

# Termoestabilidade das vacinas



## PROGRAMA GLOBAL PARA VACINAS E IMUNIZAÇÕES



*Organização Mundial de Saúde*  
*Genebra*  
*1988*

**O Programa Global para Vacinas e Imunização agradece aos doadores, dos quais o auxílio financeiro inespecífico tornou possível a produção deste documento.**

Este documento revisa e substitui o documento de 1989 *Estabilidade de vacinas*, OMS/EPI/GE:N/89.08

*Código de ordem:* WHO/GPV/98.07  
*Impresso:* Dezembro de 1998

**Este documento está disponível na Internet em:**

<http://www.who.ch/gpv-documents/>

Cópias podem ser requisitadas a:  
Organização Mundial de Saúde  
Programa Global para Vacinas e Imunizações  
CH-1211 Genebra 27, Suíça  
• Fax: +22 791 4193/4192 • E-mail: gpv@who.ch •

© Organização Mundial de Saúde 1998

Este documento não é uma publicação formal da Organização Mundial de Saúde (OMS, e todos os direitos são reservados pela Organização. O documento pode, entretanto, ser livremente revisado, resumido, reproduzido e traduzido, em parte ou no todo, porém não para venda ou uso em conjunto com propósitos comerciais.

A visão expressa nos documentos pelos autores são de inteira responsabilidade destes.

# Conteúdo

<i>Lista de abreviações</i>	<i>iv</i>
Introdução	1
Parte I: Notas relacionadas a preservação de vacina	3
1. Importância da rede de frio	3
2. Monitores de frascos de vacina e o futuro da rede de frio	4
3. Métodos para determina o impacto do calor ou congelamento na potência da vacina	5
Parte II: Análise da estabilidade da vacina – vacinas comumente usadas nos programas de imunizações	7
4. Toxóides diftério e tetânico	7
5. Vacina contra Hepatite B	11
6. Vacina contra o sarampo	13
7. Vacina contra a febre amarela	15
8. Vacina contra coqueluche	18
9. Vacina BCG	24
10. Vacina contra poliomielite	29
Parte III: Análise da estabilidade da vacina – outras vacinas virais	39
11. Vacina contra poliomielite inativada	39
12. Vacina contra parotidite	39
13. Vacina contra a rubéola	40
14. Vacina contra hepatite A	40
15. Vacina contra a encefalite japonesa	40
16. Vacina contra a raiva	41
Parte IV: Análise da estabilidade da vacina – outras vacinas bacterianas	42
17. Vacina polissacarídica antimeningocócica	42
18. Vacina contra Haemophilus influenza tipo b	42
19. Vacina anti tifoídica	43
20. Vacina contra a cólera	43
Parte V: Conclusões finais	44
Parte VI: Referências	46
Anexo: Tabela resumo da estabilidade das vacinas	58

## Lista de Abreviações

ADT	Teste de degradação acelerada
BC	Cloreto de benzalcônio
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin (vacina)
Co <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CP	Partícula cultivável
D <sub>2</sub> O	Água pesada
DEV	Vacina em cultivo de embrião de pato
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DT	Vacina contra tétano-difteria
DTP	Vacina contra difteria, tétano e pertussis
EPI	Programa Ampliado de Imunização (OMS)
HB	Hepatite B
HbsAg	Antígeno de superfície contra hepatite B
HDCV	Vacina celular diplóide humana
IPV	Vacina inativada contra poliomielite
IU/ml	Unidades internacionais por milímetro
JE	Encefalite japonesa
MgCl	Cloreto de magnésio
MMR	Sarampo, caxumba, rubéola (vacina)
OPV	Vacina oral contra poliomielite
PDEV	Vacina purificada de cultivo em embrião de pato
PFU	Unidade em forma de placa
PHK	Cultura de célula primária de rim de hamster sírio
PVRV	Vacina da linha celular vero
TT	Toxóide tetânico
VVM	Monitor de frasco de vacina



# Introdução

A cada ano os serviços de imunização em países em desenvolvimento previnem cerca de 490.000 crianças de tornarem-se paráliticas por poliomielite. Cerca de três milhões de mortes por sarampo, tétano neonatal e coqueluche são similarmente evitadas (51). Estas façanhas são em parte atribuídas ao treinamento de pessoal na armazenagem e transporte apropriados de vacinas e em parte a melhoria da rede de frio.

Entretanto, as vacinas ainda não são armazenadas e transportadas apropriadamente em muitas áreas. Questionamentos freqüentemente surgem como o que deve ser feito com estoques de vacinas que foram expostos a períodos variados de temperaturas elevadas. Não existe um método simples e barato que possa ser usado no campo para se avaliar se uma vacina exposta a temperatura ambiente retém a potência mínima requerida, embora os monitores de frascos de vacina (VVMs) atualmente contidos na vacina oral contra poliomielite (OPV) possam indicar o nível de exposição ao calor dos frascos individualmente. A potência da vacina pode ser determinada apenas por ensaios de laboratórios de altos custos, cujos resultados com freqüência necessitam de vários meses. Apenas um grande número de doses pode justificar o envio de uma vacina para reteste (de 2000 doses vacinas para poliomielite e sarampo, a 200.000 dose para vacina contra difteria-tétano-coqueluche (DTP)) (45).

O conhecimento sobre a estabilidade da vacina, especialmente da taxa de declínio da potência em uma certa temperatura, pode ser útil na determinação dos Requisitos exigidos pela OMS para armazenagem. O presente documento atualiza informações contidas em relatórios anteriores (54), com particular atenção para a estabilidade de vacinas armazenadas e transportadas em temperaturas ambientes ou expostas a temperaturas de congelamento.

Na parte dois do documento, a estabilidade das vacinas é analisada de forma individual, como na primeira seção, com as vacinas mais comumente usadas nos programas nacionais de imunização, indo desde aquelas que são altamente estáveis, tais como os toxóides, até as menos estáveis, tal como a vacina contra poliomielite oral. As seções seguintes tratam de outras vacinas virais e bacterianas, as quais não são ainda largamente usadas, ou as quais são destinadas a doenças não incluídas como de importância para a saúde pública mundial.

# Parte I:

## Notificações relacionadas a preservação da vacina

### 1. Importância da rede de frio

A certificação da potência ótima de vacinas, armazenagem e manuseio necessitam de acurada atenção. A energia elétrica e refrigeração são necessidades frequentes em países em desenvolvimento, nos quais a armazenagem, manuseio e a temperatura de estabilidade de vacinas são assuntos de grande interesse (28). Novos produtos têm sido desenvolvidos para assegurar o transporte e armazenagem, enquanto que a confiança no suprimento da vacina tem sido incrementada pela introdução de técnicas de gerenciamento aperfeiçoadas. O treinamento extensivo certifica que cada pessoa envolvida na rede de frio se torne familiar com todos os seus aspectos. Entretanto, avaliações realizadas na Índia (47, 139), Malásia (62), Nepal (46), República Unida da Tanzânia (131), e Tunísia (43) mostraram que ainda existiam pontos fracos na performance da rede de frio e que uma maior atenção deveria ser dada, especialmente nas facilidades periféricas.

Tem sido dada pouca consideração a importância da manutenção da rede de frio em países de clima temperado. Embora a refrigeração adequada seja sempre oferecida como garantia, erros no manuseio da vacina podem ocorrer mais comumente que os registrados (21). Tem sido relatado a ocorrência de quedas substanciais na potência da vacina causadas pelas condições insatisfatórias de distribuição e armazenagem (84, 89).

As deficiências mais comuns na performance da rede de frio relatadas por países desenvolvidos são: altas temperaturas durante a armazenagem ou transporte (21, 27, 90, 107, 138); exposição de vacina adsorvida a temperaturas de congelamento (64, 76, 107); refrigeradores sem termômetro; falhas na tomada de leitura e registro com respeito a regularidade (17, 21, 39, 63, 68, 90, 138, 142); armazenamento de drogas, bebidas, alimentos e peças patológicas junto as vacinas (21, 90); e falha no descarte de vacina fora de uso após sessões em temperatura ambiente (39).

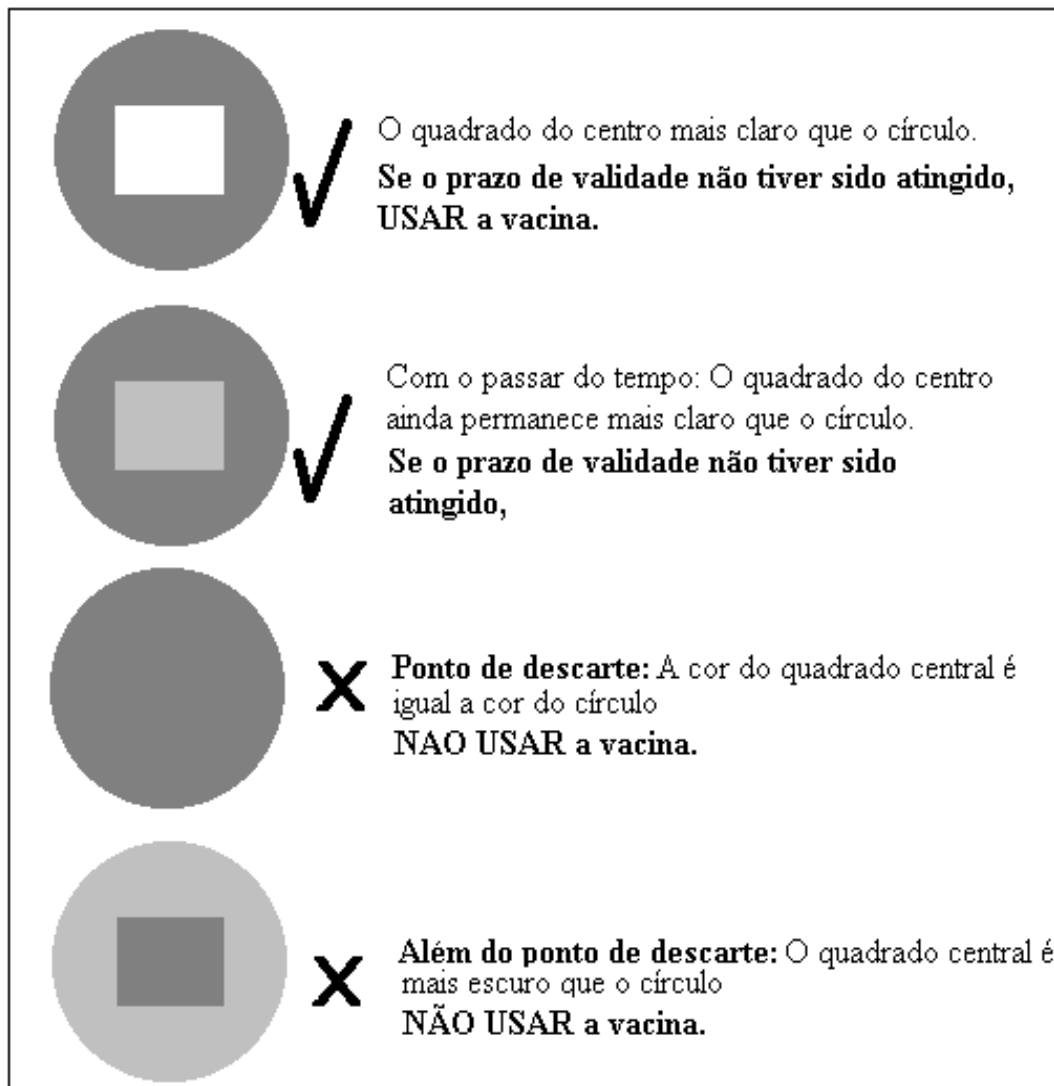
Uma alta prevalência de erros evitáveis foi constatada na área metropolitana de Los Angeles nos Estados Unidos da América, onde pouca atenção era dada as práticas de auto-monitoramento da armazenagem de vacina (21). Estudos na Hungria (93), Polônia (94), e Reino Unido da Grã Bretanha e Irlanda do Norte (23), mostraram consideráveis debilidades na rede de frio durante o transporte de vacina, do fabricante ou dos pontos centrais de distribuição, para as clínicas de saúde. Na Hungria, os monitores de rede de frio mostraram que no mínimo 6% de vacinas DTP e 30% de BCG eram expostas ao calor excessivo quando transportadas pelo serviço postal durante o verão. No inverno, 38% de vacina DTP conseqüentemente eram expostas a temperaturas de congelamento (93). Na Polônia, a armazenagem de vacina foi em geral satisfatória na rede central e regionais sanitárias de epidemiologia, porém foi menos satisfatória em clínicas externas e centros de saúde. As condições para o transporte de vacinas foram completamente insatisfatórias em todos os níveis (94).

## 2. Monitores de frascos de vacina e o futuro da rede de frio

Os monitores de frascos de vacina, os quais medem a exposição ao calor, são graduações de tempo e temperatura incorporadas aos frascos de vacina no momento da fabricação. Através de uma mudança gradual de cor eles alertam os trabalhadores da saúde e responsáveis pela armazenagem quando uma vacina foi excessivamente exposta ao calor e não deve ser utilizada. Eles são concebidos de acordo com a curva de estabilidade das vacinas ao calor, permitindo uma margem de segurança (160). Eles atendem tanto aos Requisitos da OMS para a estabilidade ao calor, quanto aos dados de estabilidade ao calor fornecidos pelos fabricantes mais exigentes de vacina.

A informação fornecida por um VVM é simples. Se a figura equilátera contida no centro apresentar coloração mais clara que a área circunscrita no círculo de referência então a vacina pode ser usada. Se essa figura estiver da mesma cor que a área do círculo ou mais escura que ela, então a vacina não deve ser usada (Figura 1).

**Figura 1: Monitor de frasco de vacina mostrando quatro estágios de exposição**



Os VVMs foram primeiramente introduzidos nos frascos de OPV fornecidos pela UNICEF e OMS durante o primeiro trimestre de 1996. Eles são parte das especificações propostas



pela UNICEF e OMS. Os países que buscam as vacinas diretamente dos fabricantes estão também iniciando a solicitar os VVMs na OPV.

Quando o gerenciamento e a infra-estrutura do Programa Ampliado em Imunização (EPI) foram sendo estabelecidos foi possível checar se as vacinas retinham potência adequada durante a distribuição. Conseqüentemente, com o passar de 20 anos, os sistemas de rede de frio para vacina têm sido construídos e mantidos com base em uma lista simples de regras sobre a administração do manuseio de vacinas em todo o mundo, sem consideração específica de meios ambientes locais e tipos de vacina. O caminho teve o mérito de simplicidade, tornando a rede de frio fácil de entender, implementar e administrar, e apresentada como objetivo a ser alcançado de forma concreta e sem controvérsias.

Entretanto, este caminho tem levado a emergência gradual de uma visão dogmática a respeito da rede de frio, prevenindo os trabalhadores da saúde de obterem total vantagem da atual estabilidade ao calor das diferentes vacinas.

Os programas de imunizações atualmente apresentam-se desenvolvidos e diversificados: a estratégia operacional busca por áreas que são de difícil acesso, grandes populações alvo são cobertas em campanhas especiais, e um maior esforço tem sido feito para alcançar cada criança não protegida. As vacinas têm se tornado mais estáveis e existe uma expectativa clara de incremento ou talvez completa estabilidade ao calor. Nestas circunstâncias a visão dogmática sobre a rede de frio dá margem ao desperdício de recursos e cria restrições desnecessárias nas operações de campo.

O VVM pode ser visto como um catalisador para muitas mudanças necessárias nas estratégias de distribuição de vacina pela rede de frio. Deve eventualmente auxiliar os programas de imunizações a explorar a estabilidade de cada vacina a uma extensão maior possível, minimizar os custos de distribuição, e incrementar a flexibilidade no manuseio de vacinas no campo, desta forma auxiliando a se realizar operações mais efetivas.

### **3. Métodos para determinar o impacto do calor ou congelamento na potência das vacinas**

Alguns autores têm buscado pela determinação do período de validade de uma vacina pela estimativa da perda de potência durante longos períodos de armazenagem sob diferentes temperaturas. O teste de degradação acelerada (ADT) é o mais conveniente. Neste teste amostras são submetidas a uma faixa de temperaturas elevadas, na qual a degradação significativa e detectável com exatidão é induzida em um período relativamente curto. A proporção da ocorrência é medida e extrapolada para temperaturas mais baixas, nas quais as vacinas são armazenadas, de acordo com a equação de Arrhenius (144). A precisão com a qual a ADT prediz a proporção de degradação difere consideravelmente, dependendo da faixa de temperatura utilizada, o número de amostras testadas e o projeto do teste. O uso dos resultados da ADT pode ser mais complicado pelos diferentes métodos e técnicas usadas para a estimativa da potência das vacinas.

A determinação de titulação de vacinas de vírus vivo atenuado contra poliomielite, sarampo ou rubéola é um procedimento simples. Em contraste, os ensaios biológicos de vacinas bacterianas e toxóides constituem testes difíceis que requerem um grande número de animais. A potência é expressa em unidades estabelecidas arbitrariamente ou em doses efetivas para promover 50% de proteção. Os resultados destes testes são sempre sujeitos a grande número de variações biológicas e é difícil se obter dados precisos quanto a deterioração da vacina, a menos que ocorra de forma substancial (120).

As vacinas e toxóides são fabricadas a partir de proteínas, ácidos nucleios, lipídeos e carboidratos, os quais são submetidos a mudanças através de exposição ao calor. A proporção de degradação de uma vacina é determinada pela temperatura de armazenagem: quanto mais alta a temperatura, mais rápida e extensiva é a degradação. Existem consideráveis diferenças entre as proporções de degradação. Entretanto, a proporção de degradação (b) não é o único fator determinante da potência residual ( $Y_t$ ) da vacina: o tempo (T) de armazenagem de uma vacina em uma dada temperatura e a potência inicial da vacina ( $Y_0$ ) também exerce influência.

A relação entre os três fatores é expressa como segue:

$$Y_t = Y_0 - bT$$

A utilidade desta fórmula é limitada porque muitos dos envolvidos nos programas de imunizações não conhecem a potência inicial de uma vacina. Entretanto, o conhecimento das características da proporção de degradação para várias temperaturas e do tempo de exposição de uma determinada vacina a uma certa temperatura pode auxiliar os trabalhadores da saúde a decidir o que fazer com ela.

Este documento substitui informações em vigor sobre a estabilidade de vacinas, de forma que elas possam ser usadas em seus potenciais totais.

## Parte II:

# Análise da estabilidade da vacina – vacinas comumente usadas nos programas de imunizações

### 4. Toxóides tetânico e diftérico

#### 4.1. *Exposição a altas temperaturas*

Os toxóides adsorvidos de difteria e tétano em forma monovalente ou como componentes de vacinas combinadas são as mais estáveis que as vacinas comumente usadas nos programas nacionais de imunizações. Sendo proteínas, eles são geralmente submetidos a regras administrativas de termoestabilidade nesta classe de substância. Eles são estáveis a temperaturas elevadas, mesmo por longos períodos de armazenagem, podem porém mudar suas aparências e perder potência quando congelados. Isto não se deve as características próprias dos toxóides, mas sim devido ao adjuvante à base de alumínio com estrutura própria de gel que é destruída pelo congelamento.

A potência dos componentes tetânicos de vacinas adsorvidas DTP ou DTP-poliomielite não mostra significativa mudança a temperaturas na faixa de 4°C a 8°C por três a sete anos (80, 83, 130, 146). A vida completa, em temperatura usualmente recomendada pelos fabricantes (2°C a 8°C), depende da natureza da vacina: o período de validade é normalmente maior para toxóides monovalentes ou vacina combinada difteria-tétano (normalmente três anos) que para as vacinas DTP ou DTP-poliomielite (18 a 24 meses). Nas vacinas combinadas os fatores limitantes são os componentes pertussis ou poliomyelite inativado.

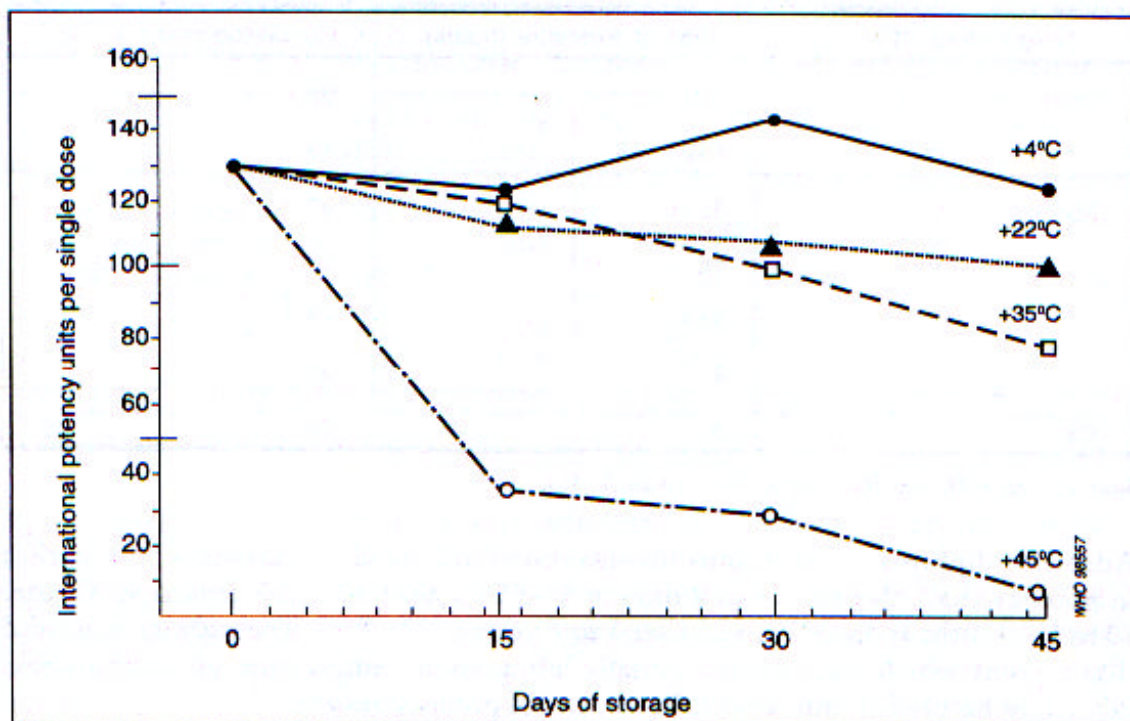
Os componentes toxóides das vacinas DTP ou DTP-pólio mostram um insignificante decréscimo da potência quando armazenados por 1.5 anos a 18°C (130). Por 6 a 12 meses a 24°C (136), e por 2 a 6 meses a 37°C (83, 136, 146). Outros estudos, entretanto, têm mostrado uma maior labilidade ao calor. A armazenagem a 37°C por até 22 semanas causou uma redução de 50% na potência dos componentes da difteria e tétano das vacinas DTP-pólio de um produtor (146). Em algumas outras vacinas DTP o componente toxóide tetânico mostrou uma deterioração mais acentuada quando armazenadas por 45 dias a 22°C e 35°C; as perdas diárias foram em torno de 0.5% e 1% respectivamente (Figura 2) (85).

Os componentes diftérico e tetânico de algumas vacinas DTP podem resistir a exposições de temperaturas acima de 37°C durante várias semanas. Nenhuma perda significativa da potência foi observada no componente toxóide quando a vacina DTP de um produtor foi armazenadas a 45°C por duas a quatro semanas. Entretanto, a armazenagem nesta temperatura por oito semanas produziu uma perda de potência em torno de 40% (83). Em algumas vacinas DTP o processo de deterioração foi mais rápido: a 45°C a perda de potência do componente tetânico foi 5% por dia nas primeiras duas semanas de armazenagem e 1% por dia durante o próximo mês (85).

Em temperaturas acima de 45°C a degradação da potência do toxóide é acelerada, e o comportamento Arrhenius não mais ocorre, vez que as proteínas estão desnaturadas. Após exposições a 53°C durante quatro e oito dias respectivamente, o toxóide tetânico

monovalente adsorvido submetido ao ADT perdeu 17% e 47% de sua potência inicial (Tabela 1) (30). Os toxóides tetânico e diftérico expostos a 60°C são destruídos em três a cinco horas (30, 135).

**Figura 2: Potência do componente tetânico da vacina DTP armazenadas por 45 dias sob várias temperaturas**



Fonte: Kumar V et al. (85)

Os toxóides adsorvidos de difteria e tétano testados na Polônia (2) mostraram um declínio de 50% na potência (meia vida) após 4 a 8 dias a 53-55°C, após 80 a 90 dias a 45°C, após 10 a 13 meses a 35-37°C, e após 5 a 7 anos a 20-25°C. Os autores concluíram que os toxóides, os quais foram sem intenção deixados em temperatura ambiente por cerca de duas semanas podiam ser usados com segurança em humanos sem o teste de controle de potência.

**Tabela 1: Potência do toxóide tetânico adsorvido após vários períodos de armazenagem a diferentes temperaturas**

Temperatura (°C)	Tempo de exposição (horas)	Potência residual (%)
53	96	83
	192	53
55	32	97
	72	52
	144	44
	288	35
65	3	20

Fonte: Cohen H. van Ramshorst JD, Tasman A (30).

#### 4.2. Exposição a temperaturas de congelamento

O congelamento pode reduzir a potência do toxóide tetânico a uma extensão que evidentemente varia superficialmente com a composição da vacina. O componente toxóide

tetânico em duas de cinco vacinas DTP armazenadas por 12 horas a  $-30^{\circ}\text{C}$  mostraram um decréscimo na potência em torno de 30%, enquanto que não existiu tal decréscimo nas vacinas mantidas entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-10^{\circ}\text{C}$ . Entretanto, a potência do componente toxóide tetânico em vacina DT adsorvida foi reduzido após o congelamento a  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-30^{\circ}\text{C}$  (42). Esta diferença é sem dúvida devido ao efeito adjuvante do componente pertussis nas vacinas DTP quando a potência é testada por ensaio animal. A relevância desta observação para a eficácia de proteção não é conhecida.

Toxóide tetânico monovalente congelado, especialmente submetido a congelamento por quatro vezes, estimulou uma baixa média de resposta e uma baixa proporção de altos títulos que o produto não congelado, em recrutas militares jovens, embora a significância das diferenças não tenha sido clara. Todas as pessoas imunizadas com toxóides congelados, entretanto, adquiriram níveis de proteção de antitoxina tetânica. O congelamento não parece afetar a imunogenicidade do toxóide não adsorvido (o qual permanece menos imunogênico que o produto adsorvido) ( Tabela 2) (106).

**Tabela 2: Resposta imunológica dos recrutas militares imunizadas com toxóide tetânico adsorvido congelado e não congelado.**

Toxóide	Tratamento	10 dias após a primeira dose		10 dias após a segunda dose		10 dias após a terceira dose	
		%>0.01 IU/ml	Média em IU/ml	%>0.01 IU/ml	Média em IU/ml	%>0.01 IU/ml	Média em IU/ml
Adsorvido em hidróxido de alumínio	Não congelado	50	0.07	89	4.0	90	13.5
	Congelado 1X	47	0.07	84	3.0	73	9.7
	Congelado 4X	46	0.07	77	2.4	69	9.2
Não adsorvido	Não congelado	50	0.04	27	0.6	21	3.2
	Congelado 1X	50	0.05	36	0.7	34	3.3
	Congelado 4X	54	0.06	30	0.7	21	3.2

Fonte: Menon PS et al. (106)

#### **4.3. Mudanças físicas no adjuvante alumínio em temperaturas altas e baixas**

As observações discutidas anteriormente referem-se a potência dos toxóides como determinado em testes animais. Entretanto, a longa exposição a alta temperatura pode

resultar em algumas mudanças nas características físicas do componente alumínio, o que não é revelado pelo teste de potência em animal. O adjuvante hidróxido de alumínio mostrou evidência de “amadurecimento”, na forma das mudanças morfológicas e estruturais, quando estocado como um composto simples ou como adjuvante da difteria, vacinas DT e DTP (3, 163, 164). Um declínio contínuo em sua habilidade em adsorver tinta vermelha do Congo foi observada durante a armazenagem a temperaturas de 4 a 10°C por 5.5 anos. Estudos com microscópio eletrônico e roentgenografia mostraram que as mudanças morfológicas e estruturais progrediram mais rapidamente a 10°C que a 4°C (163, 164).

O ponto de congelamento para as vacinas DTP adsorvidas é entre -5°C e -10°C (42). O tempo requerido para o congelamento das vacinas DTP, DT ou toxóide tetânico depende do número de doses no frasco (quanto maior o volume, maior o tempo) e da temperatura: 110 a 130 minutos a -10°C, 25 a 45 minutos a -20°C, e 9 a 11 minutos a -70°C. Em virtude do superresfriamento, a temperatura exterior aos frascos de vacina DTP, DT ou TT cai logo abaixo de zero (-1.6°C a -2.6°C quando a temperatura de fora é -4.2°C a -4.6°C) antes de encontrar um limiar instável. No momento de solidificação, a temperatura na vacina congelada cresce ao ponto de congelamento científico, ou seja, em torno de -0.5°C (50, 103).

As vacinas adsorvidas, independentes de serem monovalentes ou combinadas, alteram suas aparências físicas após congelamento pelas mudanças induzidas na estrutura e morfologia do adsorvente. As mudanças no pH e armazenagem a altas temperaturas não têm influência na estrutura do alumínio gel, porém o congelamento causa mudanças morfológicas extensas que são visíveis ao microscópio eletrônico (3). O desenvolvimento de aglomerados, flóculos ou outras matérias granulares produz um incremento na taxa de sedimentação (3, 6, 42, 106, 130), e os grânulos não formam uma suspensão uniforme ainda mesmo que submetida a vigorosa agitação. O tamanho dos grânulos parece aumentar com a repetição de congelamento e descongelamento (106).

As mudanças físicas induzidas pelo congelamento promovem a base para o teste de agitação, o qual pode ser de utilidade na detecção de congelamento prévio de vacinas adsorvidas (42). Este teste é de fácil realização: o container da vacina é vigorosamente agitado, seu conteúdo é examinado em busca de mudanças físicas, e a extensão da sedimentação é checada após 30 minutos. A presença de formas granulares ou flóculos quando a agitação é efetivada, ou a formação de uma sedimentação no topo do container no espaço de 30 minutos, com líquido límpido acima, sugere que a vacina foi congelada. Entretanto, a realização do teste necessita de certa experiência. Além do mais, nem todas as vacinas mostram mudanças físicas após congelamento.

Em caso de suspeitar-se de que as vacinas DTP, DT, TT ou hepatite B tenham sido congeladas, elas devem ser examinadas quanto a mudanças físicas. Detectando-se estas mudanças, as vacinas devem ser descartadas. A quantidade de antígeno em uma vacina não homogênea pode variar muito, e a administração de tais vacinas pode estar associada com a redução da resposta imunológica ou um aumento na incidência de reações locais.

#### **4.4. Sumário**

Os toxóides diftérico e tetânico são algumas das vacinas mais estáveis em uso comum. Eles são estáveis a temperaturas de 2 a 8°C por anos, em temperatura ambiente por meses e a 37°C por semanas. A uma temperatura de 45°C a degradação do toxóide é acelerada e sua potência podem declinar durante poucas semanas. A 53°C os toxóides perdem potência após poucos dias, e a 60°C eles perdem a potência após poucas horas apenas. O

congelamento pode reduzir a potência dos toxóides adsorvidos. O ponto de congelamento para os toxóides adsorvidos é entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $10^{\circ}\text{C}$ . Os toxóides adsorvidos nunca devem ser congelados.

## **5. Vacina contra Hepatite B**

### ***5.1. Exposição a baixa e alta temperaturas***

A vacina contra a hepatite B (HB) é uma suspensão líquida constituída de antígeno purificado de hepatite B (HbsAg) adsorvido em sal de alumínio. Já estão disponíveis uma vacina derivada de plasma e uma vacina de DNA recombinante. Como as outras vacinas adsorvidas em sais de alumínio, o congelamento da vacina HB pode causar significantes reduções de sua potência. O risco de perda de potência devido ao congelamento pode aumentar no final da rede de frio quando a vacina é transportada em caixas frias e pode entrar em contato direto com o material congelado (gelo, gelo reciclável, etc.). A vacina HB deve ser protegida do congelamento; as vacinas que apresentarem sinais de terem sido congeladas não devem ser usadas. O ponto de congelamento da vacina HB está em torno de  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Sob temperaturas de 2 a  $8^{\circ}\text{C}$ , a vacina HB parece ser estável por muitos anos. Os limites superiores de vida em armazenagem ainda não foram definidos.

Uma vacina HB recombinante derivada de levedura de DNA (Engerix-B) é aparentemente estável a temperaturas elevadas. Os fabricantes a consideram estável por 30 dias em uma faixa de temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , por uma semana a  $37^{\circ}\text{C}$ , e por três dias a  $45^{\circ}\text{C}$ , sendo sua meia vida calculada em nove meses, 31 dias e 13 dias.

Não existiram diferenças nas respostas imunológicas entre pessoas saudáveis imunizadas com uma vacina recombinante submetida a  $37^{\circ}\text{C}$  de temperatura e uma pessoa não saudável que recebe uma vacina controle armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ ; a distribuição do anticorpo e a média geométrica de títulos de anticorpos foram similares nos dois grupos. A incidência total, severidade e tipos de sintomas foram similares em pessoas imunizadas com as duas vacinas, e nenhuma reação severa foi relatada (78).

Em outro estudo, a vacina recombinante foi estudada em voluntários saudáveis. Usando-se vacina armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  com o propósito de compará-la, constatou-se que vacina mantida em ambiente de  $45^{\circ}\text{C}$  de temperatura por uma semana ou por um mês a  $37^{\circ}\text{C}$  não alterou a reatogenicidade ou a habilidade da vacina induzir ao surgimento de títulos de anticorpos necessários a proteção do indivíduo (145).

Cinco fabricantes forneceram dados a respeito da estabilidade ao calor de suas vacinas HB armazenadas a diferentes temperaturas. As vacinas testadas representaram perdas rotineiras de produção: quatro produtos derivados do plasma e uma de vacina recombinante (Tabela 3).

Os resultados mostram que as vacinas HB armazenadas de  $2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$  são seguramente estáveis por quatro anos. Os dados revelaram consideráveis diferenças entre as vacinas armazenadas em temperaturas elevadas. Em temperaturas ambientes de  $20^{\circ}\text{C}$  a  $26^{\circ}\text{C}$ , as vacinas de três fabricantes foram estáveis por pelo menos um ano, enquanto que a vacina de outro perdeu 50% de sua potência inicial em quatro meses. Em temperaturas de  $36^{\circ}\text{C}$  a  $40^{\circ}\text{C}$  a vacina do quinto fabricante teve um nível mais baixo de estabilidade que os outros. A aparência física, o pH, o merthiolate contido, o alumínio e proteína, esterilidade e

toxicidade anormal permaneceram inalteráveis em vacinas de um dos fabricantes durante a armazenagem por 24 meses numa faixa de temperatura de 2°C a 36°C.

**Tabela 3. Estabilidade de cinco vacinas contra hepatite B, segundo testes de imunogenicidade em animais.**

Vacina testada	Parâmetros usados nas vacinas testadas	Temperatura de Armazenagem (°C)			
		2-8	20-26	36-40	45
A (plasma)	A mais longa armazenagem sem perda significativa de potência	24 meses	12 meses	3 meses	-
C (plasma)	Potência residual (%) após tempo especificado	100% após 24 horas	70% após 24 horas	70% após 24 horas	-
D (plasma)	A mais longa armazenagem com potência relativa superior ao intervalo de confiança > 1	44 meses	-	-	-
E (recombinante)	A mais longa armazenagem com potência relativa superior ao intervalo de confiança > 1	53 meses	12 meses	7 meses	1 mês
	Meia vida*	-	9 meses	1 mês	3 dias
F (plasma)	Meia vida	> 3 anos	4 meses	7 dias	-

\* Meia vida: tempo no qual ocorre 50% de perda da potência original

*Fonte: Dados de Fabricantes.*

### **5.2. Vacina HB usada fora da rede de frio**

Um estudo foi realizado na China para avaliar se a vacina HB armazenada fora da rede de frio por até três meses poderia permanecer efetiva e ainda ser destinada a crianças ao nascer (7). A vacina, armazenada a temperatura ambiente, foi dada a 358 crianças recém-nascidas, de partos assistidos por parteiras. Como controle, a mesma vacina, armazenadas em um refrigerador foi administrada a 232 crianças com 24 a 72 horas de nascimento, de partos feitos por médicos. As segundas e terceiras doses foram dadas com outras vacinas conduzidas por unidade móvel, as quais foram avaliadas em intervalos de cerca de dois meses. As taxas de soroconversão ao anti-HBsAg para vacina armazenadas sem e com refrigeração foram 81.6% e 81.9%, respectivamente.

Embora a vacina HB seja extremamente estável ao calor, não existem ainda dados suficientes para recomendar o seu uso inteiramente fora da rede de frio. O relatório promissor da China não inclui dados sobre a faixa de temperatura ambiente à qual a vacina HB foi armazenadas e usada pelas parteiras. Existe, entretanto, um esboço para o desenvolvimento de instrução de gerenciamento que poderá permitir a remoção da vacina da rede de frio em situações emergenciais, ou em atividades de serviços de extensão de curta duração, tendo-se a precaução de adicionar um medidor de alta temperatura a cada frasco.

### **5.3. Sumário**

Estes dados sugerem que a vacina HB está em uma faixa superior de estabilidade ao calor, juntamente com os toxóides tetânico e diftérico, entre as vacinas comumente usadas nos programas de imunizações. A vacina é estável por cerca de quatro anos a temperaturas de 2 a 8°C, por meses até 20°C a 25°C, por semanas a 37°C e por dias até 45°C. Como as outras vacinas adsorvidas nos sais de alumínio, a vacina HB congelada pode causar uma significativa redução da potência. O ponto de congelamento da vacina HB se dá em torno



de -0.5°C. A vacina deveria sempre ser protegida do congelamento, especialmente no final da rede de frio quando é transportada em caixas frias e podem sofrer contato direto com material conservante congelado (gelo).

## **6. Vacina contra o Sarampo**

### ***6.1. Estabilidade da vacina liofilizada***

Nos anos recentes significativo progresso foi feito no sentido de aperfeiçoar a estabilidade ao calor da vacina contra o sarampo. O desenvolvimento de um estabilizador efetivo (59, 102, 119) e a formulação de Requisitos da OMS para a estabilidade ao calor de vacinas liofilizadas (152, 153) têm causado um impacto considerável na qualidade das vacinas contra o sarampo disponíveis no mercado.

Estes requisitos usam dois índices de estabilidade:

- (1) A vacina liofilizada deve reter ao menos 1000 partículas de vírus vivo em cada dose humana no final da incubação a 37°C por sete dias; e
- (2) Se, durante a incubação, o título de vírus decrescer, então isto pode ocorrer porém não mais que  $1 \log_{10}$  (152);

A aumentada estabilidade ao calor sob condições normais de trabalho é especialmente importante no mundo em desenvolvimento (65).

A vacina contra o sarampo em sua forma liofilizada é extremamente estável em temperaturas abaixo de zero (102). A vacina desidratada permanece potente se mantida no frio e não é danificada pelo congelamento e recongelamento.

A degradação térmica das vacinas contra o sarampo de segunda geração é baixo (Figura 3) (4, 100). De 2°C a 8°C estas vacinas aperfeiçoadas mantêm suas potências mínimas por mais que dois anos (19, 102, 119).

A estabilidade das vacinas contra o sarampo atuais é acentuada em altas temperaturas. À temperatura ambiente (20°C a 25°C) as vacinas modernas contra o sarampo mostram baixa taxa de degradação, em torno de 0.17 a 0.33 CCID<sub>50</sub> de perda, respectivamente após duas e quatro semanas de armazenagem (119). A titulação mínima requerida ainda está presente após dois a quatro meses de armazenagem a temperaturas ambientes (73, 102). A vacina contra o sarampo mantida a 25°C por sete dias induziu soroconversão em 122 (92%) de 132 crianças vacinadas (66).

A vacina contra o sarampo tem demonstrado que mantém a titulação requerida para infectividade após 14 dias de armazenagem a 37°C (102, 119). A segunda geração de vacinas perdeu 0.39 e 0.47  $\log_{10}$  CCID<sub>50</sub>, respectivamente, após 7 e 14 dias de armazenagem a 37°C, ainda mostrando concentração viral residual acima de 1000 CCID<sub>50</sub> por dose (73). Durante todos os trinta dias de exposição a 37°C, a taxa de degradação foi 0.025  $\log_{10}$  CCID<sub>50</sub> por dia. A meia vida foi em torno de sete dias.

A realçada termoestabilidade das vacinas contra o sarampo de segunda geração tem sido confirmada em campo. Estudos realizados por Cameroon mostraram que duas vacinas contra o sarampo de segunda geração armazenadas a 37°C por até 14 dias, foram capazes de induzir soroconversão em crianças soronegativas (65).

A 41°C, a degradação da vacina contra o sarampo procede rapidamente com a titulação decrescendo em torno de 50% em dois dias e por uma perda de 0.4 a 0.7  $\log_{10}$  dentro de

uma semana (48, 119). A meia vida das vacinas contra o sarampo foi estimada em 31 dias, 16.6 dias e 3.3 dias em 20°C a 25°C, 37°C e 41°C, respectivamente (5).

Na faixa de 54 a 56°C a vacina contra o sarampo é inativada rapidamente, perdendo mais que 0.65 log<sub>10</sub> e 1.3 log<sub>10</sub>, respectivamente, durante exposições de um dia e três dias. O tempo necessário para a redução na titulação a 1000 CCID<sub>50</sub> foi de cerca de 12 horas (102).

### 6.2. Estabilidade da vacina reconstituída

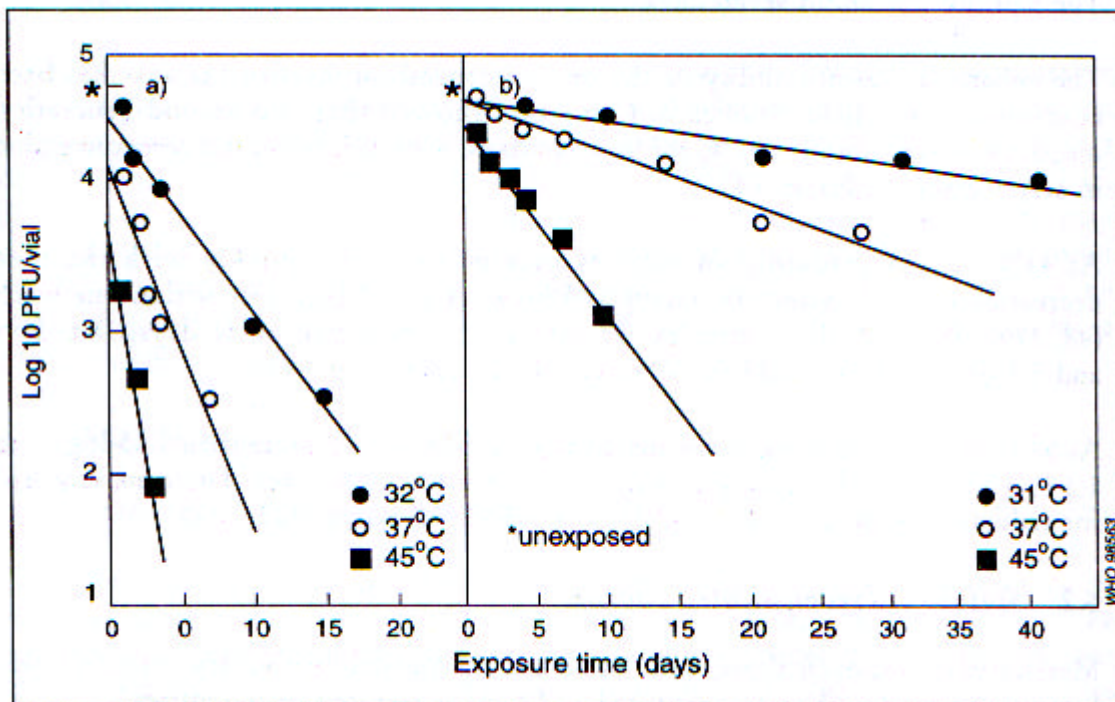
As vacinas contra o sarampo, como aquelas com termoestabilidade acentuada na forma seca, rapidamente perdem suas potências quando reconstituídas e mantidas em temperaturas elevadas.

A potência das vacinas contra o sarampo reconstituídas a 4°C permanece em torno de 1000 CCID<sub>50</sub> por pelo menos 24 horas, embora as vacinas sofram degradação a uma taxa de 0.014 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> por hora (48). Quando a vacina reconstituída é mantida a 26°C, a titulação perdida por hora pode alcançar 0.02 a 0.27 log<sub>10</sub>. O tempo necessário para a redução na titulação a 1000 CCID<sub>50</sub> é na faixa entre 16 e 24 horas (48, 102, 73).

A 37°C, a degradação da vacina é mais rápida: A titulação perdida por hora alcança cerca de 0.1 log<sub>10</sub> ou mais, de forma que o tempo requerido para a redução na titulação a 1000 CCID<sub>50</sub> pode ser menor que sete horas (48, 102, 119).

A reconstituição da vacina com diluente aquecido pode ser prejudicial; a vacina reconstituída com o diluente pré-aquecido a 41°C e então logo após imersa em vasilha com água àquela temperatura perdeu metade de sua potência após meia hora e 0.5 a 0.7 log<sub>10</sub> após uma hora (119). A 37°C a perda de titulação foi 0,4 a 0.5 e 0.8 a 1.0 log<sub>10</sub>.

**Figura 3: Teste de estabilidade acelerada em três temperaturas para (a) uma vacina de primeira geração e (b) uma vacina de segunda geração**



\* Valor para vacinas não expostas

Fonte: Allison LMC et al., e Mann GF et al. (4,100)

**A vacina contra o sarampo após reconstituição deve ser usada na mesma sessão de imunização.** A vacina contra o sarampo é produzida na forma liofilizada (desidratada) e deve ser reconstituída, para uso, com diluente fornecido pelo fabricante. Isto dá margens a erros por parte do pessoal que manuseia a vacina (156) Existe um sério risco quando a vacina contra o sarampo é reconstituída e armazenada a qualquer temperatura por período superior a seis horas ou acima de 8°C por qualquer período. Isto é devido a possibilidade de contaminação do produto, o que pode causar sérias conseqüências adversas nos vacinados. Quando usada, a vacina contra o sarampo deve ser protegida de temperatura elevada e da luz (a luz pode inativar o vírus). As vacinas reconstituídas devem ser descartadas no final de cada sessão de imunização e **NUNCA** devem ser mantidas para uso em sessões subsequentes (156).

### **6.3. Sumário**

A vacina contra o sarampo na forma liofilizada é seguramente estável. É estável em temperatura abaixo de zero e não é danificada pelo congelamento ou recongelamento. Na faixa de 2°C a 8°C a vacina liofilizada contra sarampo mantém a potência mínima por mais de dois anos. Em temperatura ambiente (20°C a 25°C) o título de infectividade mínima do vírus do sarampo é ainda retido por no mínimo um mês e pode ser mantido por no mínimo uma semana a 37°C. À 41°C a vacina do sarampo degrada-se rapidamente com a titulação decrescendo em 50% dentro de dois dias.

Após reconstituição, a vacina contra o sarampo rapidamente perde sua potência quando mantida em temperaturas elevadas. A uma temperatura de 26°C a vacina reduz a titulação ao nível mínimo em torno de 16 horas e a 37°C isto se dá em torno de sete horas. **A vacina contra o sarampo deve ser mantida em resfriamento durante os procedimentos de imunização, deve ser descartada ao final de cada sessão de imunização e nunca deve ser mantida para uso em sessões subsequentes.**

## **7. Vacina contra a febre amarela**

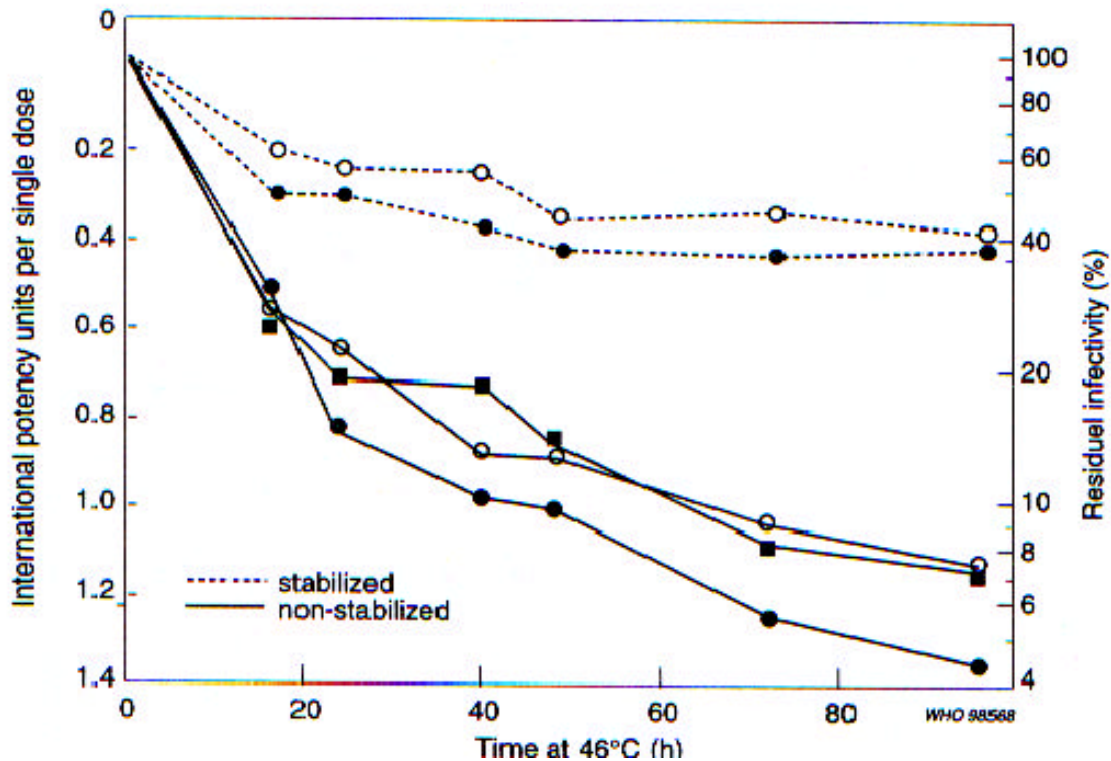
### **7.1. Estabilidade da vacina liofilizada**

A pouca estabilidade das vacinas contra a febre amarela mais recentes (FA) tem sido um assunto de importância. A maior parte delas perde alguma atividade durante a armazenagem a -20°C ou +5°C por seis meses, e elas deterioram-se muito rapidamente a altas temperaturas (125, 133). Vários fabricantes têm introduzido vacinas com estabilidade acentuada. Meios como a lactose, sorbitol, histidina e alanina têm promovido consideravelmente a estabilidade ao calor da vacina liofilizada 17D (12, 13, 133). Vacinas estabilizadas podem ser usadas com segurança em diferentes condições ambientais (55, 126). As diferenças quanto a estabilização entre as fórmulas antigas e as novas são mostradas na Figura 4.

A vacina contra a febre amarela pode seguramente ser armazenada a -20°C ou +4°C por dois anos ou mais (25). A vida média estimada da infectividade da vacina é 3 a 10 meses em temperatura ambiente, de 10 a 20 dias a 37°C e em torno de dois dias em 46°C (25, 52) O tempo necessário para reduzir a titulação inicial da vacina a 1000 unidades infectivas é entre 2.6 a 6.1 a 46°C, 5.7 a 15.7 dias a 37°C e 12.4 a 26 dias a 31°C (72).

Existem declínios similares na titulação quando a vacina estabilizada é mantida continuamente a 37°C e quando é submetida alternadamente a 37°C e 4°C (52).

**Figura 4: Decréscimo de infectividade de vacinas contra a febre amarela, estabilizadas e não estabilizadas, mantidas a 46°C por quatro dias**

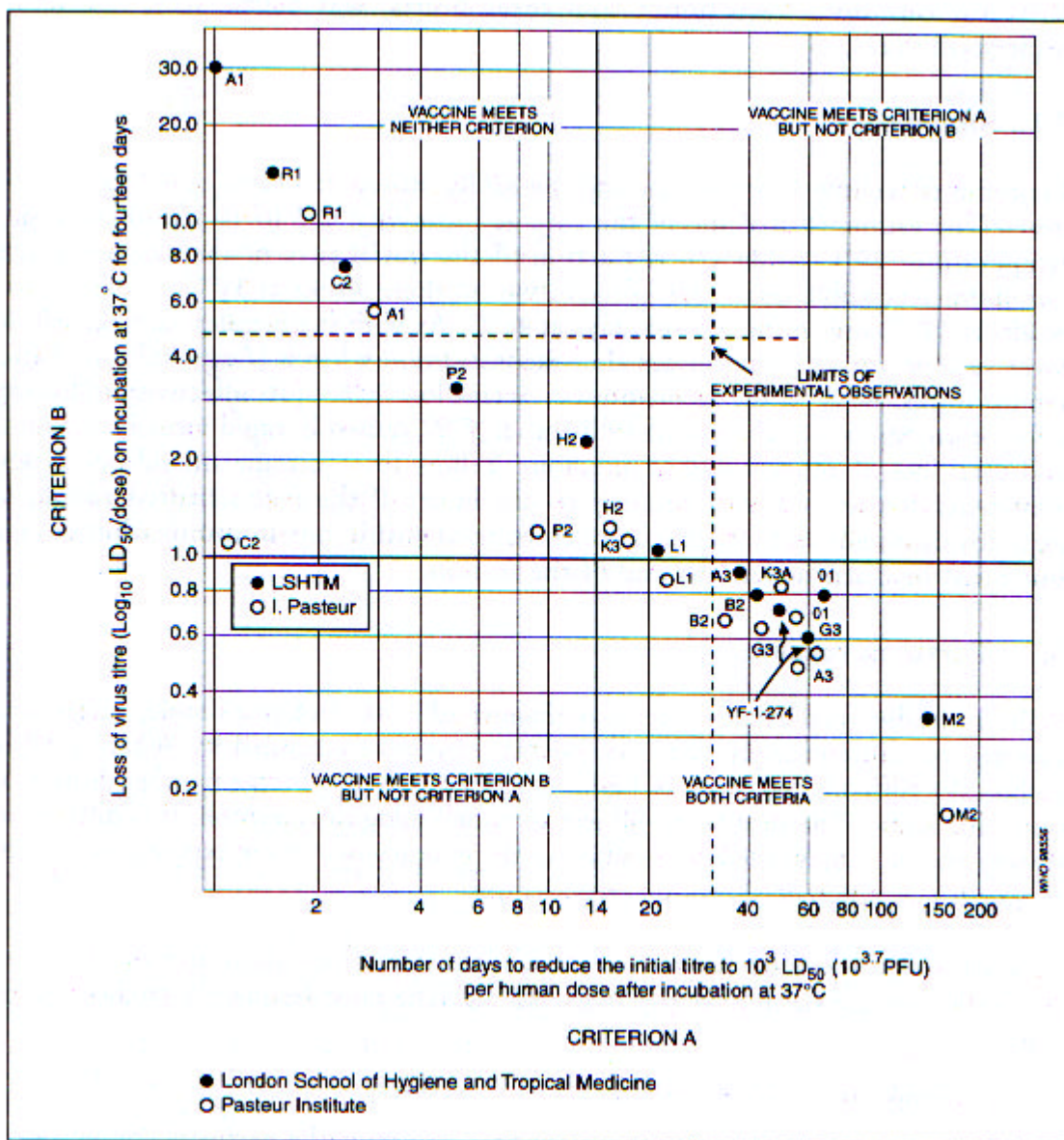


*Fonte: Burfoot C, Yound PA e Finter NB (25).*

Em 1987, um estudo de 11 vacinas FA foi encaminhado a OMS pelos fabricantes. Este estudo mostrava uma larga faixa de estabilidade entre as vacinas (148). O número de dias necessários para reduzir a titulação inicial a 1000 unidades infectivas, quando as vacinas foram mantidas a 37°C, ocupou uma faixa 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 (Figura 5).

Na Figura 5, as vacinas que aparecem acima da linha horizontal indicando o limite para a perda de  $1 \log_{10}$  de vírus suportaram uma perda de titulação muito alta. Da mesma forma, as vacinas que aparecem à esquerda da linha vertical que indica 14 dias de incubação, experimentaram uma perda muito alta de potência. As vacinas que aparecem no quadrante direito inferior apresentaram os critérios A e B de Requisitos da OMS para a estabilidade. Este requisito estipula que a vacina deve reter 100 LD50 em ratos ou o equivalente em unidades em forma de placas (PFUs) por dose humana (A), e que a média de perda de titulação deve ser menor que  $1 \log_{10}$  após duas semanas de incubação a 37°C (B) (155). Este requisito é comum a todas as vacinas FA produzidas por fontes aprovadas pela OMS (159).

Figura 5. Avaliação de vacinas contra a febre amarela 17D de acordo com os Requisitos propostos para estabilidade ao calor



Fonte: Organização Mundial de Saúde (148).

## 7.2. Estabilidade da vacina reconstituída

Quando mantida entre  $0^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$ , a vacina reconstituída retém sua dose de imunização mínima (1000 unidades infectivas) por pelo menos 10 dias (72). Entretanto, quando a vacina reconstituída é exposta a temperaturas elevadas, rapidamente se deteriora. A  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $31^{\circ}\text{C}$  e  $27^{\circ}\text{C}$ , a vacina reconstituída perde 50% de sua infectividade com uma exposição de 1.5, 3.1 e 4.9 horas seguidas (25, 72). O uso de um diluente a  $37^{\circ}\text{C}$  resulta em uma rápida inativação do vírus e a perda total de atividade em uma hora (134). Uma exposição de vacina reconstituída por uma hora a  $46^{\circ}\text{C}$  resulta em uma perda de  $0.5 \log_{10}$  (25). Dos vários diluentes, incluindo, o salino, tampão, gelatina e peptona, a água destilada mostrou-se como mais efetiva na manutenção de uma titulação viral satisfatória da vacina por três horas após a reconstituição a  $37^{\circ}\text{C}$  (134).

Em um estudo realizado por Cameroon, a soroconversão de um grupo de crianças imunizadas com vacina FA, a qual foi mantida após reconstituição sob temperatura de 25°C a 30°C por uma hora, e três horas, foi 100%, 82% e 67%, respectivamente (37).

### 7.3. Sumário

A vacina liofilizada contra a febre amarela pode ser seguramente armazenada a -20°C e +4°C por dois anos. A vida média estimada da infectividade da vacina é 3 a 10 meses em temperatura ambiente (20°C a 25°C). A recondução da titulação inicial da vacina ao nível mínimo aceitável leva duas a três semanas a 31°C, em uma a duas semanas a 37°C e em três a seis dias a 46°C. Como a vacina contra o sarampo, a vacina contra a febre amarela se deteriora rapidamente após reconstituição quando exposta a temperaturas elevadas. A 27°C a vacina reconstituída perde 50% de sua infectividade, em exposição de cinco horas seguidas. O uso de um diluente a 37°C resulta em uma inativação viral rápida e perda total da atividade em uma hora. A vacina contra a febre amarela deve ser rapidamente administrada após sua reconstituição (até em uma hora). **Se a vacina reconstituída for mantida continuamente em uma cuba com gelo, poderá ser usada durante uma sessão de imunização, porém deve ser descartada no final desta mesma sessão.**

## 8. Vacina Pertussis

Os estudos de estabilidade em vacinas pertussis são dificultados pela falta de um simples, barato e reproduzível teste de potência. O teste de potência recomendado pela OMS (149) é tecnicamente difícil e requer uma equipe de altíssima qualificação e um grande número de cobaias de uma raça específica. Os resultados são submetidos a uma variação biológica muito grande. É difícil se obter dados precisos quanto a deterioração da potência da vacina exposta a elevadas temperaturas, ao menos que ocorram mudanças marcantes.

No entanto, vários estudos têm fornecido informação valiosa sobre vários fatores que influenciam a estabilidade da vacina pertussis. Os fatores mais frequentemente estudados são:

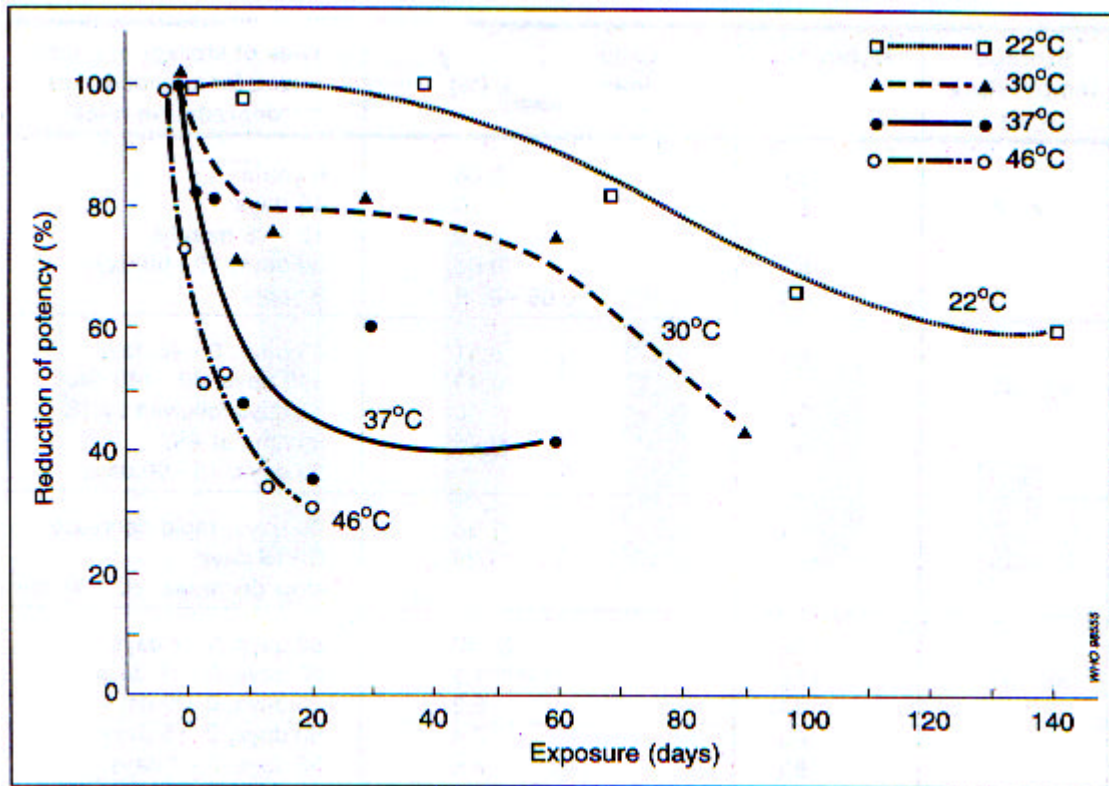
- a temperatura (6, 34, 44, 82, 83, 85, 124, 146);
- a forma da vacina: vacina monovalente verso pertussis como componente da vacina DTP (6, 34, 69, 79);
- o método de inativação (60, 77, 79);
- a cepa de B pertussis (26);
- a natureza do adjuvante ou preservativo (113, 146);

### 8.1. Influência da temperatura sobre a potência e toxicidade da vacina

A potência do componente pertussis da vacina DTP depende da temperatura de armazenamento; a potência pode ser reduzida por altas temperaturas, ou pelo congelamento. O impacto das várias temperaturas ambientes na potência do componente pertussis da vacina DTP é mostrado na Figura 6 (44) e Tabela 4.



**Figura 6: Perda de potência do componente pertussis da vacina DTP mantida por vários períodos de tempo em diferentes temperaturas**



*Fonte: Organização Mundial de Saúde (44)*

Quando armazenada em um refrigerador entre 4°C e 6°C, o componente pertussis da vacina DTP ou DTP-pólio parece ter potência satisfatória durante um período de dois anos (80, 83, 146). Entretanto, sob condições ótimas, ocorre um decréscimo contínuo na potência durante longos períodos de armazenamento. As vacinas DTP com potência inicial de 8.5 por dose humana simples têm uma potência abaixo de 4 IU por dose após 46 meses (80). A potência do componente pertussis das vacinas DTP-pólio declina de 5.2 a 8.6 IU/ml a 1.2-1.6 IU/ml durante a armazenagem por três anos a 4°C (83).

A proporção anual de perda de potência do componente pertussis das vacinas DTP é estimada em 0.35 IU por dose humana. A potência alcança um mínimo de 4 IU por dose após armazenagem a 4°C por seis anos (33, 34, 77). Entre 22 a 25°C a potência da vacina pertussis permanece acima de 80% de seu valor original por duas a oito semanas. Após isso, decresce gradualmente com uma taxa de degradação estimada em 0.3% a 0.4% por dia.

A 37°C, o processo de degradação da vacina torna-se mais pronunciado e parece ser bifásico: a potência inicial declina mais rapidamente, a uma taxa de degradação estimada entre 1% e 6%; posteriormente a taxa de degradação decresce (44, 60, 83, 146).

**Tabela 4: Estabilidade do componente pertussis das vacinas DTP em várias temperaturas**

Temperatura de armazenagem (°C)	Referência	Perda estimada de potência por dia (%)	Tempo de armazenagem e tempo de uso para o cálculo das taxas de degradação
4 - 8	34	0.06	6 anos
	85	0	45 dias
	6	0	12 - 18 meses
	61	0.01	90 dias, 15 - 90 dias
	83	0.05 - 0.06	3 anos
22 - 25	85	0.31	45 dias, 0 - 45 dias
	44	0.41	140 dias, 40 - 140 dias
	6	0	30 dias seguido por 18 meses a 4°C
	60	0.26	90 dias, 15 - 90 dias
30	44	1.80	90 dias, rápido decréscimo
		0.80	0 - 15 dias lento decréscimo, 30 - 90 dias
35 - 37	146	3 - 6*	56 dias, 0 - 7 dias
	124	1.2	90 dias, 0 - 15 dias
	44	5.2	60 dias, 0 - 20 dias
	60	2.4	90 dias, 0 - 15 dias
	83	5.5	56 dias, 0 - 7 dias
46	82, 83	6.7	56 dias, 0 - 7 dias
		10.8	20 dias, 0 - 4 dias

\* Duas vacinas DTP-pólio com diferentes conservantes

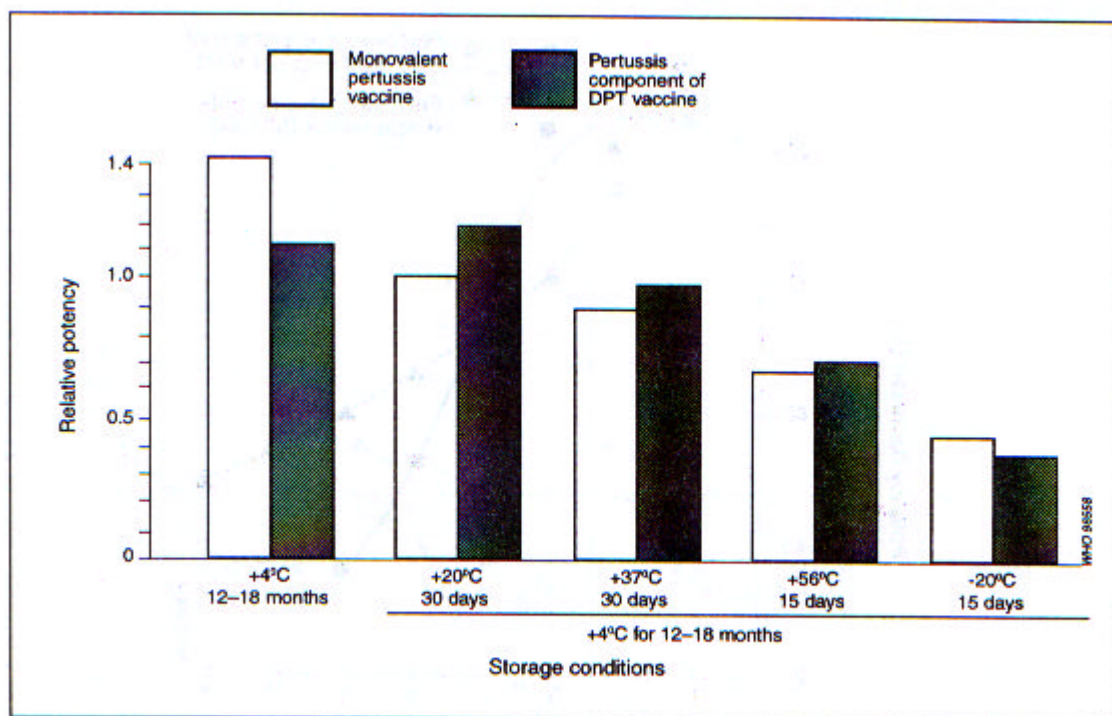
Durante os primeiros dias de armazenagem entre 45°C a 46°C o declínio é alto, atingindo algo em torno de 10% ao dia. Uma perda de 50% pode ocorrer durante a exposição por apenas quatro a sete dias (44, 82), e a armazenagem entre 50°C a 56°C causa uma rápida e completa perda de potência no componente pertussis (15, 69). Uma maior resistência do pertussis como componente de vacinas DTP a elevadas temperatura tem sido relatada porém não detalhada (15, 85, 124, 136).

Não existem dados sobre a estabilidade da vacina pertussis acelular, a qual, na vacina DTP contém proteínas adsorvidas em sal de alumínio. A estabilidade com perfil semelhante aos das outras vacinas protéicas é conseqüentemente uma expectativa, por exemplo, uma termoestabilidade relativamente boa, baixa resistência ao congelamento e uma vida média de dois ou três anos entre 2°C a 8°C (81).

O congelamento pode prejudicar a potência das vacinas pertussis. Quando as vacinas DTP são submetidas ao congelamento a -20°C por 15 dias, a potência do componente pertussis perde mais que 50% de seu valor inicial. A potência do componente pertussis é mais prejudicado pelo congelamento que pela armazenagem a elevadas temperaturas (Figura 7) (6). Quando vacinas DTP adsorvidas de cinco fabricantes foram mantidas por 12 horas a temperatura entre -5°C e -10°C e entre -20°C e -30°C, três delas apresentaram perdas significantes na potência do componente pertussis em ambas as faixas de temperatura (42).



**Figura 7: Imunogenicidade\* de vacina pertussis monovalente e o componente pertussis de vacina DTP armazenadas sob várias condições**



\* Expressa como potência relativa em comparação com a preparação de referência nacional.

Potência relativa 0.5 = 4 IU por dose simples.

*Fonte: Andrescu Vet al. (6).*

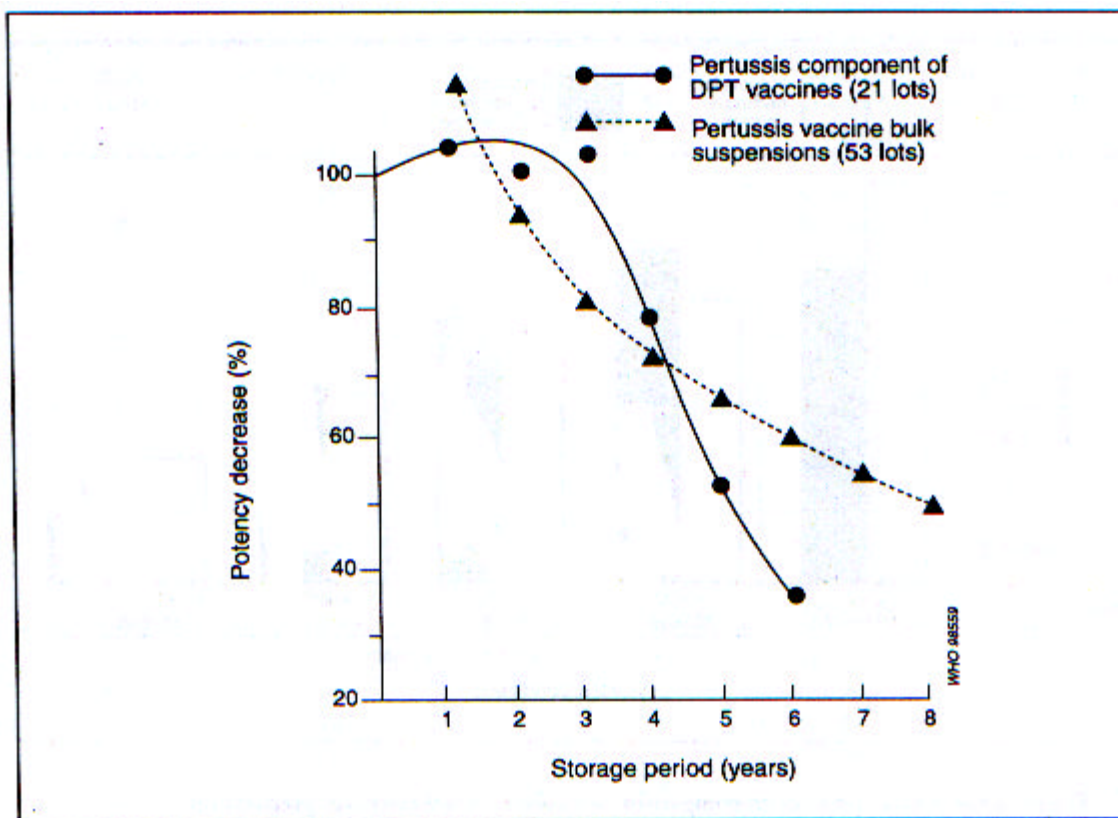
Não existe evidência de que a toxicidade da vacina pertussis aumenta com a armazenagem, como mensurado pelo ganho de peso em cobaias e testes de sensibilidade a histamina (6, 26, 61). De fato, as amostras de vacina estocadas a 25°C e 35°C por um período de 4 semanas a três meses mostraram toxicidade reduzida (26, 61).

### **8.2. Vacinas pertussis monovalente verso componente pertussis de vacinas combinadas**

Em um estudo, as vacinas pertussis monovalentes foram evidentemente instáveis a 4°C: durante a armazenagem por 18 meses algumas amostras perderam 58% a 87% de suas potências iniciais (69).

Durante o primeiro ano de armazenamento, o volume de suspensão de *B. pertussis* parece se deteriorar mais rapidamente a 4°C que o componente pertussis das vacinas DTP adsorvidas no fosfato de alumínio (Figura 8), provavelmente devido a falta do efeito protetor de seus toxóides protéicos e íons alumínio na vacina tríplice. (A influência dos íons será discutida na seção 8.5).

**Figura 8: Potência do *B. pertussis* em volume de suspensão e o componente pertussis das vacinas DTP armazenados por um a 8 anos a 4°C**



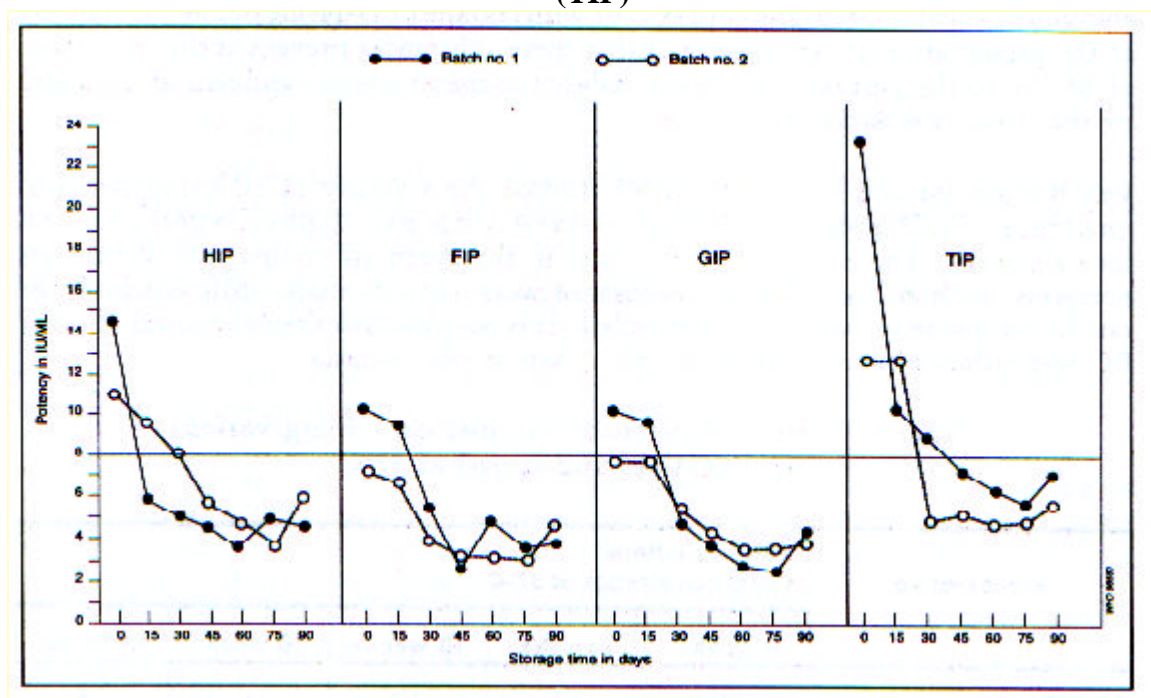
Fonte: Csizer Z, Zsidai J, Joo (33, 34).

### 8.3. Métodos de inativação do *B. pertussis*

Estudos recentes sobre a estabilidade das vacinas pertussis preparadas em culturas de crescimento e inativadas por vários métodos sugerem que, dos agentes inativantes merthiolate, fenol, formalina e calor, nenhum deles mostrou-se definitivamente superior. Durante o armazenamento prolongado, entretanto, as vacinas inativadas com fenol ou formalina tornaram-se de coloração escura e difícil de voltar a forma de suspensão, enquanto aquelas inativadas pelo merthiolate ou calor mostraram pouca mudança na aparência.

Observações recentes efetuadas por Kendrick (79) foram confirmadas por Gupta et al., o qual estudou a estabilidade do componente pertussis de vacinas DTP preparadas por diferentes métodos de inativação (calor, formaldeído, glutaraldeído, tiomersal ou acetona) (Figura 9) (60). Os testes de estabilidade realizados após o armazenamento de vacinas a 4°C a 8°C, 25°C e 35°C por 90 dias não mostraram diferenças na estabilidade atribuível aos agentes inativantes utilizados.

**Figura 9: Potência do componente pertussis das vacinas DTP armazenadas a 35°C, após inativação pelo calor (HIP), formaldeído (FIP), glutaraldeído (GIP) e tiomersal (TIP)**



Fonte: Gupta RK et al. (60).

O trabalho de Gupta et al., demonstra os problemas encontrados nos estudos sobre vacinas pertussis: baixa reprodutibilidade na estimativa da potência da vacina e diferenças nas taxas de degradação de vacinas preparadas pelo mesmo modo. A potência inicial de vacinas preparadas por diferentes métodos de inativação difere consideravelmente, com as vacinas inativadas pelo tiomersal tendo uma potência maior e as vacinas tratadas com acetona apresentando potência abaixo do padrão.

#### 8.4. Cepas de *B. pertussis*

Em pesquisa (26) as vacinas preparadas a partir de seis diferentes cepas de *B. pertussis* mostraram alguma variação na estabilidade, porém os números foram muito pequenos para se fazer uma distinção clara entre cepas instáveis e estáveis. A cepa que levou a uma vacina de maior estabilidade, entretanto, reteve os fatores de atividade de promoção de leucocitose e fatores de atividade de sensibilidade a histamina (relativas a toxina pertussis) mais prolongada que as vacinas preparadas de outras cepas.

#### 8.5. Influência do conservante e adjuvante

Uma perda de potência significativa pode ocorrer no componente pertussis da vacina DTP-pólio se o conservante for o cloreto de benzalcônio (BC) (38, 122). O BC foi introduzido como conservante em substituição ao merthiolate, o qual foi mostrado inativante do componente poliovírus. É um composto amônio quaternário cujo provável modo de ação envolve ligação a locais de cargas negativas na superfície celular do *B. pertussis*.

Subseqüentemente, Olson et al., mostrou que a vacina pertussis preservada com BC a 37°C por 16 semanas não tinha uma potência mensurável de proteção a cobaia (Tabela 5) (113). Entretanto o efeito prejudicial do tratamento com BC foi reduzido pelo tratamento da

vacina com sais de alumínio, cálcio ou magnésio ou com cloro ou D-lisina antes da adição do BC às células pertussis, desta forma estabilizando os antígenos protetores como mensurado pelo teste de proteção em cobaias.

Van Ramshorst e van Wezel (146) estudaram a estabilidade de todos os componentes de vacinas quádruplas DTP-pólio preservadas com BC, 2-fenoxietanol e formaldeído. As taxas de perda de potência no componente pertussis de vacinas preservadas com BC e 2-fenoxietanol não foram essencialmente diferentes da taxa na vacina preservada com merthiolate. É possível que o efeito deletério do BC tenha sido reduzido pelo fosfato de alumínio nas vacinas.

**Tabela 5: Potência das vacinas pertussis contendo vários conservantes e armazenadas a 37°C**

Preservativo	Potência em IU/ml				
	Período de armazenagem a 37°C				
	0 semanas	5 semanas	10 semanas	16 semanas	42 semanas
Merthiolate	4.6	2.1	2.1	-	NP
Cloreto de Benzalcônio (BC)	4.7	2.8	0.8	NP	NP
BC + cloreto de cálcio	3.6	3.6	3.0	3.6	3.3
BC + fosfato de alumínio	4.3	8.5	3.8	-	3.4
BC + sulfato de magnésio	7.1	2.8	2.8	1.9	0.9
Cloro	-	4.4	2.3	-	2.2

NP = não constatada proteção

*Fonte: Olson G H, Eldering G, Graham B (113)*

## 8.6. Sumário

Em sua apresentação usual, o DTP com adjuvante tiomersal e alumínio é suscetível ao congelamento porém relativamente estável a 4°C por dois anos ou mais. Resiste a armazenagem por vários meses em 22 a 25°C, por várias semanas a 37°C, e por menos de uma semana a 45°C. Como a maioria das vacinas que contém proteína, temperaturas mais elevadas que 56°C são deletérias.

## 9. Vacina BCG

A padronização da estabilidade da vacina BCG e estudos sobre isto são complicados pelos fatores seguintes:

- (1) Diferentes subcepas do BCG em vários níveis de atenuação são usados na produção de vacina.
- (2) Existem diferenças no manufaturamento e procedimentos de teste empregados pelos produtores de vacinas. A técnica e o tempo de cultivo do BCG e a natureza do estabilizante são fatores importantes.
- (3) Existem diferenças entre os produtos de conteúdo bacteriano e o número de partículas possíveis de cultura (CPs).
- (4) Não existe método laboratorial aprovado para ensaio de potência de proteção de vacinas contra infecção tuberculosa em humanos.

O elemento mais importante no controle de qualidade das partidas é a checagem da viabilidade da vacina. Isto envolve a determinação do número de CPs pela média de

colônias encontradas em meio sólido. O teste de viabilidade é também de importância principal quanto a estabilidade do BCG armazenado em diferentes condições.

A BCG foi a primeira vacina para a qual a OMS estabeleceu requisito de estabilidade ao calor (150). Um ADT deve ser realizado em cada lote de vacina BCG. O número de CPs na vacina incubada a 37°C por 28 dias não deve ser menor que 20% daquele na vacina armazenada a 4°C (154).

### **9.1. Impacto da temperatura na viabilidade da vacina BCG**

A vacina BCG é relativamente estável em temperaturas de refrigeradores abaixo de 8°C, e a maioria dos fabricantes dá um período de validade de um ano nestas condições. A viabilidade decresce em torno de 20% durante a armazenagem a 4°C por dois anos (53), sugerindo uma perda anual de cerca de 10% (53, 165) abaixo de 8°C. Entretanto, algumas vacinas podem perder 20% a 25% de sua viabilidade original durante o armazenamento por apenas seis meses (137).

A vacina BCG mostrou apenas uma discreta perda de viabilidade quando mantida a 13-15°C por dois meses, porém o declínio alcança cerca de 20% no final de nove meses (24). A exposição a 18°C reduz a viabilidade em torno de 10% em um mês (165).

Sob temperatura ambiente (na faixa de 20°C a 25°C) algumas vacinas BCG podem perder 25% a 40% de sua viabilidade original durante o armazenamento por dois meses (74) e um quinto a um terço de sua viabilidade em três meses (24). Na faixa de 30°C a 37°C, a degradação começa muito rapidamente e a taxa de redução de CP é maior no início que durante os estágios posteriores de exposição (Tabela 6) (24, 129). Não é conhecido se esta taxa de degradação inicial se apresentaria como um declive acentuado se fossem repetidas as exposições a altas temperaturas. A perda diária de viabilidade das vacinas mantidas a 37°C por poucas semanas alcança uma faixa de 2% a 2% (11, 20, 24, 74, 165).

**Tabela 6: Perda da viabilidade em quatro vacinas BCG armazenadas a 30°C e 37°C por 36 semanas.**

	Taxas de perda de potência por dia (% dos valores originais a			
	30°C		37°C	
	Período de armazenagem (em semanas)			
Vacina	0 - 9	10 - 36	0 - 4	6 - 36
Japonesa	0.5	0.1	0.8	0.2
Glaxo	0.9	0.2	2.1	0.1
Dakar	1.0	0.2	2.3	0.1
Dinamarquesa	0.8	0.2	1.9	0.2

Sob temperatura acima de 37°C a degradação da vacina BCG é muito rápida. A exposição a 54°C resulta na perda de 25% a 73% da viabilidade original em um dia e de 74% a 85% em três dias (74). A viabilidade pode ser reduzida pela metade durante a exposição a 70°C por 30 minutos ou por 80% durante a fervura por cinco minutos (56).

A redução no número de CPs causada pela exposição da vacina BCG a elevadas temperaturas é proporcional a temperatura e a duração da exposição. Entretanto, considerando que a dose ótima da vacina não é conhecida, é difícil se determinar um limite permissível de degradação pelo calor. Quando crianças escolares foram vacinadas, com vacinas cuja viabilidade que tinha sido reduzida a 40 a 60% durante a exposição a altas temperaturas por duas a quatro semanas, o resultado de sensibilidade a tuberculina e as lesões de vacinação foram indistinguíveis daquelas produzidas pelas vacinas controles que



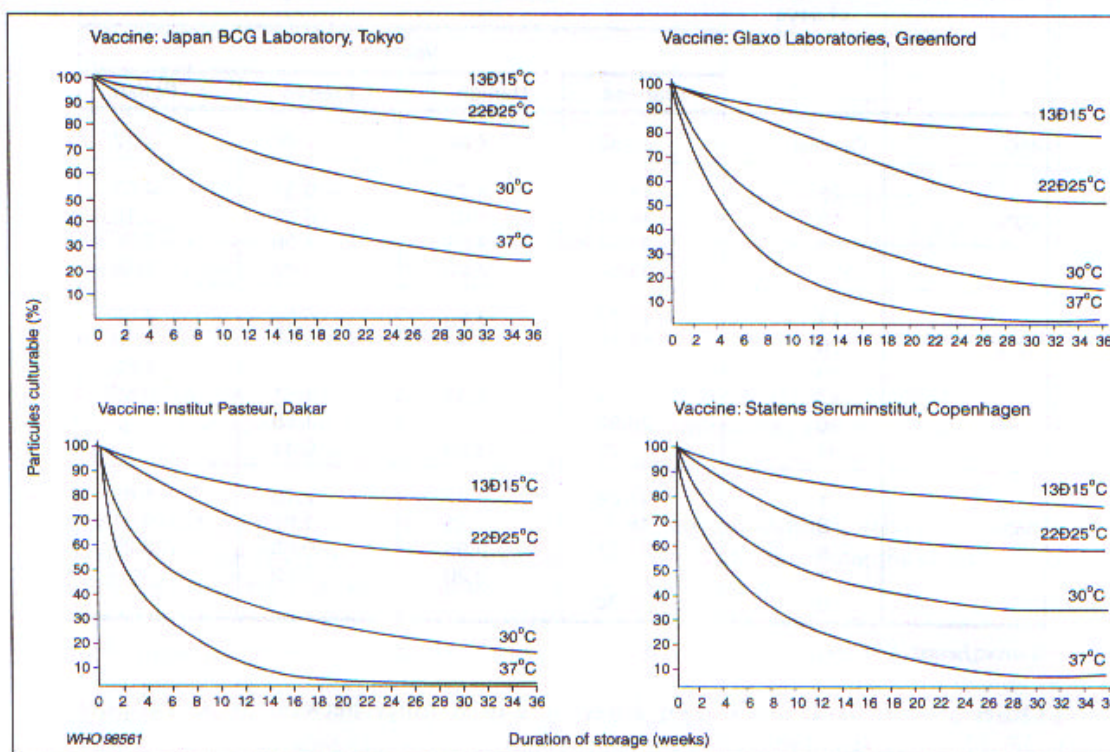
foram armazenadas em um refrigerador (20, 165). Armazenagem prolongada a temperaturas elevadas reduziu a alergia pós-vacinação e o tamanho das lesões vacinais (20). A interpretação desses resultados não é fácil, considerando que a hipersensibilidade demorada a tuberculina e os granulomas no local de vacinação, o grau de pureza da resposta celular específica, não são diretamente relacionadas a proteção.

Com frequência surgem questões sobre a prudência em se armazenar vacina BCG abaixo de 0°C. Além do mais, tem sido sugerido que o congelamento e o descongelamento repetidos podem ter efeito deletério. Entretanto, evidência experimental indica que a viabilidade não é afetada pela armazenagem a -20°C ou -30°C ou pelo congelamento e descongelamento em até 10 vezes (24, 56).

## 9.2. Estabilidade de vacinas produzida de diferentes subcepas de BCG

Todas as cepas de BCG disponíveis são derivadas de uma produzida por Calmette a mais de 65 anos atrás. Após o longo período de manutenção por meio de cultura, existem diferenças essenciais entre as cepas irmãs.

**Figura 10: Viabilidade de quatro vacinas BCG armazenadas por 36 semanas sob várias temperaturas**



**Fonte: Bunch Christensen K (24).**

As cepas de BCG são normalmente classificadas como resistentes, como a cepa 1172 francesa (Pasteur) e a cepa 1331 dinamarquesa (Copenhagen), ou débeis, como a cepa 172 japonesa, a cepa brasileira Moreau, e a cepa 1077 britânica (Glaxo). Esta distinção é baseado principalmente nas características de crescimento, virulência residual em animais e a reatogenicidade em crianças. As diferenças podem estar relacionadas com o conteúdo lipídico da superfície antigênica e proteína secretada (1).

Existem diferenças quanto a estabilidade ao calor das vacinas BCG preparadas de diferentes subcepas (Tabela 7, Figura 10) (24). Em todas as temperaturas testadas, as taxas

de degradação foram mais baixas para a vacina japonesa e mais altas para as vacinas Dakar e Glaxo, com a vacina dinamarquesa ocupando uma posição intermediária. Durante a mais longa armazenagem, as diferenças entre as vacinas diminuíram.

Um recente estudo confirmou as diferenças de termoestabilidade entre as vacinas preparadas de várias subcepas (74, 75). A vacina Japonesa preparada da subcepa 172 teve uma termoestabilidade maior que as vacinas francesa (cepa 1172), a dinamarquesa (subcepa 1331 Copenhagen) e polonesa (subcepa Moreau) (Tabela 5) (74). A 37°C o tempo necessário para um decréscimo de 50% da viabilidade (CPs/mg) da vacina japonesa foi em torno de 56 dias, enquanto que para as outras vacinas isto se deu em uma faixa de 38 a 35 dias. A 54°C a vacina japonesa reteve mais que 50% de sua viabilidade para um período mais longo que nove dias, enquanto as outras vacinas perderam mais que 50% de suas atividades originais em um a três dias.

**Tabela 7: Partículas cultiváveis de BCG das vacinas japonesa, dinamarquesa, francesa e polonesa sob várias temperaturas**

Temperatura	Número de dias	Número de partículas cultiváveis/mg			
		Vacina			
		Japonesa	Dinamarquesa	Francesa	Polonesa
4°C	Controle	47.86	4.86	7.76	6.17
20°C	28	45.71	3.72	6.31	4.57
	63	44.67	3.02	5.89	3.72
	84	39.81	2.24	4.90	2.75
	112	38.02	2.09	3.47	2.19
37°C	14	46.77	3.80	5.50	4.68
	28	37.15	2.34	4.90	2.69
	35	-	-	-	1.62
	42	-	1.32	1.51	0.55
	56	26.92	-	1.55	-
	84	17.78	2.29	0.41	-
54°C	1	47.86	3.47	2.75	1.66
	3	46.77	1.26	1.07	0.91
	6	39.81	0.98	0.63	0.25
	7	-	0.20	0.22	-
	9	32.36	-	-	-

*Fonte: Janaszek W (74).*

Outros estudos também têm mostrado diferenças na estabilidade entre as vacinas BCG (57, 129 – veja também Tabela 8).

**Tabela 8: Viabilidade e estabilidade ao calor de dez vacinas BCG**

Vacina	Número inicial de CPs (x 10 <sup>6</sup> /ml)	Viabilidade após armazenagem por 28 dias a 37°C		Perda diária de viabilidade (%) (período de armazenagem analisado, dias)
		CPs (x 10 <sup>6</sup> /ml)	% do número inicial de CPs	
Japonesa	27.0	16.6	61	(0 – 28)
Glaxo	20.1	10.9	54	(0 – 21)
USSR	7.1	3.6	51	1.7 (0 – 28)
Connaught	6.9	0.2	3	6.7 (0 – 14)
Dakar	6.5	1.8	28	3.2 (0 – 21)
Bilthoven	4.2	1.3	31	4.9 (0 – 14)
Copenhagen	2.9	1.9	66	2.5 (0 – 28)
Merieux	2.8	0.3	11	3.3 (0 – 28)
Inst. Pasteur	2.7	1.3	48	1.9 (0 – 28)
Praga	1.1	0.2	18	5.2 (0 – 21)

*Fonte: Lugosi L (92).*

### **9.3. Embalando vacinas BCG**

As vacinas BCG requerem especial precaução para se assegurar estabilidade suficiente. Nesta ação, os pontos mais importantes são liofilização, o uso de um estabilizante efetivo e o próprio lacre das embalagens da vacina.

A estabilidade aumentada a 4°C e 37°C e os maiores valores iniciais de viabilidade (por exemplo, melhor resposta em ratos após liofilização) têm sido observados após a mudança de composição do estabilizante e melhoria dos métodos de liofilização (53).

No presente momento o uso de ampolas seladas à vácuo é a prática mais comum para o incremento da estabilidade. Entretanto, o fechamento à vácuo é difícil comparado ao fechamento na presença de gás inerte. Não existiram diferenças significativas entre as vacinas BCG lacradas sob vácuo e sob nitrogênio ou dióxido de carbono tanto a 4°C ou a 37°C (53, 86). Quantidades viáveis de vacina lacradas sob nitrogênio têm sido relatadas como em declínio mais rapidamente que aquelas das vacinas lacradas sob vácuo (20). Uma vacina BCG lacrada sob argônio pareceu ter menor estabilidade a 37°C que a vacina lacrada a vácuo (56).

As vacinas BCG em frascos com tampa de borracha têm uma menor estabilidade que aquelas conservadas em ampolas (92, 129). A maior desvantagem dos frascos fechados com tampa de borracha é que os usuários são tentados a manter a vacina pós-reconstituída (141).

### **9.4. Efeito da luz na estabilidade da vacina BCG**

As vacinas BCG liofilizadas, independente de sua subcepa, são sensíveis a luz ultravioleta e fluorescente. Elas devem ser acondicionadas em ampolas feitas de uma substância que apresente baixa transmissibilidade de luz, tal como o vidro âmbar, e devem ser protegidas da luz quando em uso (87).

### **9.5. Estabilidade da vacina reconstituída**

A vacina BCG reconstituída é muito instável e deve ser usada durante apenas uma sessão de trabalho de cinco a seis horas. **A vacina que sobrar deve ser descartada ao final da sessão.** As razões destas precauções são as seguintes:

- (1) Existe risco de contaminação porque a vacina BCG, em contraste a todas as outras vacinas, não contém agente bacteriostático.
- (2) Existe uma perda de potência (41).

### **9.6. Sumário**

A maior parte das vacinas BCG liofilizadas são estáveis a temperaturas de 0°C a 8°C.

Em temperatura ambiente a estabilidade varia; após armazenamento por vários meses ocorre uma perda de viabilidade de aproximadamente 30%. A perda diária de viabilidade das vacinas mantidas por poucas semanas a uma temperatura de 37°C é da faixa de 1% a 2%. A vacina reconstituída é muito instável. **Uma vez reconstituídas, todas as vacinas BCG devem ser descartadas no final de uma sessão, independente da existência de sobra de muitas doses no frasco ou ampola.**

## **10. Vacina contra a poliomielite**

Marcantes progressos têm sido obtidos com o passar dos anos através da erradicação global da poliomielite. Durante 1996, mais que 400 milhões de crianças foram imunizadas



durante os dias nacionais de imunização. Em 1997, 500 milhões de crianças foi a meta atingida. A vacina oral contra a poliomielite (OPV) tem sido a vacina de escolha para estas campanhas.

A vacina oral contra a poliomielite é a menos estável das vacinas comumente usadas em programas nacionais de imunizações. É composta de um vírus vivo atenuado, o qual, similarmente a maior parte dos vírus, é instável exceto quando mantida a temperaturas muito baixas (congelada). As atuais recomendações requerem que, para manutenção da potência, a vacina deve ser armazenada e transportada sob baixas temperaturas. A termoestabilidade da vacina está sendo melhorada através do uso de estabilizantes, tais como altas concentrações de cloreto de magnésio e alguns açúcares. Estes são sistematicamente usados para estabilizar todas as preparações de OPV.

### **10.1. Estabilidade da vacina a elevadas temperaturas**

A estabilidade da vacina trivalente contra poliomielite tem sido usualmente monitorada pela medição, do total de vírus vivo de três sorotipos (22, 46, 132). Esta prática pode detectar mudanças no conteúdo do tipo 2 e tipo 3 a exposições seguidas a temperaturas elevadas (10). Pequena perda na titulação viral tem sido observada após armazenamento prolongado de OPV a  $-20^{\circ}\text{C}$  (52, 132). A maioria dos fabricantes indicam que suas vacinas OPV são potentes se armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou menos até que expire o prazo de validade indicado na embalagem (geralmente dois anos). Quando a distribuição não é imediata, é aconselhável armazenar a vacina a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  ou menor, considerando que isto interrompe a deterioração na potência da vacina.

A perda de potência a temperatura de refrigerador pode variar. Peetermans e Colinet mostraram uma perda na titulação de suas vacinas estabilizadas com cloreto de magnésio de apenas  $0.3 \log_{10}$  após incubação a  $4^{\circ}\text{C}$  por 18 meses (117). Entretanto, outros resultados sugerem uma menor estabilidade a esta faixa de temperatura; os resultados observados indicaram uma perda de  $0.15-0.31 \log_{10}$  após um período de incubação mais curto (30 dias) a  $5^{\circ}\text{C}$  (157).

A taxa de degradação é proporcional a temperatura de exposição. As vacinas orais contra poliomielite podem perder 4% a 13% de suas atividades por dia a  $25^{\circ}\text{C}$ , 11% a 21% por dia a  $31^{\circ}\text{C}$ , e 26% a 34% por dia a  $37^{\circ}\text{C}$  (157). As meias vidas das diferentes vacinas OPV testadas na Índia foram 4.3 dias a  $22^{\circ}\text{C}$  e 1.7 dias a  $36^{\circ}\text{C}$  (132). A quantidade de títulos perdidos por dia foi de  $0.03-0.04 \log_{10} \text{CCID}_{50}$  quando as vacinas foram mantidas a  $26^{\circ}\text{C}$ , e  $0.10-0.12 \log_{10}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  (48). Com estas taxas de degradação uma vacina com um conteúdo total de vírus de  $6.15 \log_{10} \text{CCID}_{50}$  perde metade sua potência durante dois a três dias se exposta a  $37^{\circ}\text{C}$  ou sete a dez dias se exposta a  $22-26^{\circ}\text{C}$ . Isto coincide com as observações prévias de Melnick e Wallis (105) e Perkins e Magrath (121), os quais consideraram que as vacinas contra a poliomielite retinham a mínima potência por três dias a  $37^{\circ}\text{C}$  e por 14 a 21 dias em  $25^{\circ}\text{C}$  a  $28^{\circ}\text{C}$ .

Em temperaturas superiores a  $37^{\circ}\text{C}$ , a degradação das vacinas contra poliomielite é rápida. À  $41^{\circ}\text{C}$ , elas perdem em torno da metade de suas potências diariamente (48), enquanto que a  $50^{\circ}\text{C}$  a vacina perde  $0.1 \log_{10} \text{CCID}_{50}$  em uma hora (22), equivalente a meia vida de três horas.

### **10.2. OPV em temperaturas de congelamento**

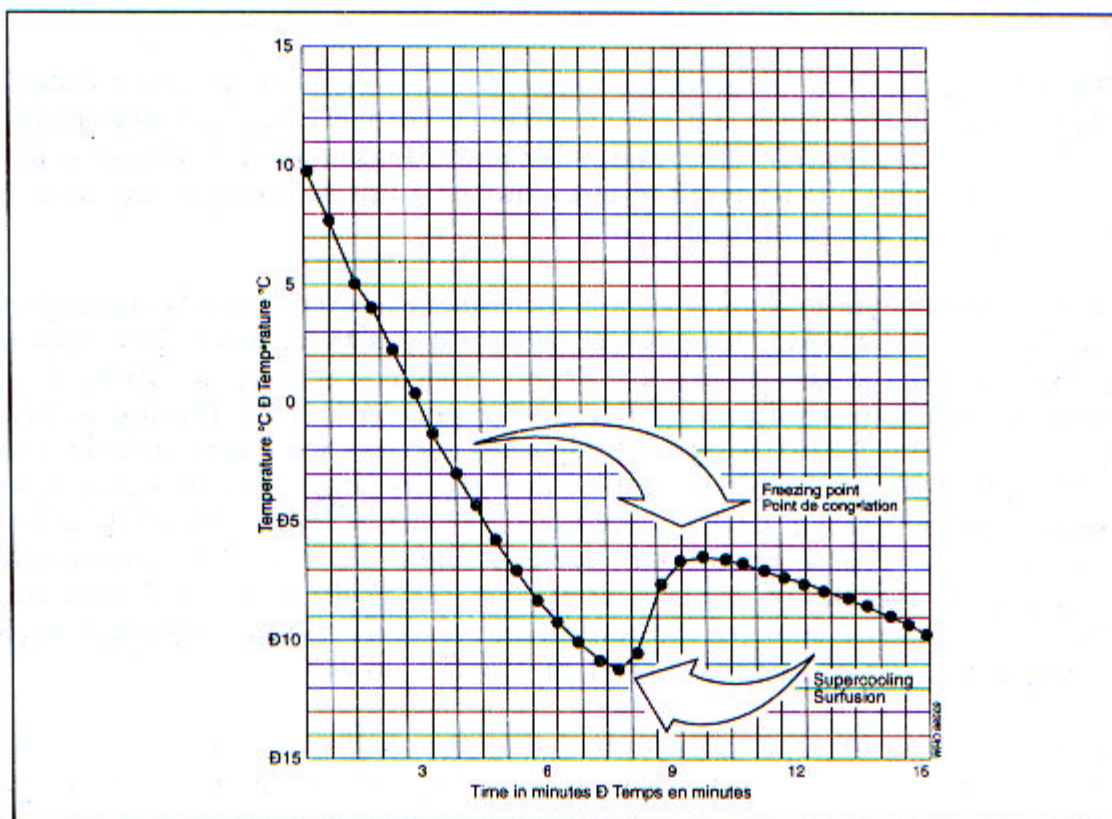
#### **10.2.1. Ponto de congelamento da OPV**

A presença de estabilizantes nas preparações de vacinas baixa seus pontos de congelamento. Um estudo foi feito a respeito da OPV trivalente de cinco fabricantes para

determinar os pontos de congelamento dos produtos e os efeitos sobre suas potências por cerca de 180 ciclos de congelamento e descongelamento (49).

Quando as vacinas contra poliomielite são mantidas a  $-25^{\circ}\text{C}$  elas se superresfriam rapidamente entre  $-8^{\circ}\text{C}$  e  $-16^{\circ}\text{C}$ , embora permaneçam no estado líquido. Suas temperaturas então caem rapidamente em torno de  $-7.5^{\circ}\text{C}$ , passando ao estado sólido de congelamento. A temperatura para a qual a vacina cai é tomada como ponto de congelamento (Figura 11), que varia de  $-6.6^{\circ}\text{C}$  a  $-8.1^{\circ}\text{C}$  (49).

**Figura 11: Temperatura de vacinas trivalentes contra poliomielite expostas a  $-25^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos**



*Fonte: Organização Mundial de Saúde (49).*

### **10.2.2. Potência da vacina após repetidos ciclos de congelamento e descongelamento**

Alguns estudos têm mostrado que não existe perda significativa de titulação de vírus na OPV submetida a cerca de 10 ciclos de congelamento e descongelamento (18, 40, 46, 52, 132). Entretanto, nenhum detalhe foi dado a respeito da rapidez do congelamento e descongelamento, a temperatura à qual as amostras atingiram durante cada descongelamento, ou o tamanho dos intervalos durante os quais a vacina foi mantida descongelada. Os títulos totais para a vacina trivalente foram medidos porém não foram fornecidos os dados por sensibilidade específica por tipo de poliovírus quanto aos ciclos de congelamento e descongelamento (10)

As vacinas submetidas a 10, 90 e 180 ciclos de congelamento e descongelamento (de  $-25^{\circ}\text{C}$  a  $2.5^{\circ}\text{C}$ ) tiveram valores de título de vírus para todos os três tipos, sem diferença significativa daquelas amostras controles deixadas a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Não existe tendência para o

declínio na titulação a 2.1°C. Sob condições de campo, um defeito na rede de frio pode resultar na exposição das vacinas a temperaturas muito altas. Consequentemente, estes resultados são válidos apenas em situações nas quais a temperatura de descongelamento das vacinas permanece na faixa encontrada em um refrigerador em perfeito funcionamento.

Os compartimentos de congelamento dos refrigeradores, os quais são algumas vezes usados para a armazenagem de OPV, operam em torno de -5°C. Isto é acima do ponto de fusão da vacina, a qual poderá, desta forma não permanecer em estado sólido.

### ***10.3. Temperatura de armazenagem recomendada***

Considerando que existe uma grande relação entre a temperatura de armazenagem e a sobrevivência do poliovírus, os fabricantes recomendam o vencimento do prazo de validade da OPV de acordo com a temperatura na qual é mantida. Muitos descrevem duas situações: (1) até dois anos se a vacina é armazenada em profundo congelamento a -2°C ou abaixo disto; e (2) por seis meses se é armazenada em um refrigerador a 0°C a 8°C. Um fabricante assegura que seu estabilizante à base de cloreto de magnésio mantém adequada imunogenicidade de sua vacina por 12 meses quando mantida em um refrigerador a 2-8°C, por três semanas a 25°C, e por três dias a 37°C.

O constante monitoramento do sistema da rede de frio é necessário. Em um estudo na Índia, a frequência de perda de potência da OPV foi comparativamente maior inicialmente e decrescente com o tempo (35). Quando a distribuição e administração da OPV não ocorrer de imediato, a armazenagem é recomendada em temperatura inferior a -15°C por até 8 meses no nível central e por até três meses no nível regional, se existirem freezers confiáveis nestes locais.

No campo, onde a chance de defeitos sérios na rede de frio é grande e os freezers são menos comuns, a OMS recomenda que a OPV não seja mantida em temperaturas de refrigerador (0°C a 8°C) nos centros de saúde por mais que um mês, não seja transportada a estas temperaturas por mais que uma semana (45, 91). O compartimento de congelamento de um refrigerador no centro de saúde deve ser reservado apenas para sacos de gelo.

### ***10.4. Requisitos da OMS para termoestabilidade***

Cada lote final de OPV deve ser submetido ao teste de degradação acelerada para confirmar que sua estabilidade é satisfatória. Volumes representativos de vacina têm que ser incubados a 37°C por 48 horas. O conteúdo virótico total nos frascos expostos e não expostos é determinado concorrentemente com aquele de uma preparação trivalente de referência. A vacina passa no teste se a perda causada pela exposição não for maior que um fator de 10<sup>0.5</sup> unidades infecciosas por dose humana. As autoridades nacionais de controle especificarão a titulação mínima de vírus por dose humana (158).

### ***10.5. Fatores que afetam a estabilidade da OPV sob altas temperaturas***

A estabilidade da OPV depende de vários fatores, incluindo as possíveis diferenças quanto a sensibilidade ao calor, entre os tipos virais, a presença e natureza do estabilizante, o valor do pH da vacina, e o container no qual a vacina é armazenada.

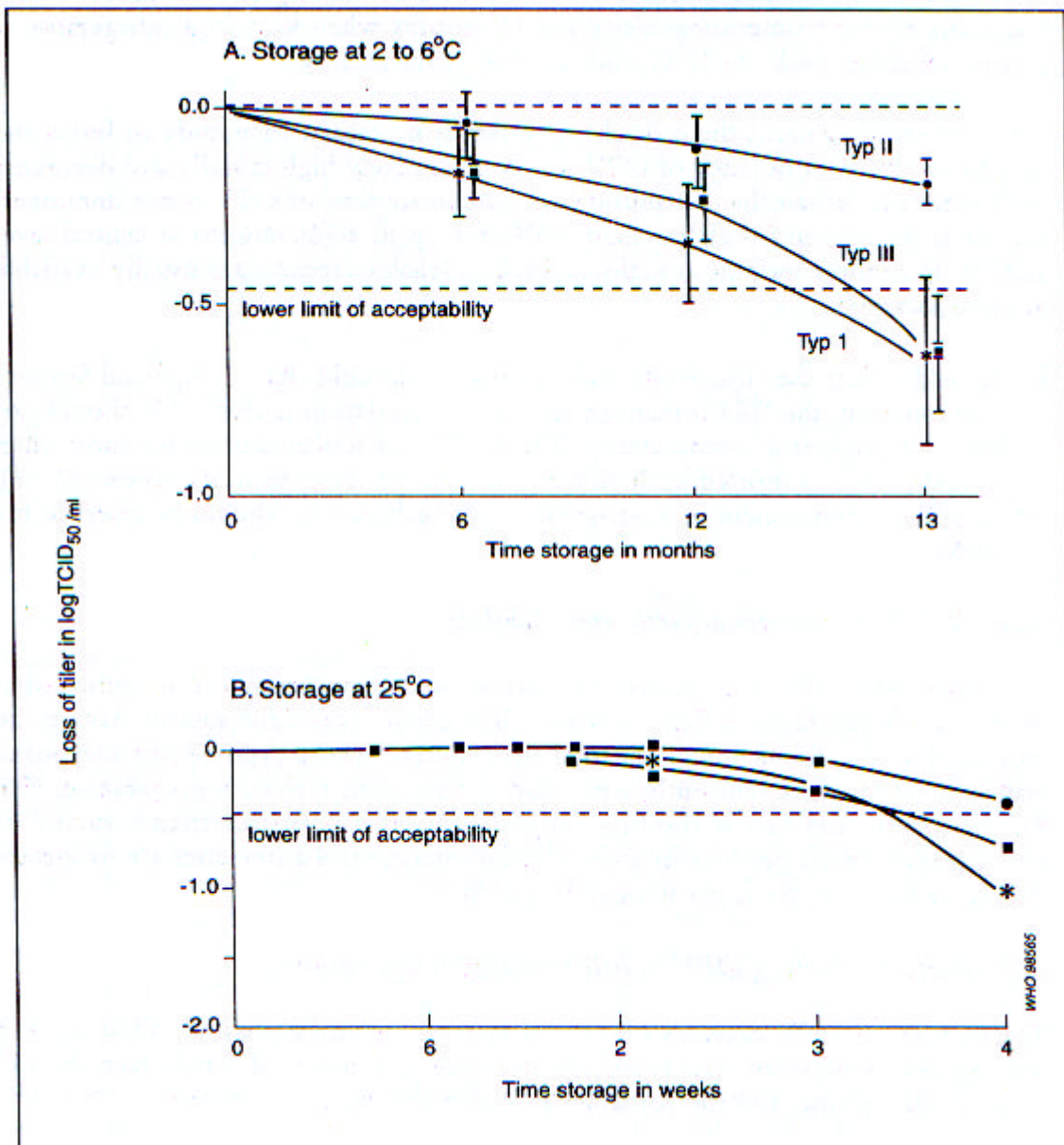
#### ***10.5.1. Diferenças entre os tipos virais quanto a estabilidade ao calor***

Os tipos individuais de poliovírus na vacina tríplice diferem quanto as suas características de crescimento. O tipo 2, quando administrado em conjunto com os tipos 1 e 3, tem o crescimento mais prolífico durante a replicação intestinal, seguido pelos tipos 3 e 1. Para

compensar estas diferenças na taxa de crescimento, formulações balanceadas de vacina trivalente foram desenvolvidas, usualmente contendo os tipos 1, 2 e 3 nas proporções de 10:1:3 (158). Outros estudos mostraram que as mudanças na razão desses componentes deve aumentar a imunogenicidade da OPV, particularmente do vírus tipo 3 (114, 115).

Testes em 50 lotes comerciais de OPV armazenados em 3 a 6°C, sugeriram que o tipo 2 foi particularmente estável e que o tipo 1 foi o menos estável. As mesmas diferenças na estabilidade foram encontradas quando as vacinas foram armazenadas a 25°C (Figura 12) (101).

**Figura 12: Estabilidade de vacinas trivalentes orais contra poliomielite estabilizadas com peptona tampão e armazenada em 2° a 6°C e 25°C**



**Fonte: Magrath DI (96).**

Estas observações não têm sido confirmadas por outros autores que testaram diferentes vacinas OPV. De acordo com Peetermans et al. (118), o tipo 1 foi mais estável que os tipos 2 e 3. O tipo 1 mostrou uma perda de apenas 0.06 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> após armazenagem

de vacina OPV a 4°C por 12 meses, enquanto que os tipos 2 e 3 mostraram perdas de 0.20 e 0.27 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> respectivamente. As diferenças entre os tipos não foram consistentes e não houve clara evidência de uma maior resistência particular a algum tipo quando as vacinas foram armazenadas em 20°C a 25°C e 37°C (Tabela 9). Mirchamsy et al. não encontraram diferenças entre os tipos de poliovírus mantidos por nove meses em 4°C e -20°C (109).

**Tabela 9: Comparação da estabilidade de diferentes tipos de poliovírus na faixa de 20°C a 25°C e a 37°C**

		Perda de titulação em log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> por dia a temperaturas de:						
Vacina		20-25°C			37°C			Referências
-		Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	
Estabilizada com MgCl <sub>2</sub>	com	0.026	0.024	0.021	0.182	0.193	0.160	104
Estabilizada com Sacarose	com	0.043	0.064	0.040	0.220	0.302	0.214	
B		-	-	-	0.149	0.159	0.144	101
C		-	-	-	0.151	0.129	0.136	
D		-	-	-	0.207	0.171	0.150	
E		-	-	-	0.224	0.161	0.211	

### 10.5.2. Natureza do estabilizante

Os estabilizantes mais frequentemente usados com poliovírus atenuados têm sido o cloreto de magnésio e a sacarose, tampões, leite e gelatina também têm sido usados.

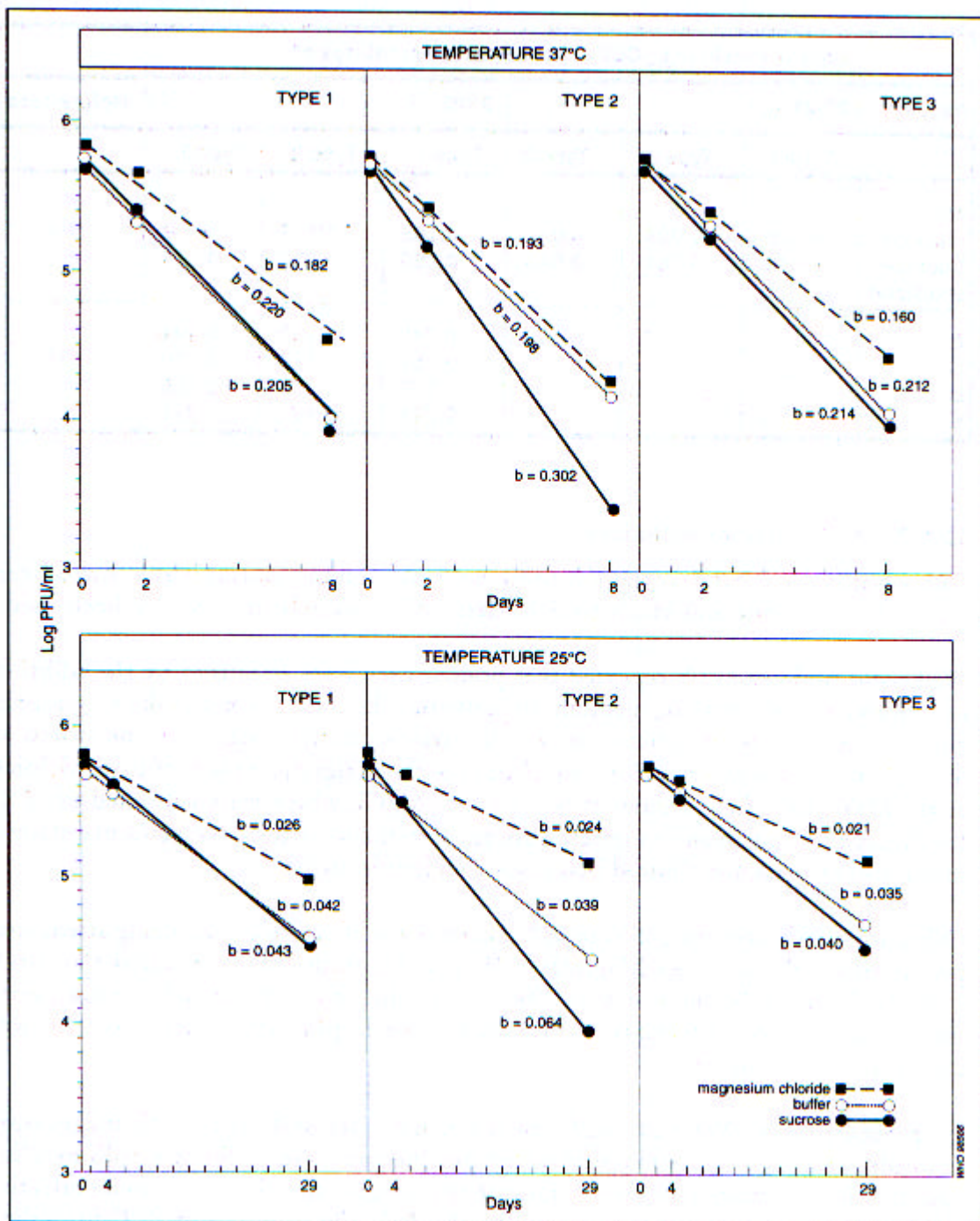
Wallis e Melnick (147) relataram que os poliovírus foram estabilizados pela adição de cátions a um meio em suspensão. Em particular, a adição de um molar de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) à cepas de poliovírus atenuado, capacitou as vacinas ao armazenamento a 4°C por três meses ou a 25°C por 25 dias, sem significativa perda de titulação. Melnick et al. (104) constataram que as vacinas estabilizadas com MgCl<sub>2</sub> e que foram submetidas a 30°C por 21 dias causaram uma resposta de anticorpo igual àquela da vacina comumente mantida em estado de congelamento e descongelada imediatamente anterior a administração.

Outros estudos mostraram que sacarose a 35% a 50% foi efetiva para estabilizar poliovírus atenuado. Perkins e Magrath (121) e Magrath (95) concluíram que 1 M MgCl<sub>2</sub> e sacarose a 50% foram efetivas como agentes estabilizantes. Para manter a estabilidade máxima do vírus foi necessário prevenir o aumento de pH que ocorre quando o CO<sub>2</sub> é perdido pelo container.

No presente, a maioria das OPVs disponíveis no mercado são estabilizadas com cloreto de magnésio, embora alguns fabricantes produzam vacinas contra a poliomielite estabilizadas com sacarose. Recentes estudos parecem indicar que o cloreto de magnésio é mais efetivo que a sacarose quanto ao incremento da termoestabilidade das OPVs. Em exposição a 37°C por 8 dias ou a 25°C por 29 dias a taxa de perda de potência em vacinas monovalentes para todos os três tipos foi maior nos produtos estabilizados com sacarose ou tampão que naquelas estabilizadas com cloreto de magnésio (Figura 13).



**Figura 13: Perda de potência de OPV monovalente estabilizada com cloreto de magnésio, tampão e sacarose e armazenada a 37°C e 25°C**



Nota: os valores  $b$  referem-se a perda de titulação por dia (coeficientes de regressão)

Fonte: Mann GF et al. (100)

Uma vacina estabilizada com cloreto de magnésio foi mais estável que uma produzida pelo mesmo fabricante e que foi estabilizada com sacarose a temperaturas abaixo de 37°C (Tabela 10) (117). O melhor efeito estabilizante do cloreto de magnésio tem também sido observado em outras partes (109).

Concluiu-se que o uso consistente de cloreto de magnésio poderia ajudar no aumento da estabilidade de OPV e minimizar a confiança na rede de frio (71).

**Tabela 10: Proporção de perdas do conteúdo de vírus total e meias vidas de vacinas orais contra poliomielite estabilizadas com sacarose e cloreto de magnésio e armazenadas sob várias temperaturas**

Temperatura de armazenagem (°C)	Unidade de tempo	Sacarose		Cloreto de Magnésio	
		Perda de título*	Meia vida	Perda de título*	Meia vida
4	Mês	0.11	6 meses	0.22	20 meses
20-25	Dia	0.03	12 dias	0.01	23.1 dias
37	Dia	0.15	1.9	0.16	1.8 dias
45	Dia	-	-	0.61	0.6 dias

\* Unidade mostrada por vez, em  $\log_{10}$  CCID<sub>50</sub>.

*Fonte: Peetermans JH, Colinet G (117).*

Em um estudo em colaboração com a OMS utilizando 46 amostras, 12 estabilizadas com sacarose e as outras com MgCl<sub>2</sub>, 83% daquelas estabilizadas com sacarose e 91% estabilizadas com MgCl<sub>2</sub>, perderam menos que 0.5  $\log_{10}$  CCID<sub>50</sub> em incubação por 48 horas a 37°C. A média de perda foi de 0.34  $\log_{10}$  CCID<sub>50</sub>, independente do estabilizador (157). O tamponamento com sacarose pode evidentemente também ser um eficiente estabilizador com o controle cuidadoso do pH.

O poliovírus pode também ser estabilizado contra a inativação pelo calor pela adição de ácidos gordurosos e componentes relacionados. A incubação da vacina de poliovírus tipo 1 Sabin com ácido mirístico a 45°C por 30 minutos causou uma redução de infectividade de 19%, enquanto que a incubação sem este ácido gorduroso resultou em uma perda de 99% de infectividade (36). A estabilização térmica foi também observada quando o poliovírus foi incubado com ácidos hexanóico, octanóide ou palmítico. A presença desses estabilizantes durante a exposição ao calor pode prevenir mudanças de conformação na cápsula que envolve o vírus não infectivo.

A água pesada (D<sub>2</sub>O) também tem um efeito estabilizante nos poliovírus. Com suas fortes ligações de hidrogênio elas podem proteger a proteína contra a desnaturação e aumentar a termoestabilidade das cepas de poliovírus. A infectividade de três cepas de OPV tratadas com D<sub>2</sub>O- e MgCl<sub>2</sub>- expostas a 37°C por sete dias permaneceu dentro dos limites requeridos, por exemplo, elas não perderam mais que 0.5  $\log_{10}$  CCID<sub>50</sub> (166). A despeito do aumento dramático na estabilidade da OPV ao calor quando a água pesada foi substituída por água não pesada, este universo de pesquisa não teve continuidade, principalmente por causa das seguintes razões:

- As OPV disponíveis são suficientemente estáveis ao calor para alcançar seus propósitos de erradicação da poliomielite;
- Seria desvantagem o licenciamento e introdução de uma nova OPV durante o progresso de erradicação da poliomielite;
- O VVMs agora são usados para monitorar a exposição ao calor em frascos individuais de OPV.

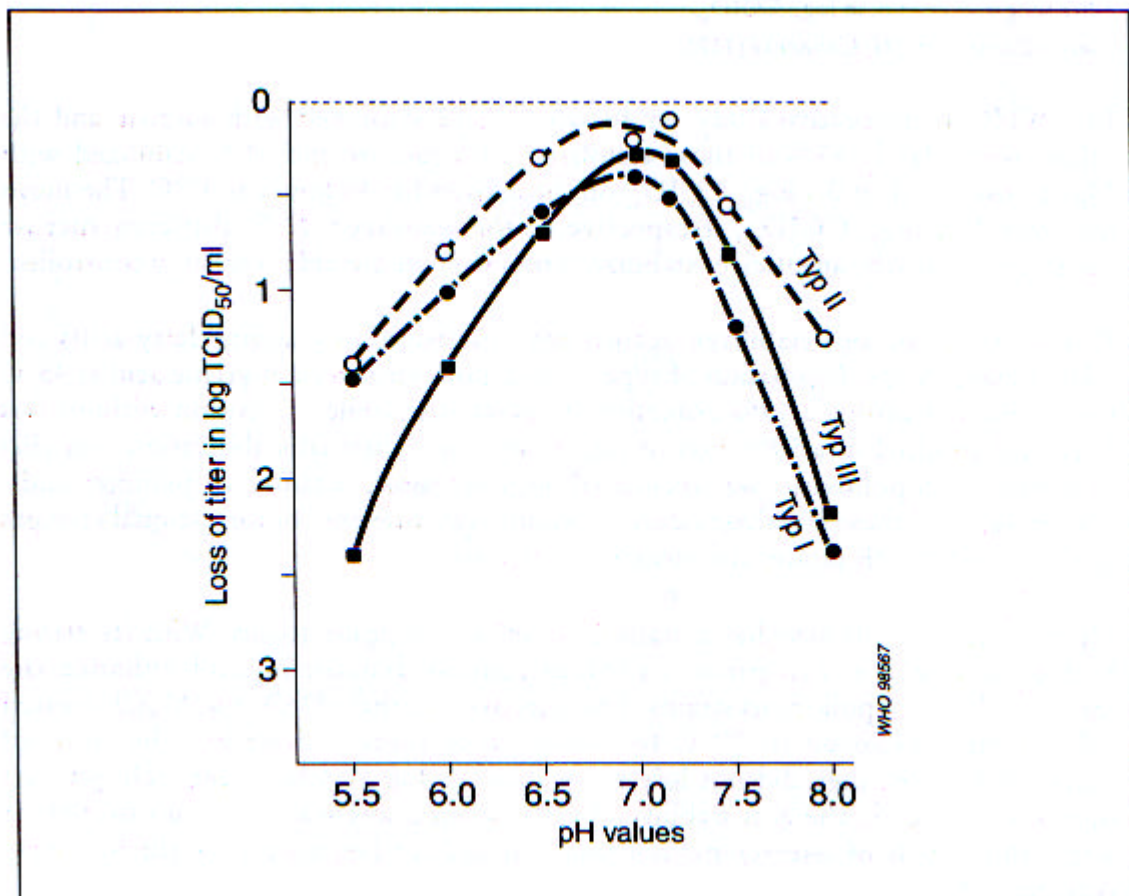
### ***10.5.3. Os valores do pH em suspensões de vírus***

Melnick e Wallis mostraram a importância dos valores de pH em manter a estabilidade da OPV (105). Os valores aumentaram em todas as vacinas testadas, porém em um grau muito

maior de frascos não tamponados. Nos frascos tamponados de vacinas com um pH inicial de 6.0-6.4 manifestou-se uma perda não significativa de infectividade após 20 dias sob 25-28°C, a queda de titulação apenas de 0.1-0.2 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub>. Amostras de frascos não tamponados perderam suas infectividades rapidamente, evidentemente devido a um aumento no pH.

Observações similares foram feitas por Mauler e Gruschkau, o qual estudou vacinas monovalentes contra poliomielite com valores de pH na faixa de 5.5 a 8.0. Após três dias sob 37°C, as mais altas perdas foram encontradas nos valores extremos de pH de 5.5 e 8.0 (Figura 14) (101). As vacinas contra poliomielite foram marcadamente estáveis dentro de uma faixa de pH de 6.5-7.2.

**Figura 14. Efeito do pH na estabilidade de poliovírus atenuados a 37°C por três dias**



**Fonte:** Mauler R, Gruschkau H (101).

Uma vacina pode ser mantida nesta faixa de pH com prevenção da perda de dióxido de carbono do conteúdo de bicarbonato da vacina, mantendo-se um mínimo de espaço de ar sobre a vacina, e embalando-se a vacina em containers fechados.

### 10.6. Sumário

A OPV, como fornecida pela maioria dos fabricantes é estável um período extenso a -20°C, por cerca de seis meses sob 2°C a 8°C, e por cerca de 48 horas a 37°C. Os VVMs auxiliam no acompanhamento da condução das limitações desta vacina quanto a termoestabilidade.



## Parte III

# Análise da estabilidade da vacina – outras vacinais virais

### 11. Vacina inativada contra poliomielite

A capacidade do poliovírus em produzir anticorpos neutralizantes é destruída pelo tratamento pelo calor, liofilização e pela adição de merthiolate (thiomersal). Como mencionado previamente, o componente poliovírus de uma vacina quádrupla DTP-pólio não foi estável quando o merthiolate foi usado como preservativo. Beale e Ungar (13) demonstraram uma rápida queda na potência do antígeno poliovírus na vacina quádrupla preservada com merthiolate e sódio e armazenada a 4°C. Um outro lote de vacina quádrupla sem merthiolate porém com a metade da quantidade de sódio foi estável por um ano. Estas observações foram recentemente confirmadas com a vacina inativada contra poliomielite de alta potência (eIPV), a qual foi combinada com a vacina DTP. A armazenagem de eIPV a 4°C na presença de merthiolate reduz a potência do antígeno poliovírus tipo 1 a níveis indetectáveis após quatro a seis meses. Os antígenos tipo 2 e tipo 3 são menos afetados pela exposição ao merthiolate por oito meses a 4°C (126). A incompatibilidade das vacinas eIPV e DTP preservadas com merthiolate requer maiores estudos.

Parece que existem diferenças na estabilidade ao calor entre vários tipos inativados de poliovírus, com o tipo 1 sendo o mais vulnerável. Na ausência de preservativo, o componente tipo 1 de vacinas trivalentes inativadas contra poliomielite (IPV) deteriora-se lentamente após armazenagem por dois anos a 4°C, enquanto que os dois outros tipos permanecem potentes por 20 anos. O conteúdo antígeno-D para o tipo 1 cai significativamente após 20 dias a 24°C e é indetectável após exposição a 32°C pelo mesmo período; não são observadas mudanças significantes para o tipo 2 nestas duas temperaturas; o tipo 3 permanece estável por 20 dias a 24°C porém o conteúdo antígeno-D cai significativamente a 32°C (110).

Todos os três tipos de IPV mostram retenção satisfatória de potência quando incorporados a vacinas combinadas e armazenados a 4°C por períodos dentro de uma faixa de um ano a quatro anos. Estas observações foram feitas na vacina DP-pólio preservada com cloreto de benzalcônio e adsorvidas em hidróxido de alumínio (110), e na vacina DTP-pólio adsorvida em fosfato de alumínio sem preservativo ou com fenoxietanol e formaldeído como preservativos (146). A armazenagem mais longa resultou em um declínio na antigenicidade, especialmente do componente tipo 1 (110).

À 37°C o conteúdo antígeno-D do componente poliomielite de uma vacina quádrupla decresceu durante a armazenagem, porém a maior parte da potência permaneceu durante após oito semanas. O tipo 3 parece ser o componente mais estável (146).

### 12. Vacina contra caxumba

A estabilidade de ambos os componentes da vacina liofilizada contra sarampo e caxumba são similares a 4°C, 23°C, 37°C e 45°C. A 37°C, a taxa de degradação é em torno de 0.01 log<sub>10</sub> por dia para ambos os componentes. As meias vidas são similares: 4.7 e 5.4 dias para os componentes sarampo e caxumba respectivamente a 45°C; 12 e 13 dias a 37°C, e 71 e 65 dias a 23°C (31).

Na faixa de temperatura de 20°C a 56°C, o componente caxumba na vacina caxumba-rubéola e vacinas MMR tem taxas de degradação comparável àquela para a vacina monovalente contra caxumba (102). O componente caxumba nas vacinas MMR indianas mostram boa estabilidade a 37°C até 21 dias; durante uma exposição de 30 dias a 37°C, o componente caxumba das vacinas MMR perdem 0.9 log<sub>10</sub>, por exemplo, 0.03 log<sub>10</sub> por dia e as meias vidas foram em torno de 10 dias (73).

### **13. Vacina contra rubéola**

A vacina monovalente liofilizada contra rubéola e o componente rubéola da vacina contra sarampo e rubéola, e as vacinas MMR contra caxumba-rubéola mostram baixas taxas de degradação. A 37°C a quantidade de perda de titulação situa-se na faixa de 0.046 a 0.109 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> por semana (102). O componente rubéola da vacina MMR indiana também mostra boa estabilidade, a quantidade de títulos perdidos por semana sendo em torno de 0.1 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> e a meia vida sendo mais que duas semanas (73). O componente rubéola parece ser mais estável que os outros componentes da vacinas de vírus combinados.

Os Requisitos de termoestabilidade da OMS para vacinas contra caxumba e rubéola são similares àqueles para a vacina contra o sarampo. No mínimo três containers de vacina monovalente ou MMR são testados pela incubação a 37°C por sete dias, ao final dos quais cada vacina monovalente ou componente individual é tratado em PFUs (unidade em forma de placas) ou CCID<sub>50</sub> após neutralização seletiva, quando necessário, dos outros componentes. A média geométrica de títulos de vírus infectantes deve igualar ou exceder o número mínimo requerido de unidades infectivas por dose humana (3 log<sub>10</sub>), e a média geométrica de título de vírus não deve ter diminuído mais que 1 log<sub>10</sub> de unidades infectivas durante a incubação (153).

### **14. Vacina contra Hepatite A**

O isolamento e adaptação do vírus da hepatite A em cultura de célula abriu o caminho para o desenvolvimento de vacinas. Colônias de vírus da hepatite A, multiplicados em cultura celular, são clarificadas, purificadas e concentradas e então inativados pelo formaldeído. O hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio é usado como adjuvante.

Os testes de degradação acelerada são realizados nos lotes de vacinas na liberação e após armazenagem de 15 meses em um refrigerador, não indica perda de imunogenicidade a 37°C por até três semanas (116). A vacina contra a hepatite A mantida por uma semana a 37°C produz uma resposta imune em pessoas soronegativas, as quais não diferem significativamente daquela induzida pela vacina armazenada apropriadamente (163).

### **15. Vacina contra encefalite japonesa**

#### **15.1. Vacina liofilizada**

No presente momento, dois tipos de vacinas contra encefalite japonesa inativadas por formalina (JE) estão em uso. Um, derivado de cérebro de camundongos, é usado na Índia, Japão, república da Korea, Tailândia e outros países. O outro é derivado de cultura de célula primária de rim de hamster e é usado na China.

A vacina JE liofilizada produzida na Índia é estável, perdendo potência de apenas 4.7% em 52 semanas a 4°C e de 8.7% em 28 semanas a 22°C. A degradação é mais rápida sob temperaturas mais altas: a potência declina em torno de 14% e 24% durante 18 semanas a 37°C e 40°C, respectivamente (58).

## **15.2. A vacina reconstituída**

Após a reconstituição, a vacina é ainda estável a 22°C. Existe uma queda de 1% após duas semanas e ocorre uma rápida deterioração na sua potência em quatro semanas a 37°C e 40°C (58).

## **16. Vacina contra raiva**

A solução para o problema de segurança da vacina contra a raiva está no desenvolvimento das vacinas preparadas a partir de vírus da raiva crescidos em cultura celular livre de tecido neural (123). Desde 1976, o uso de vacina celular diplóide humana (HDCV) tem se tornado geral para a imunização de humanos em casos de pré- e pós-exposição. A vacina HDCV leva a uma resposta imune muito melhor que vacinas como a DEV (preparada de vírus propagado em ovos embrionados de patos), ou vacinas preparadas de cérebro de cobaias (Vacina Fuenzalida) ou carneiros adultos ou cérebros de coelhos (Vacina Semple).

A HDCV em sua forma liofilizada é uma vacina muito estável; retém sua potência por no mínimo 24 meses a temperaturas entre 2°C e 8°C e por um mês a 37°C (112). Uma outra vacina HDCV mostrou-se estável por pelo menos 18 meses a -20°C e +4°C, e resistiu a exposição a 37°C e 60°C por três meses (97). Uma vacina de cepa celular liofilizada diplóide humana contra a raiva que foi despachada, transportada e armazenada a 26-36°C por até 11 semanas, estimulou resposta de anticorpo em profissionais da saúde do Paquistão similar àquela produzida pela vacina Hdcv transportada e armazenada a 2-13°C (111).

A vacina diplóide humana contra a raiva é de produção difícil e de custo elevado. Tem havido esforços em todo o mundo no sentido de se produzir vacinas a um custo baixo que possa aumentar os níveis de segurança e eficácia semelhantes a HDCV (123). As novas vacinas incluem: a vacina purificada de embrião de galinha (PCEV) desenvolvida no Instituto Chiron, Alemanha (formalmente Behringwerke), a qual foi estável por três meses a 37°C (14); vacina de células primárias de rim de hamster sírio (PHK), desenvolvida no Instituto de Poliomielite em Moscou, Federação Russa e usada na China; a vacina da linha celular Vero (PVRV) desenvolvida no Instituto Pasteur-Merieux-Connaught, França. A vacina purificada de embrião de pato (PDEV) desenvolvida no Instituto de Soro e Vacina na Suíça. Todas parecem ter uma estabilidade muito melhor que as formas de vacinas preparadas em tecido nervoso.

## Parte IV

# Análise da estabilidade da vacina – outras vacinas bacterianas

### 17. Vacina polissacarídica antimeningocócica

Os polissacarídeos purificados, e especialmente o grupo A, são instáveis a temperaturas ambientes em virtude da despolimerização. Os antígenos polissacarídicos rapidamente se despolimerizam e suas massas moleculares relativas diminuem quando são expostas a temperaturas ambientes. O grau de polimerização é, desta forma, um indicador útil para se alcançar tanto a imunogenicidade como a estabilidade térmica.

O armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi recomendado para as recentes vacinas polissacarídicas no grupo A. Nesta temperatura, a taxa de despolimerização é desprezível. A imunogenicidade da vacina antimeningocócica é relacionada ao tamanho molecular dos antígenos de proteção, polissacarídeos A e C. A resposta anticorpo aumenta com o peso molecular. A descoberta de que a substituição do cloreto de sódio pela lactose como um menstruo (líquido dissolvente) para liofilização estabiliza as vacinas polissacarídicas contra a despolimerização térmica, representou um passo maior em direção a vacinas mais estáveis (143, 151). Estas vacinas são fornecidas na forma liofilizada. A adição de um estabilizante e a obtenção de um conteúdo de pouca quantidade tem aumentado muito sua estabilidade térmica.

As vacinas estabilizadas antimeningocócicas no estado liofilizado podem ser armazenadas a temperaturas de refrigeradores por duas semanas (8, 9). A vacina polissacarídica A não foi afetada pela sua manutenção em uma faixa de temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$  por 12 dias ou a  $35^{\circ}\text{C}$  por 3 dias (9). A vacina do grupo A+C de um fabricante, armazenada a  $22^{\circ}\text{C}$  por 18 meses, mostrou muito pouca despolimerização; a  $45^{\circ}\text{C}$  o componente do grupo A atingiu um nível crítico de despolimerização após 4 semanas, enquanto que o componente do grupo C foi estável por 8-10 semanas (8).

Uma vacina reconstituída com diluente contendo fenol a 0.25% foi relatada como estável quando armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por dois meses, a  $4^{\circ}\text{C}$  por quatro semanas, a  $25^{\circ}\text{C}$  por duas semanas, ou a  $37^{\circ}\text{C}$  por quatro dias (8). Apesar de sua estabilidade relativa, a vacina reconstituída deve ser mantida em temperaturas de refrigeração e devem ser descartadas se não forem usadas durante o dia em que se der sua reconstituição (151).

### 18. Vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b

A estabilidade de vacinas polissacarídicas conjugadas, incluindo a contra o *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), pode depender do impacto de fatores adversos sobre a força de ligação entre o polissacarídeo e a proteína transportadora. Embora existam poucos dados sobre estas vacinas, preliminarmente os resultados sugerem que a vacina Hib liofilizada (vacina de toxóide tetânico conjugado contendo polissacarídeo capsular polirribosil-ribitol-fostato, PRP-T) é estável sob temperaturas de refrigerador por 36 meses e a  $25^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 24 meses. A vacina Hib monovalente reconstituída ou a vacina Hib combinada reconstituída com outras vacinas (DTP, DTP-HB, ou DTP-IPV) deve ser destruída após uma sessão de imunização ou dentro de seis horas. As vacinas líquidas Hib monovalente

ou Hib-DTP são estáveis sob temperaturas de refrigeradores por 24 meses. Em formulação multidose, as vacinas líquidas Hib e Hib-DTP podem ser usadas em uma sessão subsequente, considerando que elas tenham sido abertas, de acordo com a Determinação da Política da OMS sobre o uso de frascos abertos de vacina em sessões subsequentes de imunização (161).

## **19. Vacina contra tifoide**

No passado, as vacinas antitifoídicas de células parenterais mortas completas, foram largamente usadas, porém elas freqüentemente causavam dor local, edema, febre cefaléia e mal estar.

Nos anos mais recentes, três vacinas antitifoídicas vêm sendo usadas: vacina conjugada parenteral com proteína transportadora de polissacarídeo Vi, vacina oral de cepas de *Salmonella typhi* vivas, e vacina oral de células inteiras inativadas (88).

A vacina de polissacarídeo Vi é altamente estável e não requer a rede de frio quando em condições tropicais. Esta é uma vantagem distinta desta vacina.

A vacina oral viva contém o Ty21, um mutante da *S. Typhi*, e deve ser armazenada a +4°C. A vida completa da vacina liofilizada é dependente do conteúdo da pouca umidade residual e manutenção da rede de frio. Provavelmente a metade dos erros em viajantes americanos foram devido a armazenagem imprópria (32). As falhas da vacina em viajantes suíços têm sido associadas com a vacina que não foi mantida em estado refrigerado (67). A armazenagem prolongada em temperatura ambiente resultou em uma quantia viável progressivamente mais baixa, embora todos os lotes testados após armazenagem por sete dias entre 20°C e 25°C satisfaziam os Requisitos de potência. Três lotes de vacina armazenados a 37°C por 12 horas também mantiveram a potência (32).

## **20. Vacina contra cólera**

Embora as vacinas parenterais anticólera mortas não sejam recomendadas pela OMS para qualquer pessoa de qualquer idade, elas ainda estão disponíveis comercialmente em muitos países.

Recentemente, um vacina oral combinada de células inteiras mortas com subunidades (vacina WC/BS) tem sido desenvolvida no sentido de estimular a resposta imune da mucosa intestinal local de maneira similar àquela induzida pela exposição natural (127). Os Requisitos de armazenagem para vacina oral morta são similares àqueles necessários para as vacinas de formas parenterais (a vacina é estável por três anos quando mantida em refrigerador em uma faixa de temperatura de 2°C a 8°C).

Uma outra, desenvolvida recentemente, é a vacina oral viva CVD103 HgR. Em virtude de tratar-se de vacina de cepa livre, a viabilidade da bactéria deve ser preservada enquanto estiver armazenada, sendo necessário, portanto, uma rede de frio efetiva.

# Parte V

## Conclusões finais

A estabilidade das vacinas varia consideravelmente. Elas podem ser classificadas pelas suas resistências ao armazenamento à temperaturas elevadas, com os toxóides contra difteria e tétano e a vacina contra hepatite B mostrando a mais alta estabilidade, a vacina liofilizada contra o sarampo, febre amarela e BCG ocupando a posição média e a vacina oral contra poliomielite sendo a mais frágil. Vacinas contra o sarampo reconstituídas, febre amarela e tuberculose (BCG) são instáveis; elas devem ser usadas tão logo quanto possível após reconstituição, serem mantidas em cuba com gelo durante a sessão de imunização e devem ser descartadas ao final da sessão.

Os dados apresentados mostram que algumas vacinas podem permanecer por um longo período de exposição sem uma perda significativa de potência. A alta resistência do toxóide tetânico e da vacina contra a hepatite B ao calor pode corroborar os estudos sobre o uso dessas vacinas sem refrigeração. Elas podem reter potência suficiente durante exposição de curtos espaços ao calor quando usadas em programas de campo para imunização de mulheres em idade fértil contra o tétano ou para imunizar crianças contra a hepatite em áreas onde a rede de frio não pode ser mantida.

No presente, existem três relatórios sobre o uso do toxóide tetânico e a vacina contra hepatite B fora da rede de frio, sem refrigeração. Um estudo foi realizado na Indonésia com um dispositivo de injeção pré-abastecido e mono-uso, “UniJet”. O dispositivo foi armazenado a temperatura ambiente por até um mês em residências de parteiras. O estudo mostrou que as parteiras usaram o dispositivo apropriadamente e seguramente ao administrar a vacina contra a hepatite B em recém-nascidos e o toxóide tetânico em suas mães. As mulheres vacinadas e as parteiras expressaram uma forte preferência pelo dispositivo de uso único sobre a seringa padrão (140).

Em um estudo feito na Bolívia, a aceitabilidade do UniJet, pré-abastecido com toxóide tetânico e mantido pelas parteiras em suas casas sem refrigeração, também foi muito alta. O dispositivo não requer qualquer montagem, elimina os passos de abastecimento da seringa e ajuste da dose de vacina e não requer gelo ou armazenamento em containers frios. Com sua habilidade em promover segurança, simplicidade logística e reduzir as taxas de desperdícios, o dispositivo representa uma estratégia potencial de custo-benefício para imunização em trabalho de campo (108). Na China, a taxa de soroconversão em infantes imunizados pelas parteiras das vilas com vacina contra a hepatite B armazenada sem refrigeração não difere significativamente da taxa observada nas crianças imunizadas pelos médicos com a vacina armazenada em refrigeração (7).

Entretanto, cada exposição à temperatura elevada resulta em alguma degradação da vacina, a potência que permanece é ainda acima do nível considerado como a potência mínima imunizante. Além do mais, cada exposição à temperatura ambiente tem um impacto cumulativo na potência da vacina. As vacinas nas unidades de saúde da periferia não podem permanecer sob as temperaturas mencionadas acima se suas potências já estiverem comprometidas por defeitos prévios na rede de frio. Os dados apresentados podem ser de utilidade para os que se envolvem em atividades de imunização no nível central e de

unidade de saúde que têm que tomar decisões sobre vacinas expostas a temperaturas elevadas.

Todas as vacinas deveriam ser rotineiramente armazenadas em temperaturas recomendadas pelos fabricantes e os programas nacionais de imunização. A rede de frio permanece como o ponto mais vulnerável para esses programas em países em desenvolvimento com clima tropical. Os países desenvolvidos com clima temperado podem ter problemas similares. Em todos os países, os sistemas de refrigeração, o monitoramento da temperatura e o registro de manutenção são requeridos para se certificar de que cada frasco de vacina é mantido sob condições apropriadas e que é usado antes de expirar a data contida como validade.

Um resumo de informações sobre a estabilidade de vacinas armazenadas sob várias temperaturas é apresentado nas tabelas seguintes.

# Parte VI

## Referências

1. **Abou-Zeid C et al.** Effect of the method of preparation of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine on the properties of four daughter strains. *Journal of applied bacteriology*, 1987, **63**: 449-453.
2. **Aleksandrowicz J et al.** Heat stability of potency of bacterial vaccines and tetanus antitoxins. *Przeglad epidemiologiczny*, 1990, **44**: 333-335.
3. **Aleksandrowicz J et al.** Evaluation of the physico-chemical state of aluminium hydroxide in biopreparations stored at various conditions. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*, 1990, **42**: 163-170.
4. **Allison LMC et al.** An accelerated stability test procedure for lyophilized measles vaccines. *Journal of biological standardization*, 1981, **9**: 185-194.
5. **Andre FE.** Thermodegradation of lyophilized measles vaccine. *Reviews of infectious diseases*, 1983, **5**: 532-534.
6. **Andrescu V et al.** Influence of temperature on the stability of pertussis vaccine. *Archives Roumaines de pathologies experimentales et de rnicrobiologie*, 1985, **44**: 283-292.
7. **Anonymous.** Hepatitis B vaccine delivery outside the cold chain: the Long-An County, China, example. *Global perspective on hepatitis*, 1991, **2**: 3, (Newsletter of the International Task Force on Hepatitis B and the Programme for Appropriate Technology in Health [PATH]), copy available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.
8. **Arickx M et al.** Analysis of a bivalent meningococcal vaccine (A+C). II. Stability. *Annales de la societe Belge de medecine tropicale*, 1979, **59**: 267-277.
9. **Artenstein MS.** Meningococcal infections. 4. Stability of group A and group C polysaccharide vaccines. *Bulletin of the World Health Organization*, 1971, **45**: 287-290.
10. **Arya SC.** Stability of oral polio vaccine at different temperatures. *Vaccine*, 1988, **6**: 298.
11. **Balazs D et al.** Stability of the Romanian dried BCG vaccine in different conditions of storage. *Development in biological standardization*, 1986, **58**: 173-177.
12. **Barme M, Bronnert C.** Thermostabilisation du vaccin antiamaril 17D lyophilisé. I. Essai de substances protectrices. *Journal of biological standardization*, 1984, **12**: 435-442.
13. **Barme M et al.** Thermostabilisation du vaccin antiamaril liD lyophilisé. II. Lots-pilots préparés dans les conditions d'une production industrielle. *Journal of biological standardization*, 1987, **15**: 67-72.
14. **Barth R et al.** Purified chicken embryo cell rabies vaccine for human use. *Lancet*, 1983, : 700



15. **Beale J.** In: *Report of an informal working group on the production and testing of pertussis vaccines.* Geneva, World Health Organization, 1978 (unpublished document BLG/UNDP/PERT 78.1, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
16. **Beale AJ, Ungar J.** Potency and stability of combined pertussis, diphtheria, tetanus and poliomyelitis (quadruple) vaccine. *Lancet*, 1962, **2**: 805-808.
17. **Beauchamp J, Mansoor O.** Temperature and the storage of vaccines. *New Zealand medical journal*, 1992, **105**: 135.
18. **Begum A et al.** Stability of oral polio vaccine at different temperatures. *Pakistan journal of medical research*, 1993, **32**: 273-274.
19. **Bhargava I.** Control of measles, mumps and rubella. Churchill Livingstone, New Delhi, 1996.
20. **Bhushan K et al.** Freeze dried BCG vaccine sealed in presence of nitrogen. *Indian journal of medical research*, 1975, **63**: 1335-1343.
21. **Bishai DM et al.** Vaccine storage practices in pediatric offices. *Pediatrics*, 1992, **89**: 193-196.
22. **Boll GK, Barron I, de la Sierra L.** Estabilidad a temperatura de la vacuna antipoliomielitica de virus atenuados elaborados en el Instituto Nacional de Virologia. *Salud publica de Mexico*, 1979, **21**: 263.
23. **Briggs H, Ilett S.** Weak link in vaccine cold chain. *British medical journal*, 1993, **306**: 557-558.
24. **Bunch Christensen K.** *The thermostability of different BCG products.* Geneva, World Health Organization, 1981 (unpublished document WHO/Tb/81.118, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
25. **Burfoot C, Yound PA, Finter NB.** The thermal stability of a stabilized 17D yellow fever virus vaccine. *Journal of biological standardization*, 1977, **5**: 173-179.
26. **Canadjija I.** *Stability testing of pertussis vaccines prepared from different B.pertussis strains.* Geneva, World Health Organization, 1979 (unpublished document BLG/PRT/79.16, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
27. **Cheriyian E.** Monitoring the vaccine cold chain. *Archives of disease in childhood*, 1993, **69**: 600-601.
28. **Cheyne J.** Vaccine delivery management. *Reviews of infectious diseases*, 1989, **11** (Suppl. 3): S617-S622.
29. **Cohen H, Bos JM.** The influence of storage at 37°C on the potency of freeze dried and reconstituted live measles vaccine. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines.* Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 95-101.

30. **Cohen H, van Ramshorst JD, Tasman A.** Consistency in potency assay of tetanus toxoid in mice. *Bulletin of the World Health Organization*, 1959, **20**: 1133-1150.
31. **Colinet C, Rossignol J, Peetermans J.** A study of the stability of a bivalent measles-mumps vaccine. *Journal of biological standardization*, 1982, **10**: 341-346.
32. **Cryz SJ.** Post-marketing experience with live oral Ty2Ia vaccine. *Lancet*, 1993, **341**: 49 - 50.
33. **Csizer Z, Zsidai J, Joo I.** Factors influencing the stability of acid-precipitated polyvalent Bordetella pertussis bulk suspensions. *Acta microbiologica academiae scientiarum Hungaricae*, 1975, **22**: 83-93.
34. **Csizer A, Zsidai J, Jon I.** Stability of the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccines. suspensions. *Acta microbiologica academiae scientiarum Hungaricae*, 1978, **25**: 1-9.
35. **Deivanayagam N et al.** Potency of oral polio vaccine stored at distribution centres in Madras. *Indian journal of paediatrics*, 1990, **57**: 757-761.
36. **Dorval BL, Chow M, Klibanov AM.** Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochemical and biophysical research communications*, 1989, **159**: 1177-1183.
37. **Durand JP et al.** Etude de la stabilité d'un nouveau vaccin amaril iD thermostable. *Journal of biological standardization*, 1988, **16**: 1-7.
38. **Edsall G et al.** Significance of the loss of potency in the pertussis component of certain lots of "quadruple antigen". *New England journal of medicine*, 1962, **267**: 687-689.
39. **Evans M, Pope M.** Vaccine handling and storage in general practice. *Health trends*, 1995, **27**: 124-126.
40. **Expanded Programme on Immunization.** Freezing and thawing in the maintenance of vaccine potency, Geneva, World Health Organization, *Weekly epidemiological record*, 1977, **52**: 119.
41. **Expanded Programme on Immunization.** Heat stability of vaccines Geneva, World Health Organization, *Weekly epidemiological record*, 1980, **55**: 252- 256.
42. **Expanded Programme on Immunization.** The effects of freezing on the appearance, potency and toxicity of adsorbed and unadsorbed DTP vaccines, Geneva, World Health Organization, *Weekly epidemiological record*, 1980, **55**: 385-389 and 396-398.
43. **Expanded Programme on Immunization.** Cold chain evaluation. Tunisia. *Weekly epidemiological record*, 1984, **59**: 157-160.
44. **Expanded Programme on Immunization:** Heat stability of pertussis vaccine. Yugoslavia. *Weekly epidemiological record*, 1985, **60**: 300 -301.
45. **Expanded Programme on Immunization.** *Manage the cold chain system. Training module for mid-level managers.* Geneva, World Health Organization, 1985 (revised edition).

46. **Expanded Programme on Immunization.** Cold chain evaluation. Nepal. *Weekly epidemiological record*, 1988, **63**: 60-62.
47. **Expanded Programme on Immunization.** Cold chain evaluation. India *Weekly epidemiological record*, 1988, **63**: 193-196
48. **Expanded Programme on Immunization.** Heat stability of poliovirus and measles vaccines. Poland. *Weekly epidemiological record*, 1988, **63**: 349-352.
49. **Expanded Programme on Immunization.** Stability of oral polio vaccine after repeated freezing and thawing, Geneva, World Health Organization, *Weekly epidemiological record*, 1990, **65**: 207-210.
50. **Expanded Programme on Immunization.** Tests of the freezing point of vaccines. *Cold chain newsletter*, 1990, 90.3: 5.
51. **Expanded Programme on Immunization.** EPI information system. *Global summary*. Geneva, World Health Organization, 1996 (unpublished document WHO/EPI/CEIS/96.07, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
52. **Finter NB et al.** Effects of adverse storage on live virus vaccines. *Developments in biological standardization*, 1978, **41**: 271-276.
53. **Freudenstein H.** Successful stabilization of BCG vaccines in ampoules sealed under protective gas. *Journal of biological standardization*, 1978, **6**: 243-253.
54. **Galazka A.** *Stability of vaccines*. Geneva, World Health Organization, 1989 (unpublished document WHO/EPI/GEN/89.O8, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
55. **Georges AJ et al.** Thermostability and efficacy in the field of a new, stabilized yellow fever virus vaccine. *Vaccine*, 1985, **3**: 313-315.
56. Gheorghui M, Kosloff F, Dé Rudder J. Étude de la thermostabilité du vaccin BCG intradermique lyophilisé (Souche de L'Institut Pasteur). *Progress in immunological standardization*, 1972, 5: 437-661.
57. **Gheorghui M, Lagrange PH.** Viability, heat stability and immunogenicity of four BCG vaccines prepared from four different BCG strains. *Annales d'immunologie (Institut Pasteur)*, 1983, **134 C**: 125-167
58. **Gowal D et al.** Thermostability of Japanese encephalitis vaccine produced in India. *Biologicals*, 1990, **19**: 37-40.
59. **Gray A.** Stability of measles vaccine. *Development in biological standardization*, 1978, **41**: 265-266.
60. **Gupta RK et al.** The effect of different inactivating agents on the potency, toxicity and stability of pertussis vaccine. *Journal of biological standardization*, 1987, **15**: 87-98.
61. **Gupta RK et al.** Effects of elevated temperatures on the opacity and toxicity of pertussis vaccine manufactured with different inactivating agents. *Vaccine*, 1986, **4**:185-190.

62. **Hanjeet K et al.** Evaluation of cold chain monitoring in Kelabtan, Malaysia. *Bulletin of the World Health Organization*, 1996, **74**: 391-397.
63. **Haworth EA et al.** Is the cold chain for vaccines maintained in general practice? *British medical journal*, 1993, **307**: 242-244.
64. **Henzell MC.** Handling and storage of vaccines in Bay of Plenty general practices. *Communicable diseases*, New Zealand, 1992, **92**: 65.
65. **Heyman DL et al.** Further field testing of the more heat-stable measles vaccines in Cameroon. *British medical journal*, 1982, **285**: 531-533.
66. **Heyman DL et al.** Field trials of a heat stable measles vaccine in Cameroon. *British medical journal*, 1979, **2**: 99-100.
67. **Hirschel B et al.** Inefficacy of the commercial live oral typhoid vaccine in the prevention of typhoid fever. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 1985, **4**: 295-298.
68. **Hunter S.** Storage of vaccines in general practice. *British medical journal*, 1989, **299**: 661-662
69. **Ikic D et al.** Testing of stability of freeze dried and fluid pertussis vaccines. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 205-212.
70. **Ikic D et al.** Thermostability of live freeze-dried measles vaccine after reconstitution. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 103-112.
71. **Institute of Medicine, Washington DC.** *Workshop on temperature-stable vaccines for developing countries: significance and development strategies*, 13-14 April 1987.
72. **Ishak R, Howard CR.** The thermal stability of yellow fever vaccines. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1990, **85**: 339-345.
73. **Jadhav SS.** Direct information, 1997.
74. **Janaszek W.** Evaluation of thermostability of lyophilized BCG vaccines with a test of an accelerated thermal degradation. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*, 1991, **43**: 43-49.
75. **Janaszek W.** The comparative assays of BCG vaccines of Polish, Danish and Japanese production - laboratory tests. *Przeglad epidemiologiczny*, 1994, **48**: 285-292.
76. **Jeremijenko A et al.** Improving vaccine storage in general practice refrigerators. *British medical journal*, 1996, **312**: 1651-1652.
77. **Joo I, Csizer Z, Zsidai J.** Stability of pertussis vaccines and the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis vaccines. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 181-188.
78. **Just M, Berger R.** Immunogenicity of a heat treated recombinant DNA hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 1988, **6**: 399-400.

79. **Kendrick P et al.** A study of the stability of pertussis vaccine under different conditions of storage. *American journal of public health*, 1955, **45**: 1131-1137.
80. **Kindt H et al.** Stability of DTP vaccine. *Journal of biological standardization*, 1974, **2**: 183-187.
81. **Kohl D.** *Thermostability profile of pediatric vaccines used in the EPI frame*. Kuala Lumpur, 1990 (presented at a meeting on vaccine thermostability).
82. **Kreeftenberg JG.** *Results of investigations regarding the stability of pertussis vaccine lot 86 of the Rijksinstituut voor de Volksgezondheid*. Geneva, World Health Organization, 1979 (unpublished document WHO BLG/PRT/79.16, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
83. **Kreeftenberg JG.** Personal communication, 1989.
84. **Krugman RD et al.** Impotency of live virus vaccines as a result of improper handling in clinical practice. *Journal of pediatrics*, 1974, **85**: 512-514.
85. **Kumar V et al.** Studies on the stability of tetanus and pertussis components of DTP vaccines on exposure to different temperatures. *Indian journal of pathology and microbiology*, 1982, **25**: 50-54.
86. **Ladefoged A.** Personal communication, 1989.
87. **Landi S et al.** Effect of light on freeze-dried BCG vaccines. *Journal of biological standardization*, 1977, **5**: 321-326.
88. **Levine MM.** Typhoid fever vaccines. Chapter in: *Vaccines*, eds. SA Plotkin, EA Mortimer, II ed. W. Saunders, Philadelphia, 1994, 597-631.
89. **Lerman SJ, Gold E.** Measles in children previously vaccinated against measles. *Journal of American Medical Association*, 1991, **216**: 1311-1314.
90. **Liddle JLM, Harris MF.** How general practitioners store vaccines. A survey in south-western Sydney. *The medical journal of Australia*, 1995, **162**: 366-368.
91. **Lloyd JS.** Storage of vaccines. *Post Graduate Doctor — Middle East (the journal of prevention, diagnosis and treatment)*, 1984, February: 110-120, copy available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.
92. **Lugosi L.** Multiple comparison of dried BCG vaccines: stability at 37°C and persistence of strains in the mouse spleen. *Vaccine*, 1984, **2**: 149-156.
93. **Lugosi L, Battersby A.** Transport and storage of vaccines in Hungary: the first cold chain monitor study in Europe. *Bulletin of the World Health Organization*, 1990, **68**: 431-439.
94. **Magdzik W.** Thermal conditions of storage and transport of vaccines. *Przeegląd epidemiologiczny*, 1987, **41**: 335-342.

95. **Magrath DI.** Factors affecting the storage life of oral poliovaccine. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines.* Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 35-44.
96. **Magrath DI.** Direct information.
97. **Majer M et al.** A purified human diploid cell rabies vaccine. *Developments in biological standardization*, 1978, **40**: 25-28.
98. **Mann GF, Allison LM, Zuckerman AJ.** *Stability of poliovirus vaccines.* Manuscript, 1985, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.
98. **Mann GF, Zuckerman AJ.** *Design of a routine test for the thermal stability of poliomyelitis vaccine (oral).* Manuscript, 1985.
100. Mann GF et al. Stability of further-attenuated measles vaccine. *Reviews of infectious diseases*, 1983, **5**: 482-486.
101. **Mauler R, Gruschkau H.** On stability of oral poliovirus vaccines. *Developments in biological standardization*, 1978, **41**: 267-270.
102. **McAleer WJ et al.** Stability on storage at various temperatures of live measles, mumps and rubella virus vaccines in new stabilizer. *Journal of biological standardization*, 1980, **8**: 281-287.
103. **Mehta JM.** Personal communication, 1996.
104. **Melnick JL et al.** Immunogenic potency of MgCl<sub>2</sub> stabilized oral poliovaccine. *Journal of American Medical Association*, 1963, **185**: 406-408.
105. **Melnick JL, Wallis C.** Effect of pH on thermal stabilization of oral poliovirus vaccine by magnesium chloride. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 1963, **112**: 894-897.
106. **Menon PS et al.** Field trial on frozen and thawed tetanus toxoid. *Indian Journal of medical research*, 1976, **64**: 25-32.
107. **Miller NC, Harris MF.** Are childhood immunization programmes in Australia at risk? Investigation of the cold chain in the Northern Territory. *Bulletin of the World Health Organization*, 1994, **72**: 401-408.
108. **Ministry of Health, Bolivia, Pan American Health Organization, Program for Appropriate Technology for Health.** *Evaluation of Unijet prefilled syringe for outreach tetanus immunization in Bolivia*, June 1996, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.
109. **Mirchamsy H et al.** Stabilizing effect of magnesium chloride and sucrose on Sabin live polio vaccine. *Developments in biological standardization*, 1978, **41**: 255-257.
110. **Moynihan M, Petersen I.** The durability of inactivated poliovirus vaccine: studies on the stability of potency in vivo and in vitro. *Journal of biological standardization*, 1982, **10**: 261-268.

111. **Nicholson KG et al.** Stability of human diploid-cell-strain rabies vaccine at high ambient temperatures. *Lancet*, 1983, **1**: 916-918.
112. **Nicolas AJ et al.** Production of inactivated rabies vaccine for human use on WI38 diploid cells. Results of potency tests. Stability of the vaccine in liquid and freeze-dried forms. *Developments in biological standardization*, 1978, **40**: 17-24.
113. **Olson BH, Eldering C, Graham B.** Stabilization of pertussis vaccine in the presence of benzethonium chloride. *Journal of bacteriology*, 1964, **87**: 543-546.
114. **Patriarca PA et al.** Randomized trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil. *Lancet*, 1988, **1**: 429-432.
115. **Patriarca PA, Wright PF, John TJ.** Factors affecting the immunogenicity of oral poliovirus vaccine in developing countries: review. *Reviews of infectious diseases*, 1991, **13**: 926-939.
116. **Peetermans J.** Production, quality control and characterization of an inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine*, 1992 **10 (Suppl. 1)**: 599-5101.
117. **Peetermans JH, Colinet G.** Production, control and stability of live poliovirus vaccine. *Proceedings of Smith Kline-RIT Symposium on Potency and Efficacy of Vaccines*. Manila, February 1980.
118. **Peetermans J, Colinet C, Stephenne J.** Activity of attenuated poliomyelitis and measles vaccines exposed at different temperatures. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 61-65.
119. **Peetermans J et al.** Stability of freeze dried and reconstituted measles vaccines. *Developments in biological standardization*, 1978, **41**: 259-264.
120. **Perkins FT.** The need for stable vaccines in the developing countries. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 23-31.
121. **Perkins FT, Magrath DI.** *The potency of stabilized oral poliovaccines*. Stockholm, European Poliomyelitis Association, 9th Symposium, 1962, 371-375.
122. **Pittman M.** Instability of pertussis vaccine component in quadruple antigen vaccine. *Journal of American Medical Association*, 1962, **181**: 25-30.
123. **Plotkin SA, Koprowski H.** Rabies vaccines, chapter in: *Vaccines*, eds. SA Plotkin, EA Mortimer, II ed., WB Saunders, Philadelphia, 1994, 649-670.
124. **Rao YU, William J, Kalyanaraman VR.** A study of the stability of the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccines. *Journal of biological standardization*, 1985, **13**: 267-270.
125. **Robin Y et al.** Étude de la thermostabilité du vaccin anti-amaril sur des échantillons de huit lots provenant de divers pays. *Bulletin of the World Health Organization*, 1971, **44**: 729-737.
126. **Roche JC et al.** Comparative clinical study of a new 17D thermostable yellow fever

- vaccine. *Vaccine*, 1986 **4**:163-165.
127. **Sack DA, Cadoz M.** Cholera vaccines, chapter in *Vaccines, eds.* SA Plotkin, EA Mortimer, II ed. WB Saunders Philadelphia, 1994, 635 —647.
  128. **Sawyer LA et al.** Deleterious effect of thiomersal on the potency of inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine*, 1994, **12**: 851-856.
  129. **Sekhyis VM, Freudenstein H, Sirks JL.** Report on results of a collaborative assay of BCG vaccines organized by the International Association of Biological Standardization *Journal of biological standardization*, 1977, **5**: 85-109.
  130. **Shmelyova EI.** Study of stability of physical properties and biological activity of liquid and freeze dried adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccines. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines.* Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 159-179.
  131. **Simba DO, Msamanga GI.** Use of cold chain to assess vaccine exposure to adverse temperatures in rural Tanzania. *East African medical journal*, 1994, **71**: 445-446.
  132. **Sokhey J et al.** Stability of polio vaccine at different temperatures, *Vaccine*, 1988, **6**:12-13.
  133. **Sood DK et al.** Study on the stability of 17D-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. *Vaccine*, 1993, **11**: 1124-1128.
  134. **de Souza Lopez O et al.** Studies on yellow fever vaccine. II. Stability of the reconstituted product. *Journal of biological standardization*, 1988, **16**: 71-76.
  135. **Sporzynska Z.** Studies on the stability of toxoids. I. The effect of temperature on the immunogenic properties of diphtheria toxoid. *Experimental medicine and microbiology*, 1965, **17**: 130-139.
  136. **Stainer DW, Hart FE.** The stability of bacterial vaccines at elevated temperatures. *Developments in biological standardization*, 1978, **41**: 249-253.
  137. **Stainer DW, Lansi S.** Stability of BCG vaccines. *Developments in biological standardization*, 1986, **58**: 119-125.
  138. **Steinmetz N et al.** Storage conditions of live measles, mumps and rubella virus vaccines in Montreal. *Canadian medical association journal* 1983, **128**: 162-163.
  139. **Sudarshan MK et al.** An evaluation of cold chain system for vaccines in Bangalore. *Indian journal of paediatrics*, 1994, **61**: 173-178.
  140. **Suntano A, Suarnawa IM, Nelson CM et al.** Home delivery of heat-stable vaccines in Indonesia: outreach immunization with a prefilled, single-use injection device. *Accepted for Bulletin of the World Health Organization.*
  141. **Ten Dam HG et al.** Present knowledge of immunization against tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 1976, **54**: 255-269.
  142. **Thakker Y, Woods S.** Storage of vaccines in the community: weak link in the cold chain? *British medical journal*, 1992, **304**: 756-758.



143. **Tiesjema RH, Beuvery EC, Pas BJ.** Enhanced stability of meningococcal polysaccharide vaccines by using lactose as a menstruum for lyophilization. *Bulletin of the World Health Organization*, 1977, **55**: 43-48.
144. **Tydeman MS, Kirkwood TBL.** Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards. I. Properties of maximum likelihood estimators. *Journal of biological standardization*, 1984, **12**: 195-206.
145. **Van Damme P et al.** Heat stability of a recombinant DNA hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 1992, **10**: 366-367.
146. **Van Ramshorst JD, van Wezel AL.** The stability of the components of quadruple (DTP polio) vaccines. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 189-195.
147. **Wallis C, Melnick JL.** Stabilization of poliovirus by cations. *Texas reports on biology and medicine*, 1961, **19**: 683.
148. **WHO.** Yellow fever vaccines. Thermostability of freeze dried vaccines. *Weekly epidemiological record*, 1987, **62**: 181-183.
149. **WHO.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for diphtheria toxoid, pertussis vaccine, tetanus toxoid, and combined vaccines*. Geneva, World Health Organization, 1979 (Technical Report Series, No. **638**: 60-80).
150. **WHO.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Revised Requirements for dried BCG vaccine*. Geneva, World Health Organization, 1979 (Technical Report Series, No. **638**: 116-147).
151. **WHO.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine*. Geneva, World Health Organization, 1981 (Technical Report Series, No. **658**: 174-184).
152. **WHO.** Report of Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-second report. Requirement for measles vaccine (live). Addendum 1981, Geneva, World Health Organization, 1982 (Technical Report Series no. 673, Annex 6).
153. **WHO.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccines (live)*. Geneva, World Health Organization, 1994 (Technical Report Series, No. **840**: Annex 39).
154. **WHO.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for dried 3CC vaccine*. Geneva, World Health Organization, 1987 (Technical Report Series, No. **745**: 60-92).
155. **WHO.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for yellow fever vaccine*. Geneva, World Health Organization, 1988 (Technical Report Series, No. **771**: 208-209).
156. **WHO.** Vaccine supply and quality. Surveillance of adverse events following immunization. *Weekly epidemiological record*, 1996, **71**: 237—242.
157. **WHO.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Investigation of the thermal stability of current oral poliovirus vaccines*. Preliminary summary of results.

- Geneva, World Health Organization, 1989 (unpublished document BS/89.1614, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
158. **WHO.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for poliomyelitis vaccine (oral).* Geneva, World Health Organization, 1990 (Technical Report Series, No. **800**: 30-86).
  159. **WHO.** *List of approved laboratories.* Geneva, World Health Organization, 1995 (Technical Report Series)
  160. **WHO.** *Policy statement on the use of opened vials of vaccine in subsequent immunization sessions.* Geneva, World Health Organization, 1995 (unpublished document WHO/EPL/LHIS/95.01, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
  161. **WHO.** *Performance specification E6/IN5.* Geneva, World Health Organization, 1997 (unpublished document WHO/EPI/LHIS/97~03, available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
  162. **Wiedermann G et al.** Thermostability of an inactivated hepatitis A vaccine stored at 37°C for one week. *Journal of medical virology*, 1994, **44**: 442.
  163. **Wojciak W, Wolska E.** Some physico-chemical changes of the adsorbent used in the diphtheria toxoid-vaccine appearing on its prolonged storage (in Polish). *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*, 1962, **14**: 331-337.
  164. **Wojciak W, Woiska E.** Effect of storage on the adsorbent of the combined diphtheria-tetanus prophylactic (in Polish). *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*, 1963, **15**: 133-139.
  165. **Wright D, Muggleton PW.** Evaluation of the stability of dried BCG vaccine. *Tubercle*, 1972, **53**: 92-99.
  166. **Wu R et al.** Thermostabilization of live virus vaccines by heavy water (D<sub>2</sub>O). *Vaccine*, 1995, **13**: 1058-1063.

## **Anexo:**

### **Tabelas de resumo de estabilidade de vacina**

**Tabela A: Estabilidade de vacinas comumente usadas em programas nacionais de imunização**

Vacina <sup>1</sup>	Temperatura de armazenamento (°C)			
	0-8	22-25	35-37	Acima de 37
Toxóides tetânico e diftérico como vacinas monovalentes ou como componentes de vacinas combinadas <sup>2</sup>	Estável por 3-7 anos	Estável por meses	Estável por semanas	A 45°C: estável por 2 semanas; A 53°C: perda de potência após poucos dias; A 60-65°C: perda de potência após poucas horas
Vacina contra hepatite B <sup>2</sup>	Estável por 2-4 anos	Estável por meses	Estável por semanas	A 45°C: estável por dias.
Vacina contra o sarampo <sup>3</sup>	Estável por 2 anos	Retém potência satisfatória, até 50%, por no mínimo 1 mês.	Retém potência satisfatória de no mínimo uma semana, porém pode perder 20% e 50% de potência por 1-4 dias e 2-6 dias de exposição, respectivamente.	A 41°C: perde 50% da potência após 2-3 dias de exposição; A 54°C: perde 80% da potência após um dia de exposição.
Vacina contra a febre amarela <sup>3</sup>	A vacina estabilizada é estável por 2 a 3 anos	Perde 50% da potência após 3-10 meses de exposição	50% de perda após 10-20 dias de exposição.	
Vacina contra pertussis <sup>2</sup>	Estável por 18-24 meses, a despeito da queda de potência lenta e contínua.	A estabilidade varia: algumas vacinas são estáveis por 2 semanas.	A estabilidade varia, algumas vacinas perdem 50% de potência durante o armazenamento por uma semana.	A 45°C: perda em torno de 10% da potência por dia; A 50°C: perda rápida da potência
Vacina BCG <sup>3</sup>	Estável por um ano	A estabilidade varia: 20% a 30% de perda da viabilidade durante 3 meses de exposição.	A estabilidade varia: 20% de perda de viabilidade durante 3-14 dias de exposição.	Instável. A 70°C: 50% de perda durante 30 minutos de exposição.
Vacina oral contra poliomielite <sup>3</sup>	Estável por 6-12 meses.	Algumas vacinas podem reter títulos por 1-2 semanas de exposição.	Instável. VVMs em uso. Perda considerável de título em 1-3 dias.	Muito instável. A 41°C: perda de 50% em um dia. A 50°C: perda considerável de título após 1-3 horas de exposição.

1. Os dados referem-se a vacina liofilizada contra o sarampo, febre amarela e BCG; outras vacinas são apresentadas em forma líquida. Vacinas reconstituídas perdem suas potências rapidamente e elas devem ser descartadas ao final de uma sessão de imunização. A vacina BCG reconstituída não contém agente bacteriostático e existe risco de contaminação. A vacina contra a febre amarela reconstituída deve ser administrada rapidamente (em até uma hora) a pós reconstituição. Se a vacina puder ser mantida continuamente em cuba com gelo, a vacina reconstituída pode ser usada durante toda uma sessão de imunização. Deve ser descartada após a sessão.

2. Vacinas adsorvidas em sais de alumínio. Elas nunca devem ser congeladas.

3. A temperatura ótima para armazenagem por longos períodos é de -25°C ou menos. O diluente deve ser mantido separadamente e não deve ser congelado.

**Tabela B: Estabilidade de outras vacinas bacterianas e virais**

Vacina <sup>1</sup>	Temperatura de armazenamento (°C)			
	0-8	22-25	35-37	Acima de 37
Vacina inativada contra poliomielite	Estável por 1 a 4 anos	Declínio do conteúdo do antígeno-D <sup>1</sup> do tipo 1 em 20 dias	Perda do conteúdo de antígeno-D do tipo 1 em algumas vacinas	Dados precisos não disponíveis
Vacina polissacarídica antimeningocócica	Estável por 2 anos	Vacina do Grupo A: estável por 12 dias; grupo A+C estável por meses	Meia vida <sup>2</sup> : 4 semanas	Nenhum dado disponível
Vacina contra raiva humana celular diplóide	Estável por 3,5 anos	Imunogenicidade e retida quando despachada, transportada e armazenada por até 11 semanas	Estável por 4 semanas	Nenhum dado disponível
Vacina contra encefalite japonesa	Estável por um ano; em torno de 5% de perda de potência durante 52 semanas de armazenagem	Estável por 20 semanas, em torno de 9% de perda de potência durante 20 semanas de armazenagem	Estável por 6 semanas. Em torno de 14% de perda de potência durante 18 semanas de armazenagem	A 40°C; em torno de 10% de perda de potência após 2 semanas de armazenagem e 27% de perda após 6 semanas de armazenagem
Vacina oral viva antitifoídica Ty21a	Necessita refrigeração. A vida completa depende do conteúdo de umidade residual	A armazenagem prolongada resultou em progressiva queda das colônias viáveis	Rápido decréscimo de colônias viáveis. Retém a mínima potência por 12 horas de exposição	Nenhum dado disponível

1. O conteúdo de antígeno-D é medido *in vitro* pelo teste ELISA. IPV é padronizada em unidades de antígeno-D; a potência alcançada da IPV contém 40, 8 e 32 unidades de antígeno-D por tipos 1, 2 e 3 respectivamente.

2. Meia vida: tempo necessário para ocorrer a perda de 50% da potência original.



O **Programa Global para Vacinas e Imunização**, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde em 1994, define suas metas como “um mundo no qual todas as pessoas sob risco são protegidas contra doenças evitáveis por vacina”. O Programa compreende três unidades:

**Programa Ampliado em Imunização  
Pesquisa e Desenvolvimento de Vacina  
Qualidade e Suprimento de Vacina**

O **Programa Ampliado de Imunização** põe em foco a prevenção de determinadas doenças infantis e, através de apoio aos programas nacionais de imunização, visa o alcance de 90% de cobertura de imunização de crianças nascidas a cada ano. Seus objetivos são erradicar a poliomielite no mundo até o ano 1000, reduzir a incidência de mortes por sarampo, eliminar o tétano neonatal como um problema de saúde pública e introduzir a vacina contra a hepatite B em todos os países.

A **Pesquisa e Desenvolvimento de Vacina** apoia e promove a pesquisa e desenvolvimento associados com a introdução de novas vacinas no Programa Ampliado de Imunização. Isto inclui pesquisas e desenvolvimento de novas vacinas, aprimoramento dos procedimentos de imunização e apoio a estudos epidemiológicos.

A **Qualidade e Suprimento de Vacina** certifica as quantidades adequadas de alta qualidade, disponibilidade de vacinas para todas as crianças do mundo, apoio aos esforços dos governos no sentido de tornarem-se auto-suficientes quanto aos cuidados que suas vacinas necessitam, e assiste na rápida introdução de novas vacinas.

O **Programa Global para Vacinas e Imunização** produz uma gama de documentos, materiais audiovisuais e softwares para disseminar informação sobre suas atividades, política do programa, linha de ação e recomendações. Também fornece materiais para treinamento em grupo e/ou individual a respeito dos tópicos que vão desde o conserto de equipamento do centro de saúde a linha curricular para escolas médicas, escolas de enfermagem e treinamento de pessoal para o controle de qualidade de vacina.

*Para maiores informações por favor contate:*

Programa Global para Vacinas e Imunização  
Organização Mundial de Saúde ♦ CH-1211 Geneva 27 ♦ Switzerland  
Fax: +41 22 791 4192/93 ♦ E-mail: GPV@who.ch