Como descrito anteriormente, para a realização do estudo de estabilidade longa duração, além dos testes de potência cujos resultados já foram analisados, foram realizados testes de termoestabilidade em períodos pré-determinados em 03 lotes consecutivos de vacina 10 doses. Os lotes testados foram o 067VFC001Z, 067VFC002Z e 067VFC003Z. Os resultados dos testes de termoestabilidade das amostras do estudo de estabilidade longa duração da vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses estão descritas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Teste de termoestabilidade utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

		Tempo (meses)											
		T0	T3	T6	T9	T12	T15	T18	T24	T30	T36	T42	T48
Lotes teste	067VFC001Z	4,34	4,47	4,30	4,26	4,25	4,35	X	4,27	4,15	4,63	4,33	4,18
	067VFC002Z	4,53	4,62	4,69	4,63	4,6	4,54	X	4,35	4,47	4,43	4,48	4,43
	067VFC003Z	4,57	4,44	4,64	4,37	4,31	4,48	X	4,24	4,29	4,49	4,14	4,32

X: teste não realizado.

De acordo com a Tabela 4.9, todos os resultados encontrados para o teste de termoestabilidade estão acima de 3,00 log 10 UI/dose e não apresentaram redução maior do que 1 log 10 UI em relação a potência. Após a aplicação da ANCOVA, o teste não rejeitou H_0 para a inclinação (p-valor = 0,3100), ou seja, não foi encontrada diferença significativa entre as inclinações das 03 retas, podendo-se ajustar retas paralelas. No entanto, quando analisamos os interceptos, o teste rejeitou H_0 (p-valor = 0,0100), indicando que foi encontrada diferença

significativa entre os interceptos. As retas com os diferentes interceptos estão representadas na Figura 4.12.

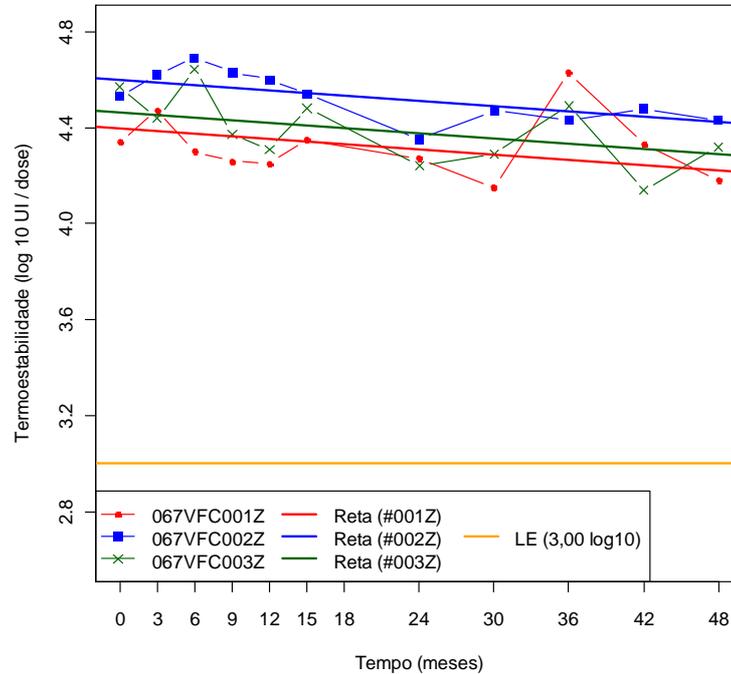


Figura 4.12. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de termostabilidade do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

Segundo a ANCOVA, a inclinação comum das retas é $-0,0036$. Como verificou-se que o tempo tem influência no título ($p\text{-valor} = 0,0096$), sugere-se que ocorre uma perda de título ao longo do tempo de armazenamento. Já os interceptos variam, e estão descritos na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de termostabilidade (UI/dose) dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses.

Lotes teste	Interceptos
067VFC001Z	4,3946
067VFC002Z	4,5982
067VFC003Z	4,4636

4.7. Termostabilidade do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses

Analisando-se os resultados de termostabilidade das amostras de vacina 10 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses, verificou-se que todos os resultados estão acima de $3,00 \log$

10 UI/dose e não apresentaram redução maior que 1 log 10 UI em relação a potência. Os dados estão descritos na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Teste de termoestabilidade utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

		Tempo (meses)											
		T0	T3	T6	T9	T12	T15	T18	T24	T30	T36	T42	T48
Lotes teste	067VFC001Z	4,34	4,43	4,37	4,26	4,23	4,23	X	4,15	4,11	4,52	4,08	4,08
	067VFC002Z	4,53	4,59	4,61	4,56	4,51	4,55	X	4,35	4,43	4,15	4,45	4,34
	067VFC003Z	4,57	4,41	4,61	4,35	4,14	4,40	X	4,13	4,25	4,40	4,11	4,20

X: teste não realizado.

Após a aplicação da ANCOVA, o teste não rejeitou H_0 para a inclinação (p -valor = 0,8100), ou seja, não foi encontrada diferença significativa entre as inclinações das 03 retas, podendo-se ajustar retas paralelas. No entanto, quando analisamos os interceptos, o teste rejeitou H_0 (p -valor = 0,0002), indicando que foi encontrada diferença significativa entre os interceptos. As retas com os diferentes interceptos estão representadas na Figura 4.13.

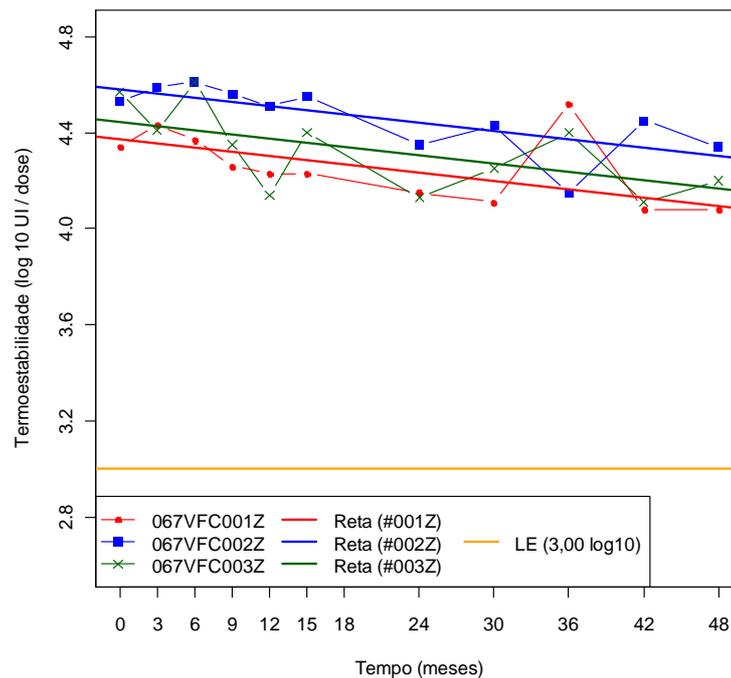


Figura 4.13. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de termoestabilidade do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

Estes resultados permitiram que se estimasse a inclinação comum das retas, cujo valor encontrado foi -0,0058. Quando avaliou-se a influência do tempo no título encontrou-se um p-valor = 0,0003, sugerindo que há um decréscimo de título com o passar do tempo de armazenamento. No entanto, os interceptos são variáveis e estão representados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de termoestabilidade (UI/dose) dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses.

Lotes teste	Interceptos
067VFC001Z	4,3728
067VFC002Z	4,5792
067VFC003Z	4,4428

4.8. Diferença entre a potência e a termoestabilidade (perda) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses

A perda também é um pré-requisito para liberação dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) para o mercado. Este parâmetro é obtido pela diferença entre os títulos de potência e termoestabilidade e não deve ser maior que 1 log 10 UI.

Os resultados obtidos para a perda nas amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses são apresentados na Tabela 4.13. Segundo esta tabela, todos os resultados estão abaixo do LE máximo, ou seja, são menores que 1 log 10 UI.

Tabela 4.13. Perda do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

		Tempo (meses)											
		T0	T3	T6	T9	T12	T15	T18	T24	T30	T36	T42	T48
Lotes teste	067VFC001Z	0,34	0,25	0,33	0,18	0,33	0,10	X	0,22	0,31	0,18	0,16	0,30
	067VFC002Z	0,17	0,22	0,16	0,01	0,11	0,14	X	0,17	0,17	0,19	0,15	0,15
	067VFC003Z	0,09	0,23	0,09	0,14	0,23	0,13	X	0,26	0,16	0,10	0,17	0,13

X: teste não realizado.

Aplicando-se a ANCOVA a estes resultados, o teste não rejeitou H_0 para a inclinação (p-valor = 0,6800), podendo-se ajustar retas paralelas. Entretanto, quando analisamos as médias das perdas, o teste rejeitou H_0 (p-valor = 0,0050), ou seja, existe diferença significativa entre os interceptos. As retas com os diferentes interceptos estão representadas na Figura 4.14.

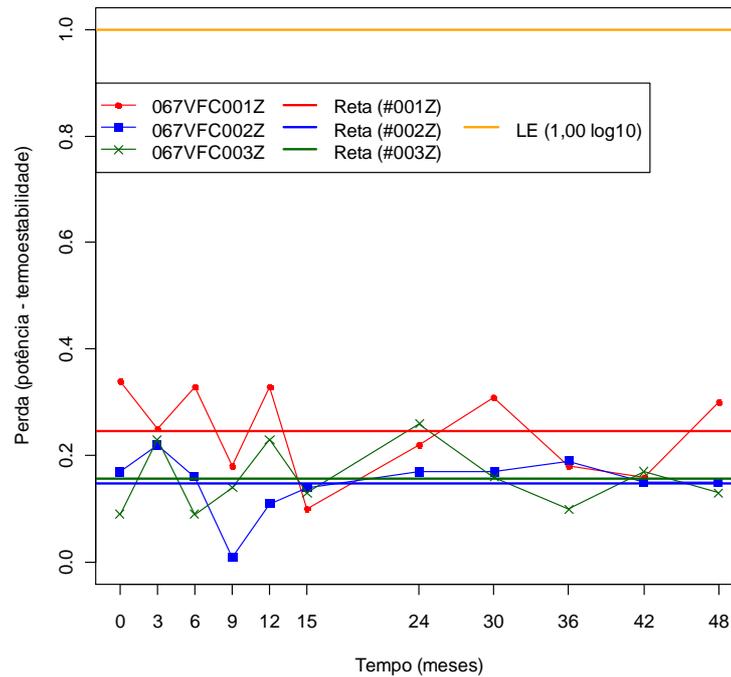


Figura 4.14. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados da perda (diferença entre os títulos de potência e termoestabilidade) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

Como o tempo não tem influência sobre a perda ($p\text{-valor} = 0,7155$) a inclinação das retas pode ser considerada igual a zero, ou seja, a perda permanece constante ao longo do tempo. Entretanto, os interceptos são diferentes e estão descritos na Tabela 4.14.

Tabela 4.14. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de perda dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses.

Lotes teste	Interceptos
067VFC001Z	0,2455
067VFC002Z	0,1491
067VFC003Z	0,1573

4.9. Diferença entre a potência e a termoestabilidade (perda) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses

Os resultados obtidos para a perda nas amostras de vacina 10 doses armazenadas a 2-8°C por 48 meses são apresentados na Tabela 4.15. Segundo esta tabela, todos os resultados estão conforme a especificação, ou seja, são menores que 1 log 10 UI.

Tabela 4.15. Perda do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

		Tempo (meses)											
		T0	T3	T6	T9	T12	T15	T18	T24	T30	T36	T42	T48
Lotes teste	067VFC001Z	0,34	0,29	0,20	0,26	0,20	0,12	X	0,20	0,33	0,20	0,16	0,20
	067VFC002Z	0,17	0,17	0,21	0,09	0,16	0,12	X	0,09	0,12	0,25	0,08	0,18
	067VFC003Z	0,09	0,24	0,13	0,12	0,40	0,18	X	0,30	0,13	0,22	0,18	0,16

X: teste não realizado.

Para a inclinação das retas, o teste de ANCOVA não rejeitou H_0 (p-valor = 0,6700) e rejeitou H_0 para os interceptos (p-valor = 0,0700). Neste caso, não há diferença significativa entre as inclinações dos 03 lotes e há diferença significativa entre os interceptos, os quais estão representados na Figura 4.15.

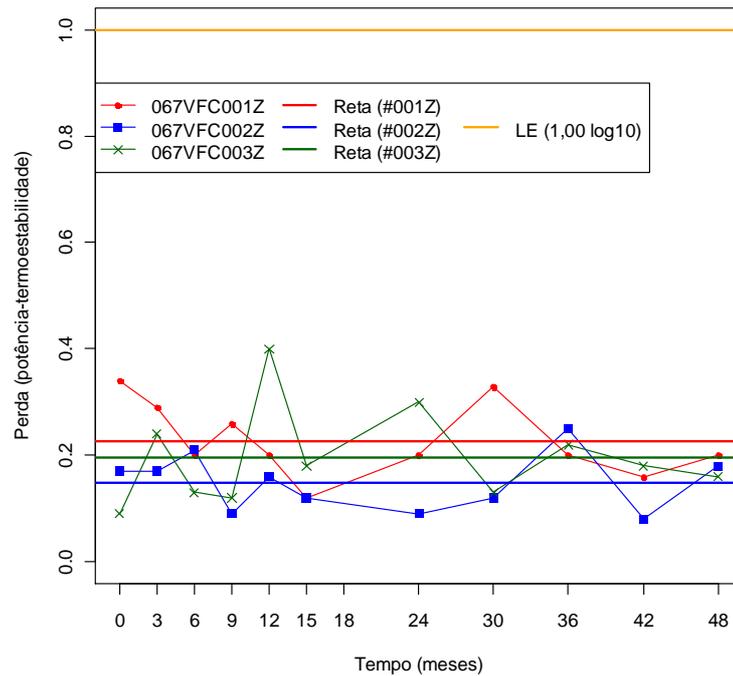


Figura 4.15. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados da perda (diferença entre os títulos de potência e termoestabilidade) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

Como o tempo não tem influência sobre a perda (p -valor = 0,5211) a inclinação das retas pode ser considerada igual a zero, sugerindo, do mesmo modo que no caso anterior, que a perda permanece constante. Entretanto, os interceptos são diferentes e estão descritos na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de perda dos lotes de vacina 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses.

Lotes teste	Interceptos
067VFC001Z	0,2273
067VFC002Z	0,1491
067VFC003Z	0,1955

4.10. Extrapolação dos dados de potência dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses

Para demonstrar a estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) com relação a potência e termoestabilidade, os dados tanto para as amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C como a 2-8°C foram extrapolados até interceptarem o eixo do LE mínimo.

Para esta análise, foram utilizados os piores casos entre os lotes de vacina 10 doses armazenados a -20°C (067VFC003Z) e a $2-8^{\circ}\text{C}$ (067VFC001Z) por 48 meses. Os resultados e a extrapolação dos dados estão representados na Figura 4.16.

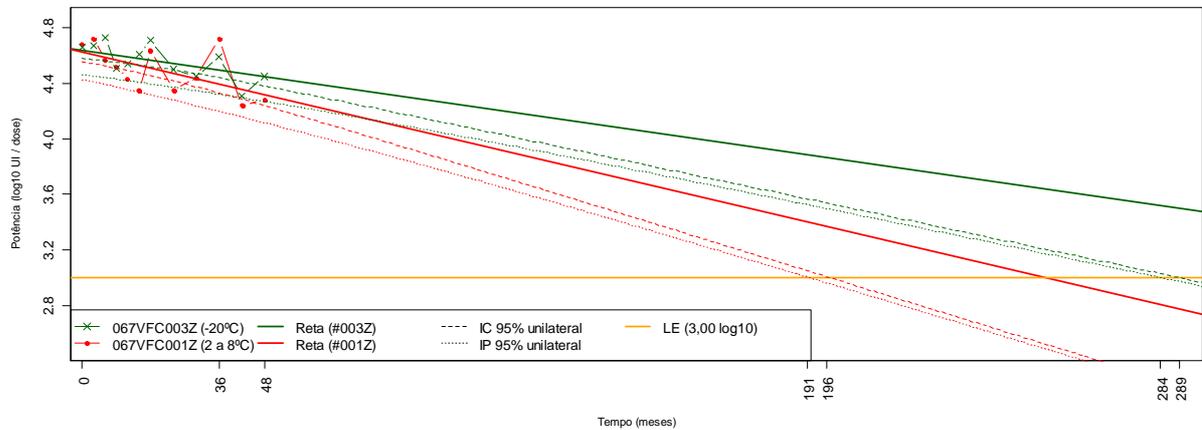


Figura 4.16. Retas de regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos preditivos (IP) obtidos a partir da extrapolação dos resultados de potência dos lotes 067VFC003Z (-20°C / 48 meses) e 067VFC001Z ($2-8^{\circ}\text{C}$ / 48 meses). dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses.

Comparando-se, através da ANCOVA, a inclinação das retas obtidas para as vacinas 10 doses armazenadas a -20°C com aquela obtida para as vacinas 10 doses a $2-8^{\circ}\text{C}$, verificou-se que não apresentavam diferença estatisticamente significativa entre si ($p\text{-valor} = 0,1331$). Entretanto, quando analisou-se a perda acumulada ao longo do tempo através da extrapolação dos dados, as retas de regressão para os diferentes grupos interceptaram o eixo do LE mínimo em diferentes tempos. Além dos resultados das retas de regressão linear, a Figura 4.16 apresenta os IC e os IP para ambos os lotes.

Seguindo o Guia Q1E/2003 (ICH 2003b) e considerando o IC, a extrapolação dos dados do lote 067VFC003Z – pior caso entre os lotes de vacina 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses – demonstrou que este lote teria um prazo de validade de 289 meses (≈ 24 anos) enquanto que o lote 067VFC001Z – pior caso entre os lotes de vacina 10 doses armazenados a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses – um prazo de validade de 196 meses ($\approx 16,5$ anos). Se considerarmos o IP, que é uma medida mais conservadora, já que tem a influência tanto do erro do modelo de regressão ajustado quando do erro das futuras observações, os prazos de validade seriam, respectivamente, 284 meses ($\approx 23,5$ anos) e 191 meses (≈ 16 anos) (Figura 4.16).

A Figura 4.17 apresenta os dados reais obtidos até o T48. Através dela verificou-se que tanto a reta da regressão linear quanto os IC e IP dos piores casos de -20°C e $2-8^{\circ}\text{C}$, estão bem

acima do LE mínimo, sugerindo que o produto armazenado em ambas as temperaturas é estável por pelo menos 48 meses.

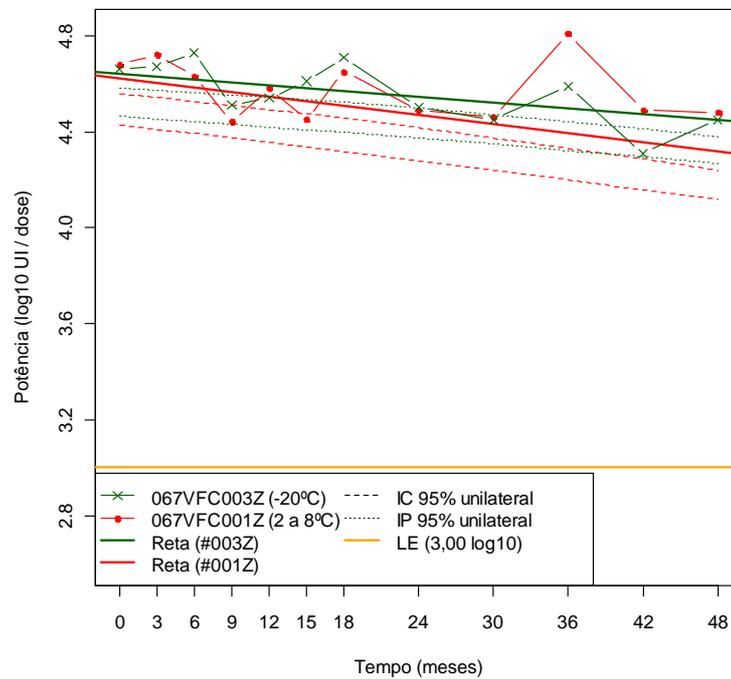


Figura 4.17. Retas de regressão, intervalos de confiança (IC) e intervalos preditivos (IP) obtidos a partir dos resultados de potência dos lotes 067VFC003Z (-20°C / 48 meses) e 067VFC001Z (2-8°C / 48 meses), dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses.

4.11. Extrapolação dos dados de termoestabilidade dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses

Para os dados de termoestabilidade, conforme verificado também para os resultados de potência, a análise pela ANCOVA demonstrou que a inclinação das retas obtidas para as vacinas 10 doses armazenadas a -20°C não tinha diferença estatisticamente significativa (p-valor = 0,1375) quando comparada à inclinação obtida para as vacinas 10 doses a 2-8°C. Entretanto, avaliando-se a perda acumulada ao longo do tempo com base nas retas de regressão, verificou-se que interceptavam o eixo do LE mínimo em tempos diferentes.

Considerando o IC, a extrapolação do lote 067VFC003Z demonstrou que este lote teria um prazo de validade de 247 meses ($\approx 20,5$ anos) enquanto que o lote 067VFC001Z, um prazo de

validade de 175 meses ($\approx 14,5$ anos). Se considerarmos o IP, os prazos de validade seriam, respectivamente, 240 meses (≈ 20 anos) e 168 meses (≈ 14 anos) (Figura 4.18).

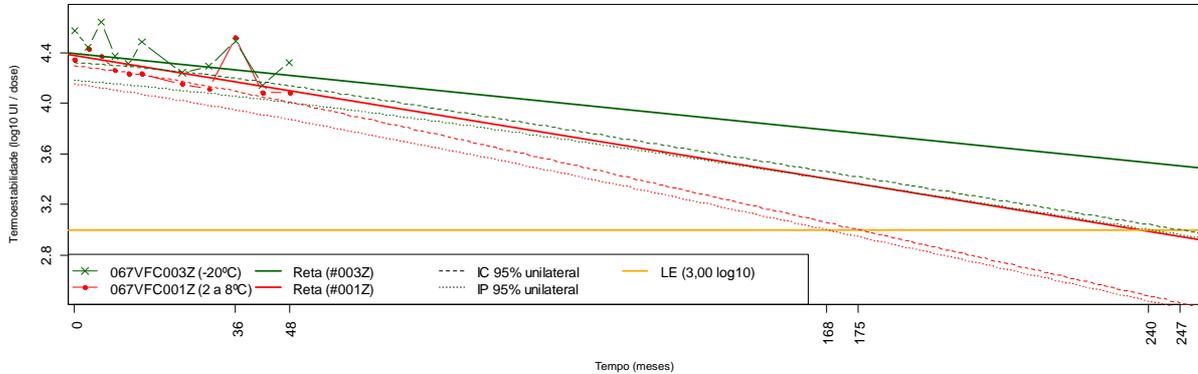


Figura 4.18. Retas de regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos preditivos (IP) obtidos a partir da extrapolação dos resultados de termostabilidade dos lotes 067VFC003Z (-20°C / 48 meses) e 067VFC001Z ($2-8^{\circ}\text{C}$ / 48 meses) dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses.

4.12. Umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses

Os resultados do teste de umidade residual realizados em amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses, demonstraram que todos os valores obtidos estão de acordo com o LE máximo de 3% (Tabela 4.17).

Tabela 4.17. Teste de umidade residual utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

		Tempo (meses)										
		T0	T3	T6	T9	T12	T18	T24	T30	T36	T42	T48
Lotes teste	067VFC001Z	0,48	0,38	X	X	0,88	X	0,48	0,37	0,53	0,57	0,61
	067VFC002Z	0,34	X	0,58	X	X	0,21	0,47	0,37	0,48	0,51	0,55
	067VFC003Z	0,45	X	X	0,57	X	X	0,63	0,80	0,63	0,63	0,89

X: Testes não previstos para estes tempos.

Quando aplicou-se a ANCOVA com $\alpha = 0,25$, o teste não rejeitou H_0 para a inclinação (p -valor = 0,4300) e rejeitou H_0 para os interceptos (p -valor = 0,0240), ou seja, não foi encontrada diferença significativa entre as inclinações das retas e foi encontrada diferença significativa entre os interceptos. Devido a isso, os dados puderam ser combinados com o propósito de estimar uma inclinação comum (Figura 4.19).

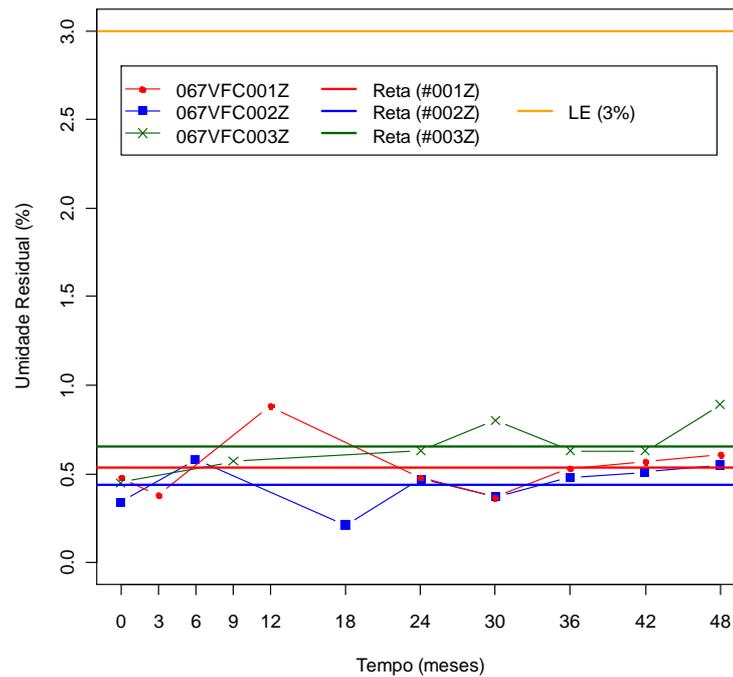


Figura 4.19. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses.

Neste caso, a inclinação comum das retas é 0,0031, e o p-valor = 0,0958 indica que o tempo não tem influência neste parâmetro, sugerindo que a umidade residual permanece estável ao longo do tempo. Os interceptos distintos estão descritos na Tabela 4.18.

Tabela 4.18. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de umidade residual dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses.

Lotes teste	Interceptos
067VFC001Z	0,4612
067VFC002Z	0,3589
067VFC003Z	0,5726

A Figura 4.20 apresenta os dados reais obtidos para o lote 067VFC003Z – o pior caso entre os lotes de vacina 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses – onde se observa que tanto a reta da regressão linear quanto os IC e IP estão bem abaixo do LE máximo, demonstrando que o produto armazenado a -20°C é estável por até 48 meses.

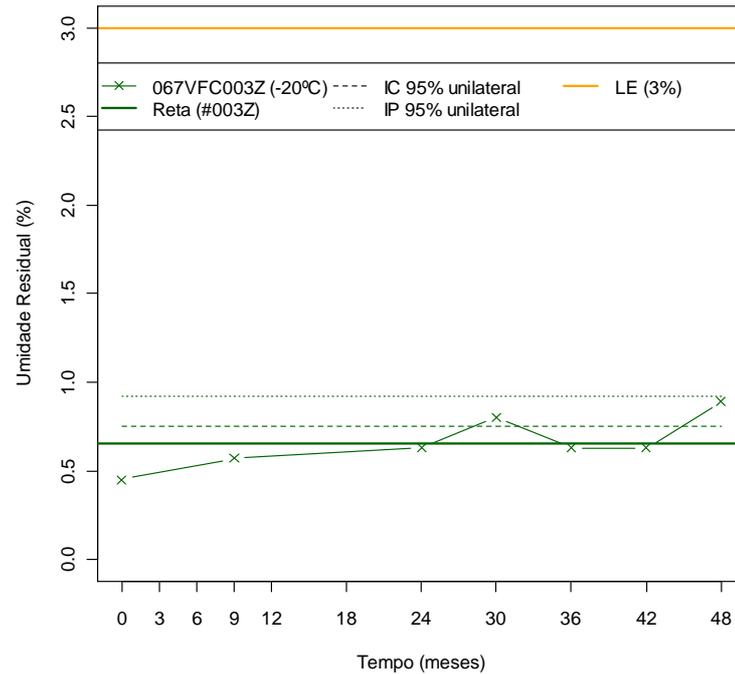


Figura 4.20. Reta de regressão, intervalo de confiança (IC) e intervalo preditivo (IP) obtidos a partir dos resultados de umidade residual do lote 067VFC003Z (-20°C / 48 meses) (pior caso) dos estudos de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses.

4.13. Umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses

Os resultados do teste de umidade residual realizados em amostras de vacina 10 doses armazenadas a 2-8°C por 48 meses, demonstraram que todos os valores obtidos também estão de acordo com a especificação de até 3% (Tabela 4.19).

Tabela 4.19. Teste de umidade residual utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

		Tempo (meses)										
		T0	T3	T6	T9	T12	T18	T24	T30	T36	T42	T48
Lotes teste	067VFC001Z	0,48	0,46	X	X	1,71	X	0,52	0,71	0,82	0,90	1,01
	067VFC002Z	0,34	X	0,96	X	X	0,42	0,59	0,75	0,77	0,91	1,00
	067VFC003Z	0,45	X	X	1,07	X	X	0,98	0,91	1,03	1,19	1,12

Entretanto, quando aplicada a ANCOVA para o este grupo, o teste não rejeitou H_0 para as inclinações (p-valor = 0,8200), nem para os interceptos (p-valor = 0,3150), ou seja, não foi encontrada diferença significativa entre as inclinações das retas nem entre os interceptos. Além

disso, quando verificou-se a influência do tempo, verificou-se que este não tinha influência (p -valor = 0,0632), admitindo-se inclinação igual a zero. Quando os dados foram agrupados, a inclinação comum das retas e o intercepto foram, respectivamente, 0,0080 e 0,63% (Figura 4.21).

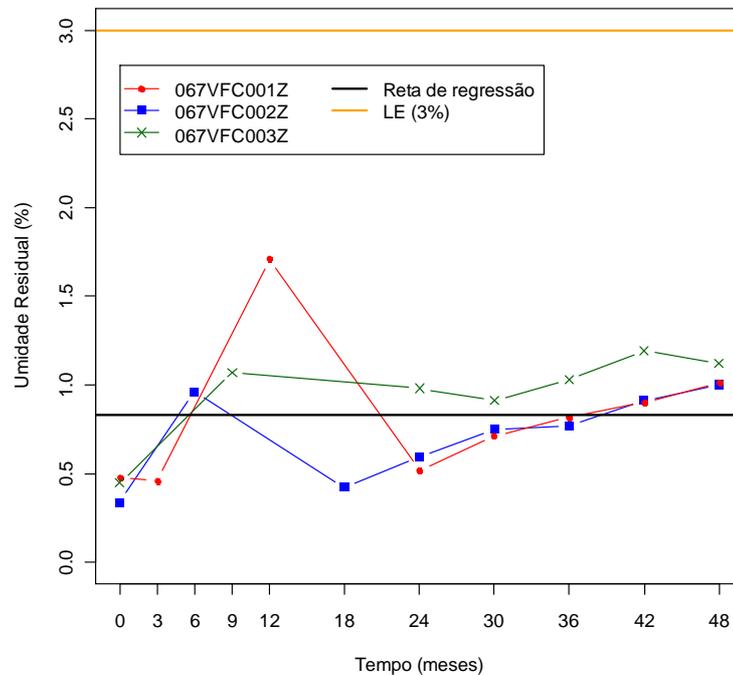


Figura 4.21. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses.

No entanto, analisando-se a Figura 4.21, verificamos que existe um ponto (T12 / 2-8°C) para o lote 067VFC001Z, cujo valor é de 1,71%, que está discordando dos demais valores obtidos. Isto pode ter ocorrido por fatores que podem invalidar um ensaio. Portanto, o mesmo procedimento estatístico realizado anteriormente foi novamente aplicado, desconsiderando este valor. Deste modo, o teste rejeita a hipótese da igualdade dos interceptos (p -valor = 0,0170), mas não rejeita a hipótese da igualdade das inclinações (p -valor = 0,9100). Assim, teremos 03 retas paralelas com interceptos distintos, conforme verifica-se na Figura 4.22.

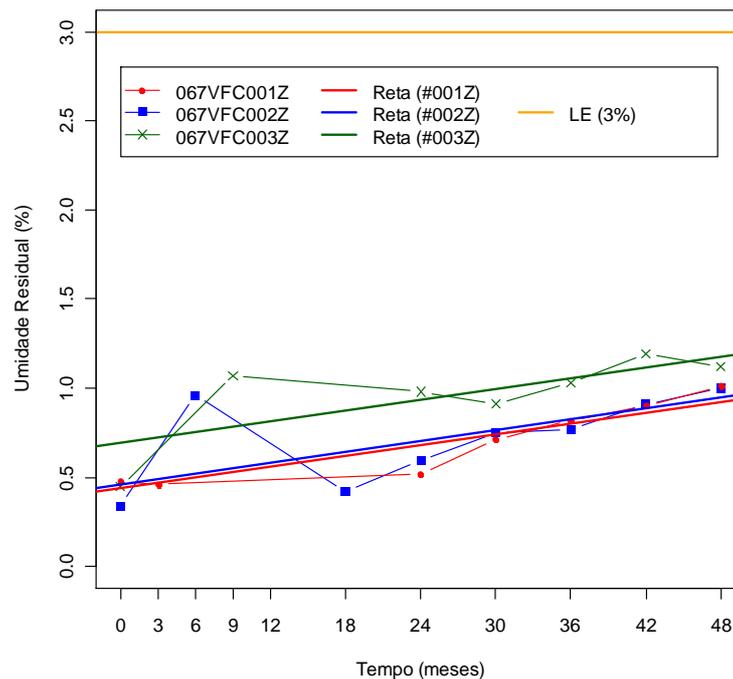


Figura 4.22. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de umidade residual do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a 2-8°C por 48 meses, excluindo-se o valor obtido para o lote 067VFC001Z em T12.

A inclinação comum das retas da Figura 4.22 é igual a 0,0101 e os interceptos conforme descritos na Tabela 4.20. Neste caso, o tempo tem influência na umidade residual (p -valor = 0,0003), sugerindo que nesta temperatura há um incremento neste parâmetro com o passar do tempo.

Tabela 4.20. Interceptos das retas de regressão linear obtidos para os resultados de umidade residual dos lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses.

Lotes teste	Interceptos
067VFC001Z	0,4358
067VFC002Z	0,4598
067VFC003Z	0,6914

No Figura 4.23, são apresentados os dados reais obtidos até T48 para o lote 067VFC003Z – pior caso entre os lotes de vacina 10 doses armazenados a 2-8°C por 48 meses. Pelo gráfico, pode-se verificar que tanto a reta da regressão linear quanto os IC e IP estão bem abaixo do LE máximo, demonstrando que o produto armazenado a 2-8°C é estável por até 48 meses.

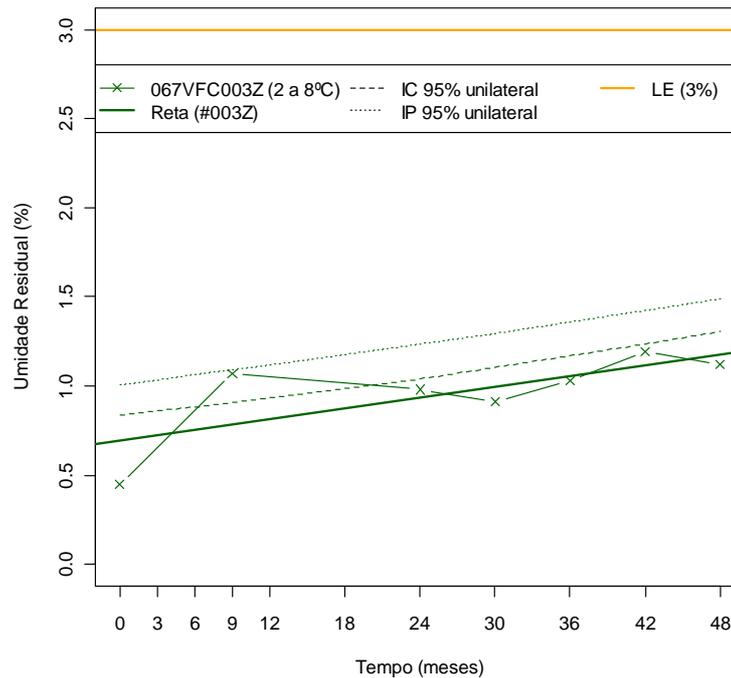


Figura 4.23. Reta de regressão, intervalo de confiança (IC) e intervalo preditivo (IP) obtidos a partir dos resultados de umidade residual do lote 067VFC003Z (2-8°C / 48 meses) (pior caso) do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses.

Quando comparamos as inclinações obtidas para os resultados de umidade residual das amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses com aquelas armazenadas a 2-8°C, encontrou-se diferença estatisticamente significativa (p -valor = 0,0135), comprovando que ocorre um incremento na umidade residual nas amostras armazenadas a 2-8°C.

4.14. Identidade, esterilidade, endotoxinas bacterianas, ovoalbumina residual e nitrogênio proteico do estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses

Além dos testes de potência, termoestabilidade e umidade residual, são pré-requisitos para liberação de lotes de vacina febre amarela (atenuada) para o mercado os testes de identidade, esterilidade, endotoxinas bacterianas, ovoalbumina residual e nitrogênio proteico. Estes testes foram realizados anualmente com os lotes de vacina 10 doses armazenados a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.

Os resultados obtidos para a identidade, esterilidade, endotoxinas bacterianas, ovoalbumina residual e nitrogênio proteico estão descritos respectivamente nas Tabelas 4.21, 4.22, 4.23, 4.24 e 4.25.

Tabela 4.21. Teste de identidade utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.

Tempo (meses)	Lotes teste					
	067VFC001Z		067VFC002Z		067VFC003Z	
	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C
T0	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T24	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T36	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T48	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabela 4.22. Teste de esterilidade utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.

Tempo (meses)	Lotes teste					
	067VFC001Z		067VFC002Z		067VFC003Z	
	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C
T0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T24	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T36	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T48	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Tabela 4.23. Teste de endotoxinas bacterianas (UE/dose) utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.

Tempo (meses)	Lotes teste					
	067VFC001Z		067VFC002Z		067VFC003Z	
	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C
T0	0,1150	0,1150	0,0864	0,0864	0,0810	0,0810
T24	0,8600	0,1320	0,1282	0,1030	0,0932	0,1350
T36	0,1380	0,1690	0,1322	0,1820	0,0721	0,1180
T48	0,0834	0,0590	0,0581	0,0645	0,0638	0,0473

Tabela 4.24. Teste de ovoalbumina residual ($\mu\text{g}/\text{dose}$) utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.

Tempo (meses)	Lotes teste					
	067VFC001Z		067VFC002Z		067VFC003Z	
	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C
T0	0,128	0,128	0,235	0,235	0,461	0,461
T24	0,079	0,197	0,144	0,152	0,273	0,293
T36	0,110	0,041	0,186	0,147	0,377	0,276
T48	0,076	0,036	0,150	0,034	0,281	0,075

Tabela 4.25. Teste de nitrogênio proteico (mg/dose) utilizado no estudo de estabilidade longa duração da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada a -20°C e a 2-8°C por 48 meses.

Tempo (meses)	Lotes teste					
	067VFC001Z		067VFC002Z		067VFC003Z	
	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C	-20°C	2-8°C
T0	0,064	0,064	0,064	0,064	0,086	0,086
T24	0,080	0,071	0,098	0,079	0,082	0,074
T36	0,109	0,083	0,106	0,091	0,091	0,119
T48	0,110	0,087	0,065	0,071	0,089	0,088

Como pode ser verificados nas tabelas acima, todos os parâmetros avaliados anualmente estão de acordo com suas respectivas especificações, descritas na Tabela 1.1.

4.15. Potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 06 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada

A estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) deve ser verificada também quando esta é reconstituída com o respectivo diluente. A fim de verificar a estabilidade após a reconstituição, foram realizados testes de potência e esterilidade. Para a realização destes testes, amostras de vacina 10 doses na sua forma liofilizada armazenadas por 06 meses a 2-8°C foram reconstituídas e armazenadas por mais 08 horas a 2-8°C. O mesmo procedimento foi realizado com amostras de vacina 10 doses que permaneceram por 48 meses armazenadas a -20°C e a 2-8°C na sua forma liofilizada. Ambas foram reconstituídas e armazenadas por mais 08 horas a 2-8°C.

Quando aplicou-se ANCOVA considerando estes 03 grupos como um único grupo, verificou-se que o H_0 foi rejeitado tanto para as inclinações (p -valor = 0,0063) quanto para os interceptos (p -valor = 0,0002), devendo-se assim ajustar uma reta para cada lote. Por isso, a análise foi refeita considerando cada grupo separadamente, a fim de verificar se expostas a diferentes condições, as amostras tem comportamentos semelhantes.

A Tabela 4.25 apresenta os resultados de potência obtidos quando as amostras de vacina 10 doses, previamente armazenadas a 2-8°C por 06 meses em sua forma liofilizada, foram reconstituídas e armazenadas nesta forma por mais 08 horas a 2-8°C.

Tabela 4.26. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 06 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada..

Lotes teste	Tempo (horas)			
	T0	T3	T6	T8
067VFC001Z	4,57	4,45	4,53	4,53
067VFC002Z	4,78	4,66	4,63	4,73
067VFC003Z	4,70	4,57	4,49	4,53

De acordo com os resultados descritos na Tabela 4.25 e apresentados graficamente na Figura 4.24, observa-se que todos os títulos encontrados no teste de potência estão acima de 3,00 log₁₀ UI/dose.

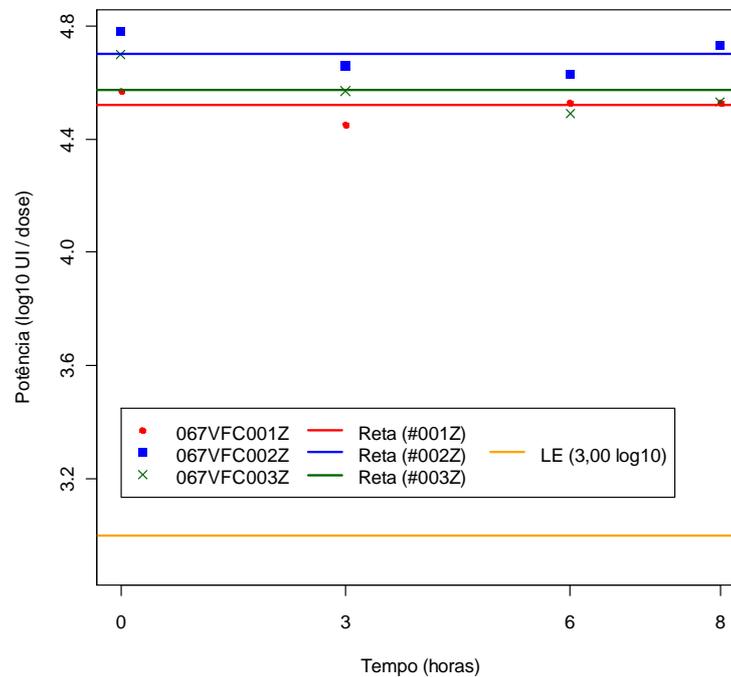


Figura 4.24. Retas de regressão linear obtidas a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 06 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada.

Aplicando-se a ANCOVA para este grupo, foi verificado que não houve rejeição do H_0 para as inclinações (p -valor = 0,4050), mas o mesmo foi rejeitado para os interceptos (p -valor = 0,0180). Além disso, observou-se que o tempo não tem influência no título da vacina (p -valor = 0,120) e, portanto, para este grupo, deve-se ajustar três retas paralelas com inclinação que pode ser considerada como zero e interceptos diferentes – 4,5200, 4,7000 e 4,5725, respectivamente, para os lotes 067VFC001Z, 067VFC002Z e 067VFC003Z – conforme demonstrado na Figura

4.24. Como o tempo não tem influência no título, sugere-se que a potência permanece estável ao longo do tempo, após a reconstituição.

4.16. Potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a -20°C em sua forma liofilizada

A Tabela 4.26 apresenta os resultados de potência obtidos quando as amostras de vacina 10 doses, previamente armazenadas a -20°C por 48 meses em sua forma liofilizada, foram reconstituídas e armazenadas nesta forma por mais 08 horas a 2-8°C.

Tabela 4.27. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a -20°C em sua forma liofilizada.

Lotes teste	Tempo (horas)			
	T0	T30	T6	T8
067VFC001Z	4,57	4,85	4,83	4,85
067VFC002Z	4,69	4,86	4,99	4,90
067VFC003Z	4,49	4,94	4,94	5,10

De acordo com os resultados descritos na Tabela 4.26 e apresentados graficamente na Figura 4.25, observa-se que todos os títulos encontrados no teste de potência estão acima de 3,00 log 10 UI/dose.

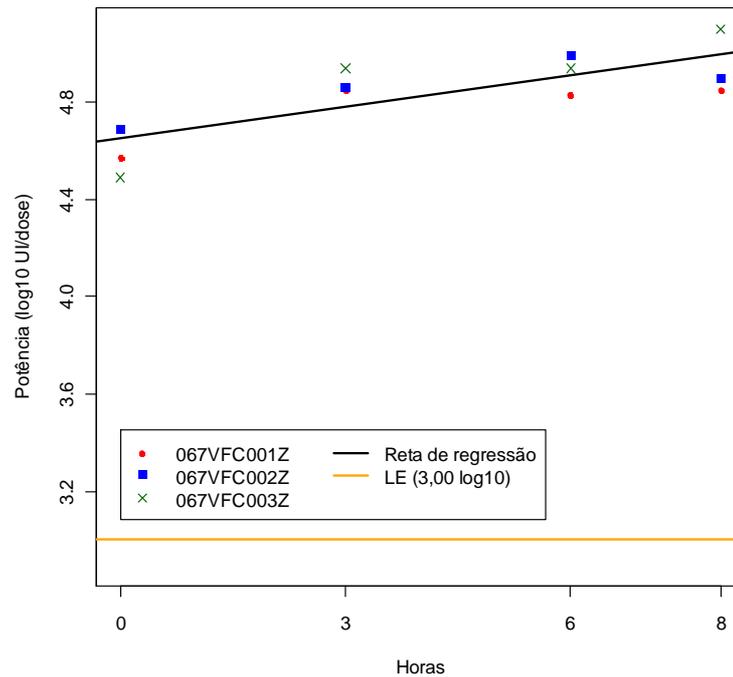


Figura 4.25. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a -20°C em sua forma liofilizada.

No caso deste grupo, verificamos que o H_0 não foi rejeitado nem para as inclinações (p -valor = 0,2970) nem para os interceptos (p -valor = 0,4520). Além disso, observa-se que o tempo tem influência no título da vacina (p -valor = 0,0060) e, para este grupo, deve-se ajustar uma reta única para os três lotes, com inclinação de 0,0432 e intercepto de 4,6504, conforme demonstrado na Figura 4.25. Como a inclinação é positiva, sugere-se que há um aumento no título com o passar do tempo de armazenamento na forma reconstituída. Entretanto, este comportamento não seria biologicamente possível. Uma possível explicação para este fato seria que logo após a reconstituição, os vírus ainda estariam agregados, e que ao longo das 08 horas de armazenamento, eles se desagregariam, formando mais plaques no teste de potência e, conseqüentemente, aumentando o título obtido.

4.17. Potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada

A Tabela 4.27 apresenta os resultados de potência obtidos quando as amostras de vacina 10 doses, previamente armazenadas a 2-8°C por 48 meses em sua forma liofilizada, foram reconstituídas e armazenadas nesta forma por mais 08 horas a 2-8°C.

Tabela 4.28. Teste de potência utilizado no estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenadas por 48 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada.

Lotes teste	Tempo (horas)			
	T0	T3	T6	T8
067VFC001Z	4,47	4,70	4,73	4,82
067VFC002Z	4,65	4,70	4,81	4,88
067VFC003Z	4,52	4,91	4,85	4,96

De acordo com os resultados descritos na Tabela 4.27 e apresentados graficamente na Figura 4.26, observa-se que todos os títulos encontrados no teste de potência estão acima de 3,00 log₁₀ UI/dose.

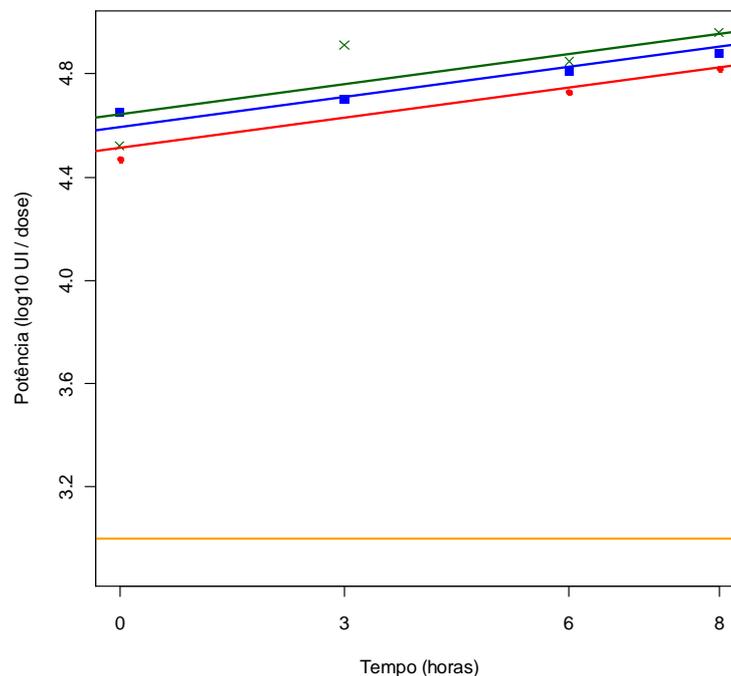


Figura 4.26. Reta de regressão linear obtida a partir dos resultados de potência do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses armazenada por 48 meses a 2-8°C em sua forma liofilizada.

Para este grupo, não rejeitou-se H_0 para as inclinações (p-valor = 0,6790), mas rejeitou-se para os interceptos (p-valor = 0,1750). Além disso, foi verificada a influência do tempo (p-valor = 0,003). Portanto, ajustaram-se 03 retas com inclinação única – 0,039 – e interceptos diferentes – 4,51424, 4,59424 e 4,64424 para os lotes 067VFC001Z, 067VFC002Z e 067VFC003Z, respectivamente – conforme Figura 4.26, sugerindo o aumento do título ao longo do tempo.

4.18. Esterilidade do estudo de estabilidade pós-reconstituição da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses

Os 03 diferentes grupos de vacina 10 doses testados para potência, foram também testados para esterilidade, já que o produto é multidoso.

Todos os resultados obtidos para os 03 grupos de lotes testados tiveram resultados satisfatórios para este parâmetro em todos os tempos testados.

5. DISCUSSÃO

Os estudos de estabilidade permitem indicar o prazo de validade de um produto, além das condições ideais de armazenamento e de uso e são imprescindíveis para garantir eficácia e segurança. Além disso, segundo a RDC 315/2005 (Brasil 2005b) e a RDC 55/2010 (Brasil 2010c), o relatório de estudos de estabilidade é um dos documentos indispensáveis que compõem o processo de registro do produto junto à ANVISA. Devido ao interesse de BM em estender o prazo de validade das vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses para 36 meses, quando armazenadas a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$, foram realizados estudos de estabilidade com ambas as apresentações do produto, para verificar seu desempenho até o final do novo prazo de validade proposto. Esta proposta é viável devido ao avanço do processo de liofilização do produto além da adição de substâncias estabilizadoras na formulação, como solução de sacarose 50% e solução de glutamato de sódio 50% (Nicolau 1988 e Freire 2004).

Os dados foram analisados por regressão, conforme recomenda o Guia Q1E/2003 (ICH 2003b). Portanto, assumiu-se que a relação das variáveis quantitativas analisadas em função do tempo era linear. Além disso, por serem derivados da mesma formulação, diferenciando-se apenas no volume de envase, ambas as apresentações podem ser comparadas.

Em BM, os testes de potência são realizados pelo método de UFP e expressos em escala logarítmica. Entretanto, a OMS, através do "*Requirements for yellow fever vaccine (Requirements for biological substances n° 3) Proposed amendment*" (WHO 2008), recomenda que os resultados sejam expressos em UI. Por ter sido utilizado o mesmo lote de referência "*in house*" durante todo o período dos testes de potência, foi possível fazer a conversão de todos os resultados para UI. A possibilidade desta conversão foi muito importante, pois há uma calibração contra a vacina de referência reduzindo as variações inerentes ao teste em matrizes celulares.

Em 2006, BM produziu os 03 primeiros lotes da vacina 10 doses (067VFC001Z, 067VFC002Z e 067VFC003Z), denominados lotes de consistência. Foram realizados testes de potência e termoestabilidade periodicamente e todos os resultados encontrados, tanto para as

amostras armazenadas a -20°C como a $2-8^{\circ}\text{C}$, estavam de acordo com as especificações exigidas pelas normas nacionais e internacionais.

A análise estatística aplicada aos resultados de potência obtidos para as amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses demonstrou que as 03 retas obtidas pela regressão linear não possuíam diferença significativa entre as inclinações, mas a possuíam para os interceptos. Isto indica que o comportamento destes lotes pode ser considerado igual, ou seja, a perda média mensal esperada da potência é independente dos resultados obtidos para a potência na liberação (T_0) dos lotes e é igual a 0,0040.

Para os resultados de potência das amostras de vacina 10 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses, a análise estatística demonstrou que as 03 retas obtidas pela regressão linear não possuíam diferença significativa entre as inclinações, mas a possuíam para os interceptos. Isto significa que o comportamento dos lotes deste grupo pode ser considerado igual, sugerindo que a perda média mensal esperada da potência independe dos resultados obtidos para a potência na liberação dos lotes e é igual a 0,0064.

A comparação da perda média mensal do título da potência das amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C com aquelas armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$, verificou-se que não possuíam diferença estatisticamente significativa. Este resultado sugere uma semelhança entre o comportamento deste parâmetro em ambas as temperaturas de armazenamento.

Quando analisou-se os dados de termoestabilidade obtidos para as amostras de vacina 10 doses foram armazenadas por 48 meses a -20°C , as 03 retas obtidas pela regressão linear também não demonstraram diferença significativa entre as inclinações, somente entre os interceptos. Isto indica que o comportamento dos lotes nestas condições pode ser considerado igual, ou seja, a perda média mensal da termoestabilidade independe dos resultados obtidos para este parâmetro na liberação dos lotes é igual a 0,0036.

O mesmo comportamento foi observado para os resultados de termoestabilidade das amostras de vacina 10 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses. As 03 retas obtidas pela regressão linear também não possuíam diferença significativa entre as inclinações, somente entre os interceptos. Isto demonstra que o comportamento dos lotes deste grupo pode ser considerado igual, ou seja, a perda média mensal da termoestabilidade é independente dos resultados obtidos para este parâmetro na liberação dos lotes e é igual a 0,0058.

Quando comparou-se a perda média mensal do título da termoestabilidade das amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C com aquelas armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$, verificou-se que não

possuíam diferença estatisticamente significativa. Este resultado sugere que os comportamentos deste parâmetro a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$ são semelhantes.

Como a única diferença entre as amostras testadas para potência e termoestabilidade é que aquelas testadas para termoestabilidade permaneceram por 14 dias a 37°C , compararam-se as inclinações. Em ambos os casos, as inclinações também não apresentaram diferença significativa, indicando que o comportamento dos lotes no que diz respeito aos parâmetros potência e termoestabilidade apresentam semelhança em relação à inclinação.

A semelhança no comportamento dos resultados de potência e termoestabilidade para as amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses pôde ser comprovada quando foi avaliada a perda de título, ou seja, quando foi avaliada a diferença encontrada entre a potência e a termoestabilidade. Neste caso, também não foi encontrada diferença significativa entre as inclinações, nem influência do tempo no título, podendo-se admitir que a inclinação é zero. O mesmo comportamento foi observado para os resultados da perda, quando as amostras de vacina 10 doses foram armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses. Neste caso, também não foi encontrada diferença significativa entre as inclinações e verificou-se que o tempo não tinha influência na perda, podendo-se admitir também que a inclinação é zero. A inclinação zero demonstra que, no decorrer do tempo de armazenamento, a perda resultante da análise de um determinado lote permanece constante, apesar de os 03 lotes de cada grupo de temperatura (-20°C e $2-8^{\circ}\text{C}$) terem apresentado perdas médias distintas (interceptos distintos). Como a perda é uma relação entre potência e termoestabilidade, pode-se confirmar que a inclinação de ambos os parâmetros não têm diferenças significativas, como demonstrado pelos testes aplicados acima, confirmando que elas possuem comportamento semelhante quanto a perda de título ao longo do período de armazenamento.

Em 2000, Perraut *et al* (2000) realizaram um estudo de estabilidade com lotes de vacina febre amarela (atenuada) 10, 20 e 50 doses, produzidas pelo “*Institut Pasteur*”, Dakar, a fim de estender o prazo de validade destes produtos de 24 para 36 meses. Para isso, testes de potência e termoestabilidade foram realizados em amostras na liberação do produto (T0) e após 36 meses de armazenamento a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$. Para a análise estatística foram aplicados o teste de correlação de Spearman e o teste dos postos de Wilcoxon. Os resultados demonstraram que a vacina, nas 03 apresentações, mantinha sua potência de acordo com a especificação por até 36 meses, conforme demonstrado acima, para a vacina 10 doses de BM.

No entanto, vale ressaltar que o estudo citado acima foi realizado antes da publicação dos guias do ICH para estudos de estabilidade, incluindo o Guia Q1E/2003 (ICH 2003b), o qual

recomenda a regressão linear como análise estatística a ser utilizada para avaliação de dados obtidos a partir de estudos de estabilidade. Mesmo utilizando uma análise diferente daquela atualmente recomendada, os resultados foram semelhantes àqueles encontrados pela aplicação da regressão linear e ANCOVA aos dados do estudo de estabilidade realizado com a vacina 10 doses de BM.

Os dados de potência e termoestabilidade obtidos até o 48º mês de armazenamento, em ambas as temperaturas, foram extrapolados a fim de estimar o possível prazo de validade da vacina 10 doses produzida em BM. Para esta extrapolação, foram utilizados, além da regressão linear e ANCOVA, o IC, conforme recomendação do Guia Q1E/2003 (ICH 2003b) e o IP, sugerido por Schofield (2009). Na análise estatística, verificamos que, em todos os casos avaliados até o momento, as inclinações não tinham diferença significativa enquanto que os interceptos apresentavam diferença significativa. Portanto, para a extrapolação dos dados de potência e termoestabilidade, foram utilizados o pior caso entre os lotes de vacina 10 doses armazenados a -20°C por 48 meses, ou seja, o lote 067VFC003Z, e o pior caso entre os lotes de vacina 10 doses armazenados a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses, ou seja, o lote 067VFC001Z, conforme recomenda o Guia Q1E/2003 (ICH 2003b). Os piores casos são aqueles para os quais foram encontrados os valores mais próximos ao limite de especificação mínimo para os parâmetros potência e termoestabilidade.

Quando foi utilizado o intervalo de confiança (IC) de 95% dos piores casos para estimar o prazo de validade da vacina 10 doses com base nos resultados de potência, comprovou-se que o lote 067VFC001Z armazenado a $2-8^{\circ}\text{C}$ teria um prazo de validade de 196 meses ($\approx 16,5$ anos), enquanto que no lote 067VFC003Z armazenado a -20°C , a validade seria estendida para 289 meses (≈ 24 anos). Estes resultados demonstraram que, embora a perda mensal média não tenha diferença significativa quando comparamos as duas temperaturas, a perda acumulada é diferente para as duas situações.

Como a termoestabilidade também é um parâmetro de qualidade que deve ser avaliado para aprovação do produto, a mesma análise descrita acima foi realizada para estes dados. Nesta caso, determinou-se que o lote 067VFC001Z armazenado a $2-8^{\circ}\text{C}$ teria um prazo de validade de 175 meses ($\approx 14,5$ anos) enquanto que o lote 067VFC003Z armazenado a -20°C se estenderia até 247 meses ($\approx 20,5$ anos). Esses prazos de validade teóricos demonstram que a perda mensal média pode não ter diferença significativa, quando comparamos as duas temperaturas, porém, a perda acumulada é diferente para ambas.

Os prazos de validade determinados acima foram baseados na extrapolação de dados reais obtidos até o 48º mês de armazenamento a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$, como forma de ilustrar a estabilidade da vacina 10 doses. A extrapolação sugere tempos nos quais os resultados de estabilidade ainda estariam de acordo com os limites aceitáveis. Entretanto, os resultados das extrapolações devem ser interpretados com muito cuidado, dado ao limitado tamanho das amostras e a imposição do modelo utilizado, que estabelece uma relação linear entre o tempo e as medidas de estabilidade. De fato, não se pode afirmar que o produto se manteria estável até o final do prazo de validade estimado, pois não temos como garantir que esta relação continuaria linear, principalmente em se tratando de um produto biológico. Um estudo posterior, considerando medidas realizadas em intervalos de tempos maiores, poderia corroborar esta hipótese. Além disso, a análise de regressão somente fornece resultados confiáveis dentro do intervalo de dados reais, não sendo a ferramenta mais adequada para realizar extrapolações (Montgomery *et al* 2001).

Segundo Schofield (2009), uma ferramenta que pode ser utilizada para prever valores em outros tempos de análise ou de outros lotes é o IP de 95%. Seguindo esta ferramenta, a mesma análise citada acima, porém utilizando o IP de 95%, foi utilizada para estimar o prazo de validade. O IP gera um resultado mais conservador, pois este intervalo é influenciado por dois erros: o erro do modelo ajustado pela regressão linear e o erro das futuras observações. Neste caso, tendo como base os resultados de potência, o lote 067VFC001Z armazenado a $2-8^{\circ}\text{C}$ teria um prazo de validade de 191 meses (≈ 16 anos), enquanto que o lote 067VFC003Z armazenado a -20°C atingiria 284 meses ($\approx 23,5$ anos). Já, analisando-se os resultados de termoestabilidade, o lote 067VFC001Z armazenado a $2-8^{\circ}\text{C}$ teria um prazo de validade de 168 meses (≈ 14 anos) e o lote 067VFC003Z armazenado a -20°C de 240 meses (≈ 20 anos). Conforme descrito acima, estes dados são teóricos e servem apenas para ilustrar a estabilidade da vacina 10 doses. Além disso, o IP também fornece resultados confiáveis somente dentro do intervalo de dados reais, não sendo uma ferramenta adequada para realizar extrapolações.

Quando foram considerados somente os dados reais de potência dos piores casos, verificou-se que tanto a reta de regressão quanto os IC e IP dos piores casos de ambas as temperaturas estavam bem acima da linha do limite de especificação mínimo. Estes dados demonstram que o produto armazenado tanto a -20°C como a $2-8^{\circ}\text{C}$ é estável por 48 meses, sugerindo que o prazo de validade proposto poderia ser estendido para, no mínimo, 48 meses, ao invés de 36 meses.

No entanto, para solicitar o prazo de validade de 48 meses (04 anos), estudos adicionais de potência e termoestabilidade deveriam ser realizados em amostras armazenadas em ambas as

temperaturas por 60 meses (05 anos), a fim de comprovar que o comportamento destes produtos permanece de acordo com o previsto na extrapolação dos dados, conforme discutido acima.

Quando foram analisados os resultados de potência dos lotes de vacina 05 doses armazenados a -20°C por 36 meses e produzidos entre 2003 e 2006, foi verificado que os mesmos apresentavam comportamentos diferentes entre si. Entretanto, quando foram comparados os períodos de produção, observou-se que os lotes produzidos no mesmo ano apresentavam comportamentos semelhantes. Esta diferença pode estar relacionada ao tipo de estudo realizado na época, ou seja, um estudo de acompanhamento anual da estabilidade, além da quantidade reduzida de dados de potência obtidos combinada com o número reduzido de lotes de vacina 05 doses testados.

Segundo a RE 1/2005 (Brasil 2005a), os estudos de acompanhamento anual da estabilidade são realizados para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade longa duração. É um plano de monitoramento contínuo, entretanto, o desenho e a análise destes estudos não são específicos, levando a diferenciadas práticas que podem gerar interpretações erradas dos dados obtidos durante o acompanhamento (Egan e Schofield 2009).

Como não estão disponíveis guias para a análise de dados obtidos a partir de estudos de acompanhamento anual da estabilidade, muitos autores acreditam que o resultado de cada teste individualmente deveria satisfazer às especificações, conforme preconiza o modelo de conformidade, descrito no item 3.5.1. Entretanto, este tipo de análise pode se mostrar inconsistente podendo obter dados fora da especificação, comprometendo o produto e fazendo com que a empresa sofra ações regulatórias (Egan e Schofield 2009). Resultados que não satisfazem as especificações ou tendências atípicas devem ser investigados e, se confirmados, devem ser imediatamente informados às agências regulatórias para avaliação do possível impacto nos lotes que já estão no mercado ou que ainda serão produzidos (WHO 2009).

Uma das estratégias utilizadas para diminuir o risco de obtenção de dados fora da especificação é considerar como referência o IP de 95% (Schofield 2009). Desta forma, os dados de potência obtido para as amostras de vacina 05 doses armazenadas a -20°C por 36 meses foram comparados aos dados de potência do pior caso da vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses – 067VFC003Z –, tendo como base o IP de 95% obtido para este lote. A comparação demonstrou que a maioria dos resultados obtidos então acima do limite inferior do IP de 95%, demonstrando a estabilidade também dos lotes de vacina 05 doses, quando armazenados por 36 meses a -20°C .

Um estudo complementar de acompanhamento da estabilidade foi realizado com a vacina 05 doses utilizando lotes que foram produzidos em 2005 e 2006 e armazenados a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses. Neste estudo, a potência foi testada somente em T0 e T48. Quando foram comparados os resultados de potência para as amostras de vacina 05 doses armazenadas a -20°C por 48 meses com o IP de 95% do pior caso da vacina 10 doses armazenada a -20°C por 48 meses – 067VFC003Z -, como realizado anteriormente, verificou-se que a maioria dos resultados obtidos também estavam acima do limite inferior do IP de 95%, demonstrando a estabilidade também dos lotes de vacina 05 doses armazenadas a -20°C por 48 meses.

Da mesma forma, ao analisar os dados de potência para as amostras de vacina 05 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses, comparando-se com o IP do pior caso das amostras de vacina 10 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses – 067VFC001Z -, também foi verificado que a maioria dos resultados obtidos estavam acima do limite inferior do IP de 95%, demonstrando a estabilidade dos lotes de vacina 05 doses armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses.

A umidade residual foi também analisada, pois, além de ser preconizada pelos compêndios oficiais, segundo Pikal e Shah (1992) a estabilidade de produtos liofilizados frequentemente é sensível ao teor de umidade. É importante salientar que mesmo que o produto tenha um baixo teor de umidade na liberação (T0), isto não garante que o teor permaneça constante durante todo o prazo de validade. A umidade presente na rolha pode ser um dos fatores responsáveis por um incremento na umidade do produto ao longo do tempo de armazenamento.

Todos os resultados de umidade residual obtidos para as amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses se apresentaram de acordo com o limite de especificação máximo permitido pela legislação. Para os resultados obtidos para as amostras de vacina 10 doses armazenadas a -20°C por 48 meses, as 03 retas são paralelas, indicando que os 03 lotes possuem o mesmo comportamento em relação à umidade residual. Além disso, o tempo não tem influência significativa neste parâmetro, sugerindo que ele permanece constante ao longo do tempo de armazenamento. Quando foram calculados os IC e IP para o pior caso deste grupo - lote 067VFC003Z - verificou-se que todos os resultados ainda permaneciam bem abaixo do limite de especificação máximo, demonstrando que o produto armazenado a -20°C é estável por, no mínimo, 48 meses.

Para os resultados de umidade residual das amostras armazenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses, não foram observadas diferenças significativas para as inclinações e interceptos, podendo-se ajustar uma única reta para os 03 lotes. Neste caso, o tempo também não teve influência significativa no parâmetro, sugerindo que o comportamento entre os lotes deste grupo pode ser

considerado igual e que ele permanece constante ao longo do tempo de armazenamento. Quando os IC e IP foram calculados, foi possível verificar que tanto a reta da regressão quanto os IC e IP dos lotes armazenados a 2-8°C, estavam bem abaixo do limite de especificação máximo, indicando que o produto armazenado nesta temperatura também é estável por, no mínimo, 48 meses, no que diz respeito ao parâmetro umidade residual.

Contudo, analisando-se os dados deste grupo, verificou-se que existia um resultado discrepante (1,71% p/V) em T12 / 2-8°C para o lote 067VFC001Z. Isso pode ter ocorrido por fatores que podem invalidar um ensaio, tais como contaminação do reagente ou da amostra pela umidade do ar, aplicação incorreta da técnica e manipulação da amostra. Quando os resultados de umidade residual das amostras de vacina 10 doses armazenadas a 2-8°C por 48 meses foram reanalisados, desconsiderando aquele valor, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as inclinações, mas foi encontrada entre os interceptos, indicando que o comportamento entre os lotes deste grupo pode ser considerado igual. Neste caso, o incremento médio mensal esperado da umidade residual é independente dos resultados obtidos para este parâmetro na liberação dos lotes e é igual a 0,0104. Com base nisso, foram calculados os IC e IP para o pior caso - lote 067VFC003Z - e verificou-se que tanto a reta da regressão quanto os IC e IP estavam bem abaixo do limite de especificação máximo, demonstrando que o produto armazenado a 2-8°C também é estável por até 48 meses. Outro ponto importante é que quando comparamos a inclinação (incremento médio mensal na umidade residual) das amostras a -20°C com as a 2-8°C, verificamos que elas possuem diferença estatisticamente significativa. Além disso, o incremento médio mensal da umidade residual de amostras armazenadas a 2-8°C foi maior que em amostras a -20 °C.

No entanto, manter a estabilidade na forma liofilizada após 48 meses de armazenamento não é suficiente para garantir a qualidade e eficácia do produto para o consumidor final. Isto se deve ao fato de a vacina febre amarela (atenuada) ser multídose e necessitar ser reconstituída no momento de sua utilização. Segundo a bula deste produto, a vacina reconstituída pode ser armazenada a 2-8°C por até 06 horas.

Portanto, foi realizado um estudo de estabilidade pós-reconstituição. Foram realizados testes de potência e esterilidade em amostras de vacina 10 doses armazenadas em sua forma liofilizada a 2-8°C por 06 meses e então reconstituídas e armazenadas a 2-8°C por 08 horas, em amostras armazenadas em sua forma liofilizada a -20°C por 48 meses e então reconstituídas e armazenadas a 2-8°C por 08 horas e em amostras armazenadas em sua forma liofilizada a 2-8°C por 48 meses e então reconstituídas e armazenadas a 2-8°C por 08 horas.

Analisando-se os dados de potência obtidos para estes 03 grupos, verificou-se que os comportamentos entre eles eram diferentes, mas o comportamento intragrupo era semelhante. Apesar de possuírem comportamentos distintos, todos os resultados obtidos para o teste de potência e esterilidade estavam de acordo com as respectivas especificações. Isto demonstra que, mesmo após 48 meses armazenadas a -20°C ou a $2-8^{\circ}\text{C}$, as vacinas podem permanecer pós-reconstituídas por até 08 horas se estocadas a $2-8^{\circ}\text{C}$, sem alterações no título do produto e na esterilidade.

Embora já exista um protocolo a ser seguido para a análise de dados obtidos a partir de estudos de estabilidade, o Guia Q1E/2003 (ICH 2003b), propondo o uso de regressão linear, uma análise futura com relação do ponto de vista metodológico estatístico seria considerar modelos lineares ou não, levando em consideração a dependência natural que existe entre as amostras das vacinas. Neste caso, poderiam ser utilizados os modelos para medidas repetidas, utilizando uma abordagem hierárquica (modelos de efeitos mistos). Para considerar possíveis relações não-lineares, modelo aditivos generalizados (GAM) poderiam também ser utilizados.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se propor junto a ANVISA a extensão do prazo de validade da vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses. Para isso, segundo a RDC 315/2005 (Brasil 2005b), deve-se protocolizar na ANVISA um processo solicitando a alteração do registro, uma vez que este produto, em ambas as apresentações, já está registrado no órgão sanitário.

Para a elaboração do processo, uma lista de documentos são exigidos. Esta lista está disponível no sítio da ANVISA no endereço <https://www9.anvisa.gov.br/peticionamento/sat/Consultas/ConsultaAssunto.asp>. Nesta página deve-se selecionar a “Área: Medicamentos”, e em seguida estará disponível uma lista de assuntos. No caso da extensão do prazo de validade, deve-se selecionar o assunto “PRODUTO BIOLÓGICO – Alteração do prazo de validade”, sob o código 1510. Desta forma, será disponibilizada a lista de documentos necessários para esta alteração, conforme descrito abaixo:

- Formulário de petição – FP1 e FP2 devidamente preenchidos;
- Via original do comprovante de pagamento da taxa de fiscalização de vigilância sanitária – GRU;
- Justificativa técnica referente à solicitação;
- Relatório descritivo do estudo de estabilidade;
- Novos modelos de rótulos, bula e embalagens, adequados ao novo prazo de validade;

- CD-ROM com as mesmas informações gravadas em linguagem eletrônica tipo pdf (o número de série do disco deve estar explicitado na documentação);
- Cópia da Licença de Funcionamento da Empresa e/ou Alvará Sanitário Atualizado;
- Cópia de Autorização de Funcionamento da Empresa ou cópia da publicação no Diário Oficial da União (D.O.U.);
- Cópia do Certificado de Responsabilidade Técnica – CRT;
- Cópia do comprovante de registro do produto (certificado de registro em vigor ou publicação no D.O.U.) e cópia do protocolo da última revalidação de registro do produto (quando for o caso);
- Cópia do certificado de Boas Práticas de Fabricação (BPF) válido expedido pela ANVISA, ou cópia do protocolo de solicitação de renovação do pedido para este fim no caso de produtos fabricados no Brasil ou importados;
- Documento comprobatório do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação expedido pela Autoridade Sanitária do país de fabricação do produto biológico a granel ou do produto biológico em sua embalagem primária ou do produto biológico terminado;
- Documento comprobatório do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação expedido pela Autoridade Sanitária do país de fabricação do(s) princípio(s) ativo(s), no caso de países que emitam este certificado.

Após a elaboração do processo e protocolização na ANVISA, esta tem até 90 dias (03 meses) para emissão do parecer final, de acordo com a RDC 315/2005 (Brasil 2005b).

É importante ressaltar que os requerimentos para alterações pós-registro estão em revisão, pois foi divulgada pela ANVISA a Consulta pública n° 71, de 4 de novembro de 2009 (Brasil 2009a). No entanto, nesta proposta de resolução não há alteração nos requerimentos relacionados a estudos de estabilidade.

6. CONCLUSÕES

- Segundo a análise estatística realizada utilizando a regressão linear e análise de covariância (ANCOVA), a potência e a termoestabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses decaem ao longo do tempo, quando as amostras são armazenadas às temperaturas de -20°C e $2-8^{\circ}\text{C}$ por 48 meses. No entanto, os mesmos parâmetros se mantiveram acima do limite de especificação mínimo para liberação da vacina.
- A mesma análise demonstrou que a umidade residual da vacina febre amarela (atenuada) 10 doses tende a aumentar ao longo do tempo de armazenamento, mas permanece abaixo do limite de especificação máximo por até 48 meses, quando mantidas a -20°C e $2-8^{\circ}\text{C}$.
- Os demais parâmetros analisados para a vacina febre amarela (atenuada) 10 doses como identidade, esterilidade, endotoxinas bacterianas, ovoalbumina residual e nitrogênio proteico, se mantiveram constantes em relação aos valores obtidos na ocasião em que o produto foi liberado.
- A análise por regressão linear e a ANCOVA demonstraram que a vacina febre amarela (atenuada) 10 doses, após permanecer armazenada por 48 meses a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$, pode ser mantida por até 08 horas reconstituída e armazenada à temperatura de $2-8^{\circ}\text{C}$, sem alteração de sua eficácia e segurança.
- A potência da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses se mantém estável, quando as amostras são armazenadas a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$ por até 48 meses.
- Quando se comparou os resultados encontrados para os lotes de vacina febre amarela (atenuada) 05 doses com os intervalos de confiança e preditivo encontrados para a vacina febre amarela (atenuada) 10 doses, verificou-se que a potência vacinal permanece estável em ambas apresentações e nas diferentes temperaturas de armazenamento.
- Portanto, o prazo de validade das vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses pode ser estendido para 36 meses, quando armazenado a -20°C ou a $2-8^{\circ}\text{C}$, sem alteração de sua qualidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebayo AA, Sim-Brandenburg JW, Emmel H, Olaleye DO, Niedrig M. **Stability of 17D yellow fever virus vaccine using different stabilizers.** *Biologicals*. 1998, 26:309-16.
- Aitken TH, Tesh RB, Beaty BJ, Rosen L. **Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*)** [Resumo]. *Am J Trop Med Hyg*. 1979 jan, 28(1):119-21.
- Barrett ADT, Matthews JH, Miller BR, Medlen AR, Ledger TN, Roehrig JT. **Identification of monoclonal antibodies that distinguish between 17D-204 and other strains of yellow fever virus.** *J Gen Virol*. 1990, 71:13-8.
- Barrett ADT, Monath TP, Barban V, Niedrig M, Teuwen DE. **17D yellow fever vaccines: new insights. A report of a workshop held during the World Congress on medicine and health in the tropics, Marseille, France, Monday 12 September 2005.** *Vaccine*. 2007 apr, 25(15):2758-65.
- Beaty BJ, Tesh RB, Aitken TH. **Transovarial transmission of yellow fever virus in *Stegomyia* mosquitoes** [Resumo]. *Am J Trop Med Hyg*. 1980 Jan, 29(1):125-32.
- Benchimol JL. **A vacina contra a febre amarela: uma longa história inacabada.** In: Azevedo N, Gadelha CAG, Ponte CF, Trindade C, Hamilton W. *Inovação em Saúde: dilemas e desafios de uma instituição pública.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007. p. 19-50.
- Benchimol JL. **Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada.** Rio de Janeiro: Fiocruz; 2001. p. 470.
- Bica A. **Desenvolvimento da cepa 17D e requisitos para a produção da vacina contra a febre amarela.** In: Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue Cinquentenário da Introdução da Cepa 17D no Brasil, 15-19 maio 1988. Rio de Janeiro: Fiocruz / Bio-Manguinhos; 1988. p. 155-67.
- Bier O. **Microbiologia e Imunologia.** 24^a. ed. São Paulo: Melhoramentos; 1990.
- BM (Bio-Manguinhos / Fiocruz). **Febre amarela: sintomas, prevenção e transmissão** [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2011. [capturado 18 mar. 2011] Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>
- BM (Bio-Manguinhos / Fiocruz). **Relatório Técnico da Vacina febre amarela (atenuada).** Rio de Janeiro; 2008.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiol Serv Saúde. 2007, 16(2):113-8.

Brasil. Lei n.º 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 20 set. 1990; Seção 1, n.182, p.1.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n.º 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza *ad referendum*, a publicação do guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 1º ago. 2005a; Seção 1, n.146, p.119.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n.º 71, de 04 de novembro de 2009. Proposta de resolução que dispõe sobre realização de alterações, inclusões, suspensão, reativação e cancelamentos pós-registro de produtos biológicos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 10 nov. 2009a; Seção 1, n.214, p.77.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n.º 72, de 04 de novembro de 2009. Proposta de resolução que dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 10 nov. 2009b; Seção 1, n.214, p.78.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 19 abr. 2010a; Seção 1, n.73, p.94.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 49, de 23 de novembro de 2010. Aprova a Farmacopéia Brasileira, 5ª edição e dá outras providências. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 24 nov. 2010b; Seção 1, n.224, p.80. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 17 dez. 2010c; Seção 1, n.241, p.110.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 315, de 23 de outubro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de registro, alterações pós-registro e revalidação de registro de produtos biológicos terminados. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 31 out. 2005b; Suplemento ANVISA – DOU1, n.209, p.58.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue – Instruções para pessoal de combate ao vetor – Manual de normas Técnicas. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2001a.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de procedimentos para vacinação**. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001b.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela**. Brasília: Ministério da Saúde; 1999. p. 60.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Caderno 9: Febre amarela**. In: Guia de vigilância epidemiológica. 7ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009c. p. 23-42 – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. 1ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005c. p. 56. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Burfoot C, Young PA, Finter NB. **The thermal stability of a stabilized 17D yellow fever virus vaccine** [Resumo]. J Biol Stand. 1977, 5(3): 173-9.

Calheiros LB. **A febre amarela no Brasil**. In: Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue Cinquentenário da Introdução da Cepa 17D no Brasil, 15-19 maio 1988, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FIOCRUZ / Bio-Manguinhos; 1988. p. 74-85.

Callegari-Jacques SM. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed; 2003.

Caride E, Borges MB, Marcovitz R, Galler R, Freire MS. **Evidence for interferon production and its correlation with YF 17DD vaccine virus yields in primary chick embryo cells**. Virus Res. 2008 Oct, 137(1):106-11.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Chapter 3: Infectious diseases related to travel** [on line]. Atlanta, USA; 2011. [capturado 11 mai. 2011] Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/yellow-fever.htm>

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

Cornet M, Robin Y, Heme G, Adam C, Renaudet J, Valade M, *et al.* **Une poussée épizootique de Fièvre jaune selvatique au Sénégal oriental. Isolement du virus de lots de Moustiques adultes males et femelles** [Resumo]. Med Mal Infect. 1979, 9(2):63-6.

Craig CF. **Yellow Fever. An Epidemiological and Historical Study of Its Place of Origin: By HENRY ROSE CARTER, M.D. Edited by Laura Armistead Carter and Wade Hampton Frost. Pp. I–XII. 1–308. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1931. Am J Trop Med Hyg. 1932, s1-12:273-74.**

Dias CMASO. **Controle Estatístico de Processo Aplicado ao Teste de Potência da Vacina contra Febre Amarela 5 doses**. Mestrado (Dissertação em Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IOC. Bio-Manguinhos / FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2005.

EDQM. **European Pharmacopoeia**. 6ª. ed. Strasbourg: Council of Europe; 2008.

Egan W, Schofield T. **Basic principles of stability.** *Biologicals*. 2009 nov, 37(6):379-86.

Ferguson M, Heath A. **Collaborative study to assess the suitability of a candidate International Standard for yellow fever vaccine.** *Biologicals*. 2004 dec, 32(4):195-205.

Finter NB, Ferris R, Kelly A, Prydie J. **Effects of adverse storage on live virus vaccines** [Resumo]. *Dev Biol Stand*. 1978, 41:271-6.

Freire MS. **Estudo sobre a propagação de vírus da febre amarela vacinal 17D e produção de vacinas em culturas primárias de fibroblastos.** Doutorado (Tese em Biologia Parasitária). Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária. IOC / Fiocruz. Rio de Janeiro, 2004.

Gluber DJ. **Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.** *Trends Microbiol*. 2002 fev, 10(2):100-3.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products.** v. 4; 2003a.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Q1B: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.** v.4; 1996a.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms.** v. 4; 1996b.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Q1D: Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drugs Substances and Products.** v.4; 2002.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Q1E: Evaluation of Stability Data.** v. 4; 2003b.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Q1F: Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV.** v. 4; 2003c.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Q5C: Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products.** v.4; 1995.

Ishak R, Howard CR. **The thermal stability of yellow fever vaccines.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 jul/set, 85(3):339-45.

Jadhav SS, Dogar V, Gautam M, Gairola S. **Stability testing of vaccines: Developing Countries Vaccine Manufacturers' Network (DCVMN) perspective.** *Biologicals*. 2009 nov, 37(6):360-3.

Krause PR. **Goals of stability evaluation throughout the vaccine life cycle.** *Biologicals*. 2009 nov, 37(6):369-78.

Lee E, Stocks CE, Amberg SM, Rice CM, Lobigs M. **Mutagenesis of the signal sequence of yellow fever virus prM protein: enhancement of signalase cleavage In vitro is lethal for virus production.** *J Virol*. 2000 jan, 74(1):24-32.

Lee HY, Wu PC, Lee YJ. **stab: an R package for drug stability data analysis.** *Comput Methods Programs Biomed*. 2010 nov, 100(2):140-8.

Mandl CW, Allison SL, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX. **Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site.** *J Virol*. 2000 oct, 74(20):9601-9.

Marchevsky RS, Leal ML, Homma A, Coutinho ES, Camacho LA, Jabor AV, *et al*. **Molecular and phenotypic analysis of a working seed lot of yellow fever virus 17DD vaccine strain produced from the secondary seed lot 102/84 with an additional passage in chicken embryos.** *Biologicals*. 2006 sep, 34(3):191-7.

Monath TP, McCarthy K, Bedford P, Johnson CT, Nichols R, Yoksan S, *et al*. **Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections.** *Vaccine*. 2002 jan, 20(7-8):1004-18.

Monath TP. **Yellow fever vaccine.** In: Plotkin SA, Orenstein WA. *Vaccines*. 4^a. ed. EUA: Elsevier Inc; 2004. p. 1095-176.

Monath TP. **Yellow fever.** *Medicine*. 2005, 33(7):21-3.

Montgomery DC, Peck EA, Vining GG. **Introduction to linear regression analysis.** 3^a. ed. EUA: John Wiley & Sons, Inc; 2001.

Montgomery DC. **Design and analysis of experiments.** 7^a. ed. EUA: John Wiley & Sons, Inc; 2009.

MS (Ministério da Saúde). **Febre amarela: histórico** [on line]. Brasília, Brasil; 2010. [capturado 20 jan. 2010] Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/historico.php>

MS (Ministério da Saúde). **Áreas com recomendação de vacina contra a febre amarela no Brasil, 2008/2009** [online]. Brasília, Brasil; 2009. [capturado 18 mar. 2011] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_febre_amarela_09_12_09.pdf

MS (Ministério da Saúde). **Febre Amarela. Situação Epidemiológica** [online]. Brasília, Brasil; 2011. [capturado 18 mar. 2011] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1552

MS (Ministério da Saúde). Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil.** In: Buss PM, Temporão JG, Carvalheiro JR. *Vacinas, soros & imunizações no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2005. p. 39-41.

NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control). **WHO International Standard. First International Standard for Yellow Fever Vaccine. NIBSC code: 99/616. Instructions for use** [online]. Grã-Bretanha; 2010. [capturado 23 mai. 2011]. Disponível em: <http://www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/99-616.pdf>

Nicolau AR. **Produção da vacina contra a febre amarela no Brasil**. In: Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue Cinqüentenário da Introdução da Cepa 17D no Brasil, 15-19 maio 1988, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fiocruz / Bio-Manguinhos; 1988. p. 168-9.

Perraut R, Girault G, Moreau JP. **Stability-related studies on 17D yellow fever vaccine**. *Microbes Infect.* 2000 jan, 2(1):33-8.

Pikal MJ, Shah S. **Moisture transfer from stopper to product and resulting stability implications** [Resumo]. *Dev Biol Stand.* 1992, 74:165-77.

Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. **Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine**. *Bull World Health Organ.* 1981, 59(6):895-900.

Post PR, Carvalho R, Freire MS, Galler R. **The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil - a review**. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001, 96(6):849-57.

Reed W, Carrol J, Agramonte A, Lazear J. **The etiology of yellow fever – a preliminary note**. *Public Health Pap Rep.* 1900; 26:37-53.

Romanos MTV. **Febre amarela e dengue**. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à virologia humana*. 2ª ed. Guanabara Koogan S.A., 2008. p.399-408.

Schofield TL. **Maintenance of vaccine stability through annual stability and comparability studies**. *Biologicals* 2009 Aug, 37:397-402.

Smith HH, Penna HA, Paoliello A. **Yellow fever vaccination with cultured virus (17D) without immune serum**. *Am J Trop Med.* 1938, s1-18(5):437-68.

Theiler M, Smith HH. **The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization**. *J Exp Med.* 1937 may, 65(6):787-800.

Turell MJ. **Horizontal and vertical transmission of viruses by insect and tick vectors**. In: Monath TP. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Boca Raton: CRC; 1988. p. 127-52.

WHO (World Health Organization). **Chapter 2: Yellow Fever** [online]. Geneva; 2000. [capturado 18 mar. 2011] Disponível em: http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/Yellow_fever.pdf

WHO (World Health Organization). **Guidelines on stability evaluation of vaccines**. Geneva: WHO; 2006a.

WHO (World Health Organization). **Health Topics. Yellow Fever. Fact sheet N° 100 on yellow fever** [online]. Geneva; 2011. [capturado 12 mar. 2011] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/index.html>

WHO (World Health Organization). **Requirements for yellow fever vaccine (Requirements for biological substances n° 3). Proposed Amendment.** Geneva: WHO; 2008.

WHO (World Health Organization). **Technical Report Series (TRS) n° 872. Requirements for yellow fever vaccine.** Geneva: WHO; 1998.

WHO (World Health Organization). **Technical Report Series (TRS) n° 953. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products.** Geneva: WHO; 2009.

WHO (World Health Organization). **Temperature sensitivity of vaccines** [online]. Geneva; 2006b. [capturado 10 mai. 2011] Disponível em: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF06/847.pdf>

Wiesberg S. **Applied linear regression.** 3ª. ed. EUA: John Wiley & Sons, Inc; 2005.