

**MARIA ESTHER DE MAGALHÃES MACHADO TONUS**

**CONTROLE DO ENSAIO DE VIABILIDADE DA VACINA BCG:  
DA OTIMIZAÇÃO À VALIDAÇÃO**

**CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS,  
AMBIENTES E SERVIÇOS VINCULADOS À  
VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

**PPGVS/INCQS  
FIOCRUZ**

**2005**

**MARIA ESTHER DE MAGALHÃES MACHADO TONUS**

**CONTROLE DO ENSAIO DE VIABILIDADE DA VACINA BCG:  
DA OTIMIZAÇÃO À VALIDAÇÃO**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária como requisito parcial à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ.

Orientadora: Marise Sacramento de Magalhães.

Rio de Janeiro

2005

**MARIA ESTHER DE MAGALHÃES MACHADO TONUS**

**CONTROLE DO ENSAIO DE VIABILIDADE DA VACINA BCG:  
DA OTIMIZAÇÃO À VALIDAÇÃO**

Esta monografia foi julgada adequada à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária e aprovada em sua forma final pelo Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ.

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2005.

---

Prof<sup>a</sup>. Marise Sacramento de Magalhães  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

---

Prof. Eduardo Chaves Leal  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Regina Branquinho  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Manuela da Silva (Suplente)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Tonus, Maria Esther de Magalhães Machado; Controle do ensaio de viabilidade da vacina BCG: da otimização à validação / Maria Esther de Magalhães Machado Tonus. Rio de Janeiro: Fiocruz / INCQS, 2005.

xii, 51 f. : il.; tab.

Orientadora: Marise Sacramento de Magalhães

Monografia (especialização) – Fundação Oswaldo Cruz, INCQS, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, 2005.

1. Vacinas. 2. Microbiologia – Monografia. I. Magalhães, Marise Sacramento de. II. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. III. Título.

TONUS, M. E. M. M. 2005. Controle do ensaio de viabilidade da vacina BCG: da otimização à validação. Monografia, Especialização em Vigilância Sanitária, Fiocruz / INCQS, Rio de Janeiro, 51 p.

*À Deus pela delegação de tão importante missão na área da saúde;*

*Ao meu filho e ao meu marido pela paciência nos momentos em que  
foi necessária a minha dedicação ao trabalho;*

*Aos meus pais pela constante disponibilidade em me ajudar.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao INCQS, pela confiança em mim depositada, enquanto profissional.

À Marise Sacramento de Magalhães, pela orientação e pelos importantes conhecimentos transmitidos;

Às colegas de trabalho, Eliana Pereira Duarte, Jandira dos Santos Anselmo e Beatriz Rabinovitch Balassiano pela grandiosa participação no presente trabalho.

À colega Rita Rezende pela atenção e auxílio na formatação do presente trabalho.

Aos meus colegas de turma pelo incentivo, união e cooperação.

## RESUMO

A vacina BCG é a única medida preventiva contra as formas mais graves da tuberculose. A quantidade de bacilos viáveis na vacina é essencial a sua efetividade, e também um instrumento valioso na verificação da uniformidade da produção. A contagem de colônias em meio sólido é recomendada pela Organização Mundial da Saúde para a determinação do número de unidades viáveis do BCG na vacina. Este método é sujeito a variabilidade e baixa reprodutibilidade devido a vários fatores como o meio de cultura usado, os procedimentos e a hidrofobicidade natural da parede celular do BCG que dificulta a dispersão adequada das suspensões da vacina. Este trabalho adotou medidas de controle para otimizar a técnica e reduzir o efeito de variáveis, possibilitando a aplicação de critérios estatísticos para a avaliação de cada ensaio. A análise de variância (qui-quadrado) permitiu verificar a uniformidade do crescimento entre tubos inoculados, sendo o erro amostral a única fonte de variação significativa. A aplicação do teste  $t$  permitiu avaliar as diferenças entre o número de colônias de duas ou três diluições da vacina. A diminuição do número de ensaios rejeitados em decorrência de erro experimental torna-se vantagem devido ao seu elevado custo e prolongada duração do ensaio.

Palavras-chaves: vacina, BCG, contagem, colônias.

## ABSTRACT

The BCG vaccine is the only preventive measure against the most serious forms of tuberculosis. The amount of viable bacilli in the vaccine is essential to its effectiveness, being also an useful instrument to verify uniformity from lot to lot of vaccine produced. The colony counting on solid medium is recommended by the World Health Organization to determine the number of viable units of BCG in the vaccine. This method is subject to high variability and poor reproducibility due to several factors as the culture medium used, the test procedures and the natural hydrophobic BCG cell wall that makes it difficult to obtain well dispersed suspensions of the vaccine. Control measures were evaluated to improve the technique and reduce the effect of variables in order to make possible the application of criteria for the statistical evaluation of each assay. The analysis of variance (qui-square) allowed us to verify that the inoculation and growth have been uniform from container to container with sampling error as the only significant source of variation. The application of test  $t$  allowed the evaluation of differences between two or three dilution levels of vaccine. The decrease in the number of rejected assays by experimental errors means a great benefit considering that it is an expensive and time-consuming technique.

Key words: vaccine, BCG, counting, colony.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Visualização da Pasta BCGCALC.....	17
<b>Figura 2</b> – Visualização da planilha “Cálculo Referência” da Pasta BCGCALCVAl...	22
<b>Figura 3</b> – Visualização da planilha “Qui-ensaio” da Pasta BCGCALCVAl adaptada ao cálculo do $\chi^2$ combinado.....	23
<b>Figura 4</b> – Visualização da planilha “Cálculo Referência” da Pasta BCGCALCVAl adaptada ao cálculo do $\chi^2$ combinado.....	24

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b> - Diluições consideradas inválidas pelo teste do $\chi^2$ quando diferentes operadores empregaram a técnica tradicional para contagem de unidades viáveis de BCG em amostras de vacina.....	26
<b>Tabela 4.2</b> – Diluições consideradas inválidas pelo teste do $\chi^2$ quando diferentes operadores empregaram a técnica modificada buscando a redução do efeito de variáveis nos ensaios de contagem de unidades viáveis de BCG.....	26
<b>Tabela 4.3</b> - Contagens de viáveis consideradas inválidas, por operador, segundo critério do $\chi^2$ , antes e após a introdução das modificações na técnica tradicional.....	27
<b>Tabela 4.4</b> - Índices de invalidação das contagens de viáveis em amostras de vacina segundo o critério do $\chi^2$ e do teste $t$ , considerando-se os esquemas de cálculo baseados nas fórmulas de interpolação (mínimo de 3 diluições válidas) e nas fórmulas limite (mínimo de 2 diluições válidas), aplicados aos resultados fornecidos pela técnica tradicional e pela técnica modificada.....	27
<b>Tabela 4.5</b> - Impacto da aplicação do cálculo baseado em no mínimo três diluições válidas quanto ao $\chi^2$ e teste $t$ em 31 ensaios realizados pela técnica modificada.....	28
<b>Tabela 4.6</b> - Impacto da aplicação do cálculo baseado em no mínimo duas diluições válidas quanto ao $\chi^2$ e teste $t$ em 31 ensaios realizados pela técnica modificada.....	29
<b>Tabela 4.7</b> - Impacto da aplicação do cálculo baseado em no mínimo duas diluições válidas quanto ao $\chi^2$ combinado e teste $t$ em 31 ensaios realizados pela técnica modificada.....	30

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro I</b> – Esquema de preparo das diluições.....	09
<b>Quadro II</b> – Relação de modificações introduzidas na técnica tradicional.....	11

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	x
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 - OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS</b> .....	07
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	08
3.1 - Contagem de unidades viáveis do BCG presentes em amostras de vacina....	08
3.1.1 – Técnica tradicional.....	08
3.1.1.1 - Amostras de vacina.....	08
3.1.1.2 - Vacina de referência.....	08
3.1.1.3 - Meios de cultura utilizados.....	08
3.1.1.4 - Esquema de ensaio.....	09
3.1.2 - Técnica modificada.....	11
3.2 - Cálculo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).....	12
3.2.1 - Cálculo baseado em fórmulas de interpolação.....	12
3.2.1.1 - Descrição dos cálculos.....	12
3.2.1.2 - Critérios estatísticos para validação dos ensaios.....	14
3.2.1.3 - Pasta de cálculo BCGCALC.....	16
3.2.2 - Cálculo baseado em fórmulas limites.....	18
3.2.2.1 - Descrição dos cálculos.....	18
3.2.2.2 - Critérios estatísticos para validação dos ensaios.....	19
3.2.2.3 - Pasta de cálculo BCGCALCVAL.....	22
3.2.2.4 - Pasta de cálculo BCGCALCVAL adaptada ao cálculo do $\chi^2$ combinado....	23

3.3 - Descrição das avaliações realizadas.....	24
3.4 - Fonte de consulta dos ensaios incluídos no estudo.....	25
<b>4 – RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>7 – PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO A - MEIOS DE CULTURA: COMPOSIÇÃO E PREPARO.....</b>	<b>48</b>

## 1- INTRODUÇÃO

O BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) vem sendo utilizado na prevenção da tuberculose desde 1921, quando foi realizada em Paris a primeira vacinação em humanos. A cepa foi obtida a partir do *Mycobacterium bovis* isolado por Nocard em 1902 (LUGOSI, 1992).

Após 1928, quando a Liga das Nações aceitou oficialmente o BCG como cepa vacinal, sua produção foi bastante ampliada em laboratórios de diferentes países, onde a aplicação de variados processos de manutenção do bacilo e da produção da vacina implicaram em variações genóticas e fenotípicas resultando em diversidade de subcepas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993).

Apesar das instruções e recomendações de Calmette e Guérin, a falta de uniformização na fabricação e o aumento do número de passagens do bacilo acarretaram a redução dos níveis de virulência residual e conseqüentemente perda da eficácia original (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993; 2003).

Visando controlar essa diversificação crescente, o sistema de lote semente foi adotado em 1956, e a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1966, publicou a primeira série de requerimentos para a vacina liofilizada e vem, desde então, buscando incentivar a produção de vacinas com o menor número possível de subcepas, recomendando a padronização dos sistemas produtivos e de controle da qualidade das vacinas, sobretudo com atenção especial à caracterização molecular das subcepas (MILSTIEN; GIBSON, 1990; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1966; 2003).

Apesar do crescente avanço tecnológico na área de produção de imunobiológicos, a vacina BCG liofilizada clássica persiste como o principal recurso na prevenção da tuberculose.

A despeito de sua ação controversa e dos questionamentos quanto a sua aplicação em alguns países, estudos demonstraram que, com os mais altos índices de eficácia contra as formas mais graves da tuberculose - 80 a 90% para tuberculose disseminada e 52 a 60% contra a meningite tuberculosa – a vacina é capaz de prevenir formas da doença que dependam da dispersão hematogena do bacilo, principalmente em crianças. No Brasil, onde é empregada a subcepa Moreau, estudos relataram a eficácia protetora de 74% a 89% contra meningite tuberculosa (MILSTIEN; GIBSON, 1990).

A ação da vacina BCG é equivalente àquela da infecção natural pelos bacilos virulentos, induzindo resistência mediada por células, sobretudo graças à ação de macrófagos ativados. Desta forma é reduzido o risco de desenvolvimento imediato da doença ou de sua reativação, porém não é impedida a ocorrência de infecção primária. A real proteção será proporcionada somente por meio de uma vacina que, funcionando ao nível do trato respiratório, impeça a reinfecção exógena, prevenindo a instalação, no organismo, do bacilo oriundo do ambiente (MILSTIEN; GIBSON, 1990; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993).

A vacina empregada no Brasil é obtida pela técnica convencional de cultura do BCG na superfície de meio líquido Sauton. Após o período de incubação, os véus são coletados, pesados e a massa bacteriana triturada por meio de esferas de aço inoxidável. A suspensão final é obtida, por adição de glutamato de sódio a 2%, de acordo com a massa bacteriana pesada. A porcentagem de unidades viáveis ou partículas bacterianas cultiváveis é então determinada, havendo a queda adicional decorrente do processo de liofilização.

Esta forma clássica de obtenção da vacina oferece várias desvantagens tanto sob o aspecto da eficácia do produto final, como também sob o aspecto do controle de sua qualidade. As características deste processo de produção conferem heterogeneidade às preparações com relação ao estado de agregação dos bacilos, ou seja, variação do número e tamanho de grumos presentes nas suspensões de vacina (LUGOSI, 1992). De

fato, segundo STAVRI e colaboradores (STAVRI et al, 1974), o número de unidades viáveis é bastante variável até mesmo entre ampolas de uma mesma série de liofilização.

Existem parâmetros difíceis de serem controlados, como a dependência entre o peso dos véus coletados e a superfície de exposição do recipiente – aspecto inerente à aerobiose – a idade das culturas, a precisão da medição do peso semi-seco da massa bacteriana coletada e a proporção desta com a quantidade e dimensão das esferas, a forma do recipiente triturador e a velocidade e tempo de homogeneização (BROWN; BROWN, 1982).

A OMS reúne em sua Série de Requerimentos Técnicos para Vacina BCG Liofilizada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987) critérios mínimos necessários ao adequado controle da qualidade do produto, e que garantem a sua segurança e eficácia. O documento fornece indicações quanto ao controle da viabilidade do BCG, termoestabilidade, sensibilização tuberculínica em cobaias, e segurança quanto a esterilidade bacteriana e fúngica, presença de micobactéria virulenta e extensão de reações cutâneas em animais (virulência residual). No entanto, estes parâmetros são em geral tratados de forma isolada, sem que sejam rotineiramente correlacionados à avaliações de eficácia e segurança dos lotes de produto em uso no campo (LUGOSI, 1992; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993). Portanto, a carência de instruções quanto a este tipo de averiguação, gera a heterogeneidade nas avaliações epidemiológicas acarretando menor conhecimento da real eficiência dos produtos em humanos, principalmente quando aplicados em diferentes condições.

A abordagem deste tema em um encontro de especialistas da OMS em Londres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2003), demonstra a necessidade de providências neste âmbito uma vez que recomenda a revisão dos atuais requerimentos, levando-se em conta não apenas a atualização das metodologias e dos padrões, mas também a condução de estudos clínicos referentes a eficácia e segurança das vacinas disponíveis.



O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde (INCQS), na qualidade de laboratório oficial, vem realizando desde 1984, o controle da qualidade da totalidade dos lotes de vacina BCG de uso intradérmico (BCG - ID) utilizados no programa nacional de imunizações mantido pelo Ministério da Saúde. O fornecimento de subsídios técnicos às ações da Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações (CGPNI), garante assim a distribuição e utilização de lotes do produto que atendam às especificações previstas pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2000) e pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987) para o produto final.

Avaliações e orientações complementares são também solicitadas ao INCQS, pela CGPNI em resposta às demandas das Secretarias Estaduais de Saúde, buscando sanar questões oriundas do campo, como por exemplo, eventuais falhas no sistema de refrigeração quando o produto pode ser exposto a temperaturas que extrapolam os limites recomendados, ou ainda qualquer observação feita pelo pessoal responsável pela aplicação direta do produto na população.

Cabe mencionar que o INCQS deve ainda, quando consultado, prover a Farmacopéia Brasileira das informações técnicas relativas e características da vacina BCG - ID, colaborando assim para a atualização da monografia farmacopeica do produto, como também para o aprimoramento e adequação das técnicas de controle da qualidade.

Atualmente, além das avaliações relacionadas diretamente à segurança do produto, o ensaio de contagem de unidades viáveis do BCG permanece sendo realizado lote a lote do produto, apesar da adoção, no INCQS, do controle amostral aleatório de outros produtos imunobiológicos também analisados no controle nacional. Isto porque ainda não foi demonstrada a consistência da produção nacional com relação à viabilidade do BCG no produto final.

Apesar da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977), indicar os princípios para a realização do ensaio de contagem de unidades viáveis de BCG em meio

sólido, não fornece, na referida publicação, o detalhamento técnico necessário à redução do efeito de variáveis de forma a permitir a adoção dos critérios estatísticos recomendados para a validação dos ensaios. Mesmo assim a técnica permanece sendo oficialmente recomendada.

A escassez de literatura atualizada demonstra uma certa tendência ao abandono das tentativas do aprimoramento desta técnica, talvez pelas dificuldades na redução de sua variabilidade.

De fato, apesar da avaliação do número de unidades viáveis constituir o controle que mais fornece informações com respeito à viabilidade do produto e de sua estabilidade, sendo sua importância reconhecida, as técnicas laboratoriais disponíveis, e mesmo os padrões empregados, não oferecem a precisão necessária, sendo as avaliações estatísticas dificilmente aplicáveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2003; 2004).

O fato de inexistir, até o presente, ensaios laboratoriais que indiquem diretamente a eficácia protetora da vacina, a estratégia adotada pela OMS tem sido a avaliação deste parâmetro, por meio de estudos clínicos, das diferentes preparações do BCG cuja segurança e as características “in vitro” já tenham sido constatadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993).

Este fato demonstra a importância do objeto do presente estudo, pois a avaliação da viabilidade do BCG na vacina, como produto final, é fundamental, visto ser o número de viáveis o principal indicador da consistência de produção e manutenção das características originais das preparações. Considerando ser a contagem de unidades viáveis por cultivo em meio sólido, o único método disponível, e oficialmente recomendado, para a obtenção de tais dados, justificam-se os investimentos que visam o aprimoramento e validação dos procedimentos de ensaio.

Portanto, buscando a adequação dos procedimentos de ensaio como resposta às exigências cada vez mais rígidas do sistema da qualidade, a equipe do controle da vacina BCG no INCQS pretende aprimorar e aumentar o nível de precisão da técnica de contagem de unidades viáveis do BCG presentes nas amostras de vacina.

Para tal, faz-se necessária a realização de avaliações preliminares relativas à influência de diferentes fatores incluídos nos procedimentos, identificando, reduzindo e/ou controlando o efeito de variáveis, avaliando assim o impacto da introdução de critérios estatísticos necessários à validação dos ensaios.

## 2 – OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1 - Avaliar aspectos práticos inerentes à técnica, estabelecendo condições específicas para a realização do ensaio de contagem de unidades viáveis de BCG em amostras de vacina de forma a reduzir os efeitos de variáveis na precisão dos resultados, visando a implementação da validação estatística dos ensaios:

2.1.1 - Avaliar o impacto da adoção do teste do  $\chi^2$  como critério estatístico preliminar de validação do ensaio realizado segundo técnica tradicional;

2.1.2 - Adaptar a técnica tradicional, buscando a redução do efeito de variáveis nas diferentes etapas do ensaio;

2.1.3 - Avaliar o impacto da adoção do teste do  $\chi^2$  como critério estatístico preliminar de validação do ensaio realizado pela técnica modificada, segundo item anteriormente descrito;

2.1.4 - Avaliar o impacto da adoção do teste  $t$  para validação do ensaio realizado pela técnica modificada, segundo item anteriormente descrito.

2.2 - Avaliar o impacto da análise combinada dos valores de  $\chi^2$  obtidos em um mesmo ensaio, seguida da avaliação da significância entre os diferentes níveis de diluição de cada amostra incluída no ensaio;

2.3 - Avaliar o impacto da substituição das fórmulas de interpolação pelas fórmulas limite para o cálculo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) de vacina BCG com posterior aplicação do teste do  $\chi^2$  e teste  $t$ .

2.4 - Informatizar o cálculo, a validação e a interpretação dos resultados dos ensaios de contagem de UFC/mL conforme conclusão do estudo do impacto da introdução de critérios estatísticos de validação dos ensaios.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 - Contagem de unidades viáveis do BCG presentes em amostras de vacina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977):

3.1.1 - Técnica tradicional:

Foi utilizada a técnica tradicional que consiste na reconstituição de amostras de vacina liofilizada, diluição, inoculação em meio de cultura sólido e contagem de colônias, após 4 semanas de incubação a 37 +/- 1 °C.

3.1.1.1 – Amostras de Vacina:

Foram empregadas amostras de vacina BCG liofilizada preparada com a subcepa Moreau - RJ.

3.1.1.2 – Vacina de Referência

Foi utilizada a vacina de referência de trabalho BRABCG003, também preparada com BCG da subcepa Moreau – RJ. Uma amostra desta preparação foi incluída em cada um dos ensaios avaliados.

3.1.1.3 - Meios de cultura utilizados:

- a) Meio líquido Sauton ¼: foi empregado para diluição das amostras reconstituídas de vacina. A composição e o modo de preparo encontram-se descritos no Anexo A;
- b) Meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ): foi empregado como substrato para o cultivo das unidades viáveis presentes nos volumes inoculados de cada diluição da vacina citadas em 3.1.1.1.

O meio foi preparado a partir de base comercial Merck® para meio de LJ, acrescida de glicerol e de suspensão de ovos batidos, distribuído em volumes de 15 mL em tubos de ensaio 25 x 200 mm providos de rolhas de gaze e coagulado por 45 minutos a 85 °C. A composição e o modo de preparo encontram-se descritos no Anexo A.

#### 3.1.1.4 - Esquema de ensaio:

a) Aleatorização dos tubos segundo o lote de LJ: os tubos com LJ utilizados em cada ensaio foram preparados em um único procedimento de preparo de meio. A tomada de cada tubo de LJ foi feita de forma aleatória em relação às diferentes partidas de coagulação que compunham cada lote de meio originado de um mesmo procedimento de preparo, de forma a evitar que os tubos destinados ao ensaio de uma mesma amostra fossem todos provenientes da mesma partida de coagulação;

b) Reconstituição das amostras: cada ampola de vacina em análise foi reconstituída (rehidratada) adicionando-se o volume de diluente indicado pelo fabricante e homogeneizando-se manualmente até que a suspensão adquirisse aspecto homogêneo;

c) Diluição das amostras: foram preparadas 03 diluições de cada uma das vacinas utilizando-se fator de diluição 2 (Quadro I).

O diluente – Meio Sauton  $\frac{1}{4}$  - foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL por meio de dispensador automático para volumes de 99 mL, e em tubos 18 x 180 mm, por meio de pipetas sorológicas de 5 mL e 10 mL para volumes de 4, 6 e 14 mL.

**Quadro I** - Esquema de preparo das diluições:

<i>Diluição</i>	<i>Proporções</i>
1/100	1 mL da vacina reconstituída + 99 mL de diluente
1/10000	1 mL da diluição 1/100 + 99 mL de diluente
1/20000	4 mL da diluição 1/10000 + 4 mL de diluente
1/40000	2 mL da diluição 1/10000 + 6 mL de diluente
1/80000	2 ml da diluição 1/10000 + 14 mL de diluente

A tomada do volume inicial de 1 mL da amostra a ser diluída e a passagem dos volumes para preparo das diluições seriadas foram feitas por meio de pipetas sorológicas de 1 mL e de 5 mL.

A homogeneização da amostra a ser diluída para tomada do volume inicial e dos volumes entre cada diluição foi realizada manualmente e por tempo indefinido;

d) Número de tubos por amostra de vacina: foram utilizados 20 tubos contendo LJ para a inoculação de cada amostra de vacina, de forma que as duas primeiras diluições foram inoculadas em 05 tubos cada uma e a terceira em 10 tubos;

e) Codificação dos tubos: cada uma das séries de 20 tubos foram codificadas segundo as seqüências numéricas extraídas da tabela estatística de aleatoriedade e dispostas em modelo padronizado de formulário de ensaio;

f) Inoculação das diluições: cada tubo codificado contendo LJ foi inoculado com 0,1 mL de cada diluição por meio de pipeta sorológica de 1 mL. O volume de inóculo foi distribuído uniformemente por toda a superfície do meio, sendo os tubos mantidos na posição horizontal e ao abrigo da luz, ligeiramente inclinados com a base inoculada voltada para cima, durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Os tubos foram então colocados na posição vertical, vedados com rolhas de silicone parafinadas e aquecidas em chama e, posteriormente, incubados a 37 +/- 1 °C ao abrigo da luz durante 4 semanas;

g) Contagem das colônias: as colônias características do BCG, de aspecto rugoso, espreado e esbranquiçadas (sem pigmentação) foram contadas com o auxílio de lente de aumento. As contagens superiores a 100 colônias foram desprezadas.

### 3.1.2 - Técnica modificada:

A técnica tradicional descrita em 3.1.1 foi modificada conforme descrito no quadro a seguir, visando avaliar a redução do efeito de variáveis relacionadas ao operador, ao sistema de homogeneização das suspensões e ao material volumétrico empregado nas dosagens.

**Quadro II** – Relação de modificações introduzidas na técnica tradicional:

Parâmetro	Técnica tradicional	Técnica modificada
Operador com relação às etapas de reconstituição/diluição e inoculação em tubos com LJ	A etapa de reconstituição/diluição e a etapa de inoculação de uma mesma amostra foram realizadas por técnicos diferentes	A etapa de reconstituição/diluição e a etapa de inoculação de uma mesma amostra foram realizadas pelo mesmo técnico
Tipo de recipiente empregado para preparo do “pool” de amostra reconstituída	Tubo 18 x 180 mm	Erlenmeyer de 25 mL
Tipo de recipiente empregado para preparo das diluições	Tubo 18 x 180 mm	Erlenmeyer de 25 mL
Distribuição do diluente – meio líquido Sauton ¼	Dispensador automático para volumes de 99 mL e pipeta sorológica para volumes menores	Pipeta automática de repetição calibrada



**Quadro II (continuação)** – Relação de modificações introduzidas na técnica tradicional:

Parâmetro	Técnica tradicional	Técnica modificada
Rinsagem de pipetas	Indefinido	Estabelecimento de 03 rinsagens da pipeta e/ou ponteira no momento da tomada do volume a ser diluído e da tomada do volume a ser inoculado;
Homogeneização da amostra reconstituída	Manual com movimentos padronizados, por tempo indefinido	Manual com movimentos padronizados por período fixo de 1 minuto
Homogeneização durante o preparo das diluições	Manual com movimentos padronizados, por tempo indefinido	Manual com movimentos padronizados por período fixo de 1 minuto
Homogeneização das diluições antes da tomada dos volumes a serem inoculados	Manual com movimentos padronizados por tempo indefinido	Manual com movimentos padronizados por período fixo de 1 minuto
Inoculação dos volumes de 0,1 mL das diluições nos tubos com LJ	Pipeta sorológica de 1 mL	Pipeta automática de repetição calibrada e provida de ponteiras descartáveis

### 3.2 – Cálculo do número de UFC/mL (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977)

#### 3.2.1 – Cálculo baseado em fórmulas de interpolação (3 diluições):

##### 3.2.1.1 – Descrição dos cálculos:

O cálculo dos números de UFC/mL foram realizados de acordo com as seguintes etapas:

- a) as médias ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ) dos números de colônias foram calculadas para cada diluição. Para tal, somou-se os números de colônias contados em cada um dos tubos inoculados com uma mesma diluição e dividiu-se pelo número de tubos que compunha a diluição;
- b) os valores acumulados foram calculados aplicando-se as seguintes fórmulas:

Diluição	Média	Valor acumulado das médias
$d_1$	$x_1$	$x_1 + x_2 + 2x_3$
$d_2$	$x_2$	$x_2 + 2x_3$
$d_3$	$x_3$	$2x_3$

Onde:  $d_1$  = preparação menos diluída;

$d_2$  = diluição intermediária;

$d_3$  = preparação mais diluída;

$x_1$  = média de colônias da  $d_1$ ;

$x_2$  = média de colônias da  $d_2$ ;

$x_3$  = média de colônias da  $d_3$ .

- c) considerando  $\omega = 40$  como o número ótimo de colônias e os valores acumulados obtidos, aplicou-se a fórmula de interpolação correspondente para o cálculo do número de UFC/mL, conforme quadro a seguir:

$\omega$ em relação ao valores acumulados	Fórmula de interpolação
$2\omega \geq x_1 + x_2 + 2x_3$	$(d_1/v) \cdot (1/2) \cdot (x_1 + x_2 + 2x_3)$
$x_1 + x_2 + 2x_3 \geq 2\omega \geq x_2 + 2x_3$	$(d_2/v) \cdot ((\omega \cdot x_1) / (2\omega + x_1 - (x_2 + 2x_3)))$
$x_2 + 2x_3 \geq 2\omega \geq 2x_3$	$(d_3/v) \cdot ((\omega \cdot x_2) / (2\omega + x_2 - 2x_3))$
$2x_3 \geq 2\omega$	$(d_3/v) \cdot x_3$

Onde:  $d_1$  = fator de diluição da preparação menos diluída;

$d_2$  = fator de diluição da preparação intermediária;

$d_3$  = fator de diluição da preparação mais diluída.

$x_1$  = média de colônias da  $d_1$ ;

$x_2$  = média de colônias da  $d_2$ ;

$x_3$  = média de colônias da  $d_3$ .

$v$  = volume inoculado por tubo.

### 3.2.1.2 – Critérios estatísticos para validação dos ensaios:

#### 3.2.1.2.1 - Teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ):

Destinado à verificação da existência de valores de contagens aberrantes em um mesmo nível de diluição, e, portanto à ocorrência de erro experimental, somado ao erro amostral previsto na distribuição de Poisson.

##### a) Descrição do cálculo de $\chi^2$ :

Para o cálculo do  $\chi^2$  de cada um dos três níveis de diluição foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \frac{n \cdot \sum x^2}{\sum x} - \sum x$$

Onde:  $n$  = número de tubos legíveis;

$\sum x$  = soma das contagens de colônias;

$\sum x^2$  = soma dos quadrados das contagens de colônias.

O valor de  $\chi^2$  calculado para cada diluição foi comparado com o valor crítico tabelado com base nos graus de liberdade ( $n - 1$ ) para o nível de significância 0,05 conforme segue:

$N$	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$n - 1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\chi^2 *$	3,8	6,0	7,8	9,5	11,1	12,6	14,1	15,5	16,9

\* (nível de significância 0,05)

#### b) Interpretação:

Valores de  $\chi^2$  calculados menores ou iguais aos valores críticos tabelados, indicaram a inexistência de contagens aberrantes entre os tubos inoculados com volumes iguais de uma mesma diluição de vacina, e portanto uniformidade no crescimento bacteriano entre os tubos. Desta forma a diluição satisfaz o critério do  $\chi^2$ , tendo sido incluída na média das contagens para cálculo do número de unidades viáveis (3.2.1);

Valores de  $\chi^2$  calculados maiores do que os valores críticos tabelados indicam a presença de contagens aberrantes entre os tubos e, portanto heterogeneidade no crescimento entre tubos. Neste caso a diluição não satisfaz o critério do  $\chi^2$ , tendo sido rejeitada e inviabilizada a continuação dos cálculos do número de viáveis descrito em 3.2.1.

#### 3.2.1.2.2 - Teste $t$

Aplicado à verificação das diferenças entre as diluições e, portanto a manutenção da proporcionalidade entre as mesmas. Trata-se de um teste estatístico de significância, comparando as diferenças entre as médias obtidas nas diluições consideradas válidas

para o critério do  $\chi^2$  (3.2.1.2.1), com o desvio padrão esperado, segundo a distribuição de Poisson.

a) Descrição do cálculo de  $t$ :

Para a comparação das médias obtidas na primeira, na segunda e na terceira diluições, aplicou-se a seguinte fórmula:

$$t = \frac{x_1 - (x_2 + (2 \times x_3))}{\sqrt{\frac{x_1}{n_1} + \frac{x_2}{n_2} + \frac{(4 \times x_3)}{n_3}}}$$

Onde:  $x_1, x_2$  e  $x_3$  = médias de colônias das diluições 1, 2 e 3 (válidas para o critério de  $\chi^2$ );

$n, n_2$  e  $n_3$  = número de tubos nas diluições 1, 2 e 3 (válidas para o critério de  $\chi^2$ ).

b) Interpretação

Os resultados compreendidos entre  $-2$  e  $2$  foram considerados válidos para  $p = 0,05$ .

### 3.2.1.3 – Pasta de cálculo BCGCALC:

O cálculo do número de UFC/mL, por meio de fórmulas de interpolação (3.2.1), foi realizado utilizando-se a pasta de cálculo denominada BCGCALC, desenvolvida no Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS em 2000 por meio do Microsoft Excel, com base nas instruções fornecidas pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977), tendo sido validada por meio da comparação dos resultados fornecidos com aqueles obtidos por meio do programa informatizado (linguagem d-base) fornecido pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) em 1996 (INCQS, 2000).

Nota: O programa informatizado fornecido pela OPAS em 1996, foi validado em 1998 no Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS (INCQS, 1998) por meio da reprodução manual dos cálculos com a aplicação das fórmulas fornecidas pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977).

Observa-se na Figura 1, que uma vez introduzidos os valores de contagens obtidos em cada tubo e os fatores de diluição da amostra, a Pasta BCGCALC forneceu automaticamente os valores de  $\chi^2$  de cada diluição, o valor de  $t$  (comparação das diferenças entre as médias das três diluições), assim como o número de UFC/mL. A utilização desta pasta requer a interpretação, pelo operador do cálculo, da validade dos ensaios com relação aos critérios estatísticos (valores de  $\chi^2$  e teste  $t$ ).

BCGCALC 1 - Cálculo BCG viáveis em suspensões de vacina																		
Amostra: Monografia				Fabricante: XXXX				Lote: XXXX			Ensaio: XXXX			Folha: XXXXX				
								Data:			Livro: XXXX							
Temperatura de estoque da amostra: 37°C																		
Número ótimo de colônias:											40		Volume inoculado:				0.1	
Contagens										Dados estatísticos								
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	o2	Somatório	n	CHI2	Média	Valor acumulado	Diluição		
19	18	27	6	20						1850	90	5	12.78	18.0	35.75	5000		
10	9	6	6	4						269	35	5	3.43	7.0	17.75	10000		
8	1	7	7	2	5	9	4			289	43	8	10.77	5.4	10.75	20000		
Teste t =											0.090166963		2.7728341					
Nº de colônias (UFC/ml) =											8.94E+05							
Temperatura de estoque da amostra: 4°C																		
Número ótimo de colônias:											40		Volume inoculado:				0.1	
Contagens										Dados estatísticos								
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	o2	Somatório	n	CHI2	Média	Valor acumulado	Diluição		
20	26	25	32	36						4021	139	5	5.64	27.8	53.8	10000		
10	13	10	9	8						514	50	5	1.40	10.0	26.00	20000		
4	13	9	8	7	9	5	8	9	8	694	80	10	6.75	8.0	16.00	40000		
Teste t =											0.548739685							
Nº de colônias (UFC/ml) =											2.69E+06							
<b>Resumo dos resultados</b>																		
Contagem de BCG viáveis (UFC/ml) =											2.69E+06			SATISFATÓRIA				
Termoestabilidade =											33%			SATISFATÓRIA				
Responsável técnico: _____											Data: ___/___/___							
Conferência dos dados: _____											Data: ___/___/___							

**Figura 1 - Visualização da Pasta BCGCALC.**

3.2.2 – Cálculo baseado em fórmulas limites (mínimo duas diluições estatisticamente válidas):

3.2.2.1 – Descrição dos cálculos:

O cálculo dos números de UFC/mL foram realizados de acordo com as seguintes etapas:

a) Cálculo das médias ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ) dos números de colônias obtidas em cada uma das três diluições. Para tal, somou-se os números de colônias contados em cada um dos tubos inoculados com uma mesma diluição e dividiu-se pelo número de tubos que compunham a série;

b) cálculo do valor de UFC/mL obtido em cada diluição:

Diluição	Fórmula limite
1	$(x_1.d_1) / v$
2	$(x_2.d_2) / v$
3	$(x_3.d_3) / v$

Onde:  $d_1$  = fator de diluição da preparação menos diluída;

$d_2$  = fator de diluição da preparação intermediária;

$d_3$  = fator de diluição da preparação mais diluída.

$x_1$  = média de colônias da  $d_1$ ;

$x_2$  = média de colônias da  $d_2$ ;

$x_3$  = média de colônias da  $d_3$ ;

$v$  = volume inoculado por tubo.

c) cálculo final de UFC/mL da amostra em análise através da média dos valores de UFC/mL obtidos em cada diluição considerada válida para o teste do  $\chi^2$  e do  $t$  (ver 3.2.2.2 a seguir). Desta forma o valor final de UFC/mL correspondeu a média entre as

UFC/mL presentes nas diluições  $d_1$ ,  $d_2$  e  $d_3$ , ou nas diluições  $d_1$  e  $d_2$ , ou nas diluições  $d_2$  e  $d_3$  ou ainda entre as diluições  $d_1$  e  $d_3$ , desde que estatisticamente válidas.

### 3.2.2.2 - Critérios estatísticos para validação do ensaio:

#### 3.2.2.2.1 - Teste do $\chi^2$

Aplicado à verificação da existência de valores de contagens aberrantes em uma mesma diluição, e, portanto a ocorrência de erro experimental, somado ao erro amostral previsto pela distribuição de Poisson.

##### a) Descrição do cálculo de $\chi^2$ :

Conforme descrito em 3.2.1.2.1

##### b) Interpretação:

Conforme descrito em 3.2.1.2.1

#### 3.2.2.2.2 – Avaliação do $\chi^2$ combinado:

Igualmente aplicado à verificação da existência de contagens aberrantes, e, portanto de erros experimentais significativos. O valor combinado de  $\chi^2$  permite diluir variações individuais que podem ser equivocadamente consideradas significativas.

##### a) Descrição do cálculo:

Para a obtenção do  $\chi^2$  combinado somou-se cada valor individual de  $\chi^2$  correspondente a cada uma das diluições (ver 3.2.1.2.1) das vacinas incluídas no ensaio. Os graus de



liberdade ( $n - 1$ , onde  $n$  = número de tubos legíveis) de cada diluição foram igualmente somados.

b) Interpretação:

O valor combinado de  $\chi^2$  maior do que o valor crítico tabelado indicou a existência de variância além da prevista pela distribuição de Poisson e, portanto erro experimental significativo para o nível de significância 0,05.

Quando a análise do  $\chi^2$  combinado indicou a existência de valor aberrante entre as contagens de uma, ou de mais de uma, das diluições das vacinas incluídas no ensaio, buscou-se identificar o valor individual aberrante por meio de sua eliminação e recálculo do valor combinado de  $\chi^2$ . Procedeu-se desta forma até a eliminação de todos valores aberrantes e a conseguinte obtenção de um valor de combinado de  $\chi^2$  menor ou igual ao valor crítico tabelado. Conseqüentemente, as amostras de vacina em que duas de suas diluições tiveram as médias eliminadas foram consideradas inválidas sendo, portanto necessária a sua repetição por meio da realização de um novo ensaio.

#### 3.2.2.2.3 – Teste $t$

Conforme descrito em 3.2.1.2.2, porém comparando as diferenças entre as médias de colônias obtidas nas diluições consideradas válidas para o critério do  $\chi^2$  (3.2.2.2.1), com o desvio padrão esperado, segundo a distribuição de Poisson.

Para tal avaliação, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

- a) para a comparação das médias obtidas na primeira, na segunda e na terceira diluições, introduziu-se a seguinte fórmula, devendo o resultado estar compreendido entre  $-2$  e  $2$ :

$$t = \frac{x_1 - (x_2 + (2 \times x_3))}{\sqrt{\frac{x_1}{n_1} + \frac{x_2}{n_2} + \frac{(4 \times x_3)}{n_3}}}$$

Onde:  $x_1, x_2$  e  $x_3$  = médias de colônias das diluições 1, 2 e 3;

$n_1, n_2$  e  $n_3$  = número de tubos nas diluições 1, 2 e 3.

b) para comparação das médias obtidas na primeira e na segunda diluições, introduziu-se a seguinte fórmula, devendo o resultado estar entre -2 e 2:

$$t = \frac{(x_1 - (2 \times x_2))}{\sqrt{\frac{x_1}{n_1} + \frac{(4 \times x_2)}{n_2}}}$$

Onde:  $x_1$  e  $x_2$  = médias de colônias das diluições 1 e 2;

$n_1$  e  $n_2$  = número de tubos nas diluições 1 e 2.

c) para comparação das médias obtidas na segunda e na terceira diluições, introduziu-se a seguinte fórmula, devendo o resultado estar entre -2 e 2:

$$t = \frac{(x_2 - (2 \times x_3))}{\sqrt{\frac{x_2}{n_2} + \frac{(4 \times x_3)}{n_3}}}$$

Onde:  $x_2$  e  $x_3$  = médias de colônias das diluições 2 e 3;

$n_2$  e  $n_3$  = número de tubos nas diluições 2 e 3.

d) para comparação das médias obtidas na primeira e na terceira diluições, introduziu-se a seguinte fórmula, devendo o resultado estar entre -2 e 2:

$$t = \frac{(x_1 - (4 \times x_3))}{\sqrt{\frac{x_1}{n_1} + \frac{(16 \times x_3)}{n_3}}}$$

Onde:  $x_1$  e  $x_3$  = médias de colônias das diluições 1 e 3;

$n_1$  e  $n_3$  = número de tubos nas diluições 1 e 3.

### 3.2.2.3 - Pasta de cálculo BCGCALCVAL:

O cálculo do número de UFC/mL foi realizado utilizando-se a pasta de cálculo denominada BCGCALCVAL, desenvolvida no Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS em 2005, tendo sido validada por reprodução manual dos cálculos (INCQS, 2005).

BCGCALCVAL																																																					
Amostra: Monografia			Ensaio: xxxxxxx			Livro: xxxxxx			Página: xxxxx			2/1/2007 23:00		Operador: Esther																																							
Diluição	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	$\sigma^2$	Somatório	n	Média	CHI2	UFC/mL																																					
20000	20	26	25	28	36						3781	135	5	27.0	5.0	Valido	5.4E+06																																				
40000	10	13	14	17	12						898	66	5	13.2	2.0	Valido	5.3E+06																																				
80000	4	12	9	6	22	9	5	8	9	8	1076	92	10	9.2	25.0	Inválido	invalido																																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="6">Teste de significância entre diluições</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Diluições testadas</th> <th>Desvio padrão</th> <th colspan="3">Resultado UFC/mL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>d1</td> <td>d2</td> <td>d3</td> <td>-1.3</td> <td>invalido</td> <td>invalido</td> </tr> <tr> <td>d2</td> <td>d3</td> <td></td> <td>-2.1</td> <td>invalido</td> <td>invalido</td> </tr> <tr> <td>d1</td> <td>d3</td> <td></td> <td>-2.7</td> <td>invalido</td> <td>invalido</td> </tr> <tr> <td>d1</td> <td>d2</td> <td></td> <td>0.2</td> <td>5.3E+06</td> <td>valido</td> </tr> </tbody> </table>																		Teste de significância entre diluições						Diluições testadas		Desvio padrão	Resultado UFC/mL			d1	d2	d3	-1.3	invalido	invalido	d2	d3		-2.1	invalido	invalido	d1	d3		-2.7	invalido	invalido	d1	d2		0.2	5.3E+06	valido
Teste de significância entre diluições																																																					
Diluições testadas		Desvio padrão	Resultado UFC/mL																																																		
d1	d2	d3	-1.3	invalido	invalido																																																
d2	d3		-2.1	invalido	invalido																																																
d1	d3		-2.7	invalido	invalido																																																
d1	d2		0.2	5.3E+06	valido																																																
Responsável pelo Cálculo: xxxxxxx						Conferente:						xxxxxxx																																									

CHI2 = valores de  $\chi^2$ ; Desvio padrão = valores de  $t$ .

**Figura 2** - Visualização da planilha “Cálculo Referência” da Pasta BCGCALCVAL..

Como se observa na Figura 2, uma vez introduzidos os valores de contagens obtidos em cada tubo e a primeira diluição da amostra, a Pasta BCGCALCVAL forneceu automaticamente os valores de  $\chi^2$  de cada diluição e o resultado da validação da diluição com relação ao valor crítico de  $\chi^2$ , os valores de  $t$  e o “status” de validação para cada combinação de diluição (d1/d2/d3 ou d1/d2 ou d2/d3 ou ainda d1/d3), assim como os resultados finais de UFC/mL para cada uma destas.

### 3.2.2.4 - Pasta de cálculo BCGCALCVAL adaptada ao cálculo do $\chi^2$ combinado:

Os cálculos dos números de UFC/mL dos ensaios analisados pelo  $\chi^2$  combinado foram realizados utilizando-se a pasta de cálculo BCGCALCVAL adaptada e revalidada (INCQS, 2005).

Análise do qui-quadrado acumulado em ensaio de contagem de BCG viáveis em amostras de Vacina				
Data:	12/11/2005	Ensaio:	monografia	Livro: XXXXXXXX
				Página: XXXXX
Amostra	Valores de qui-quadrado	Total qui:	119.67	
Exemplo	7.16	Nº tubos:	98	5
	13.00	grau lib.:	97	5
	17.73			9
Exemplo	2.10	Qui tabelado (p0,05):	120.99	5
	0.25			5
	8.74	Conclusão	<b>satisfatório</b>	10
Exemplo	1.92			5
	5.14			5
	4.50			10
Exemplo	3.56			5
	3.33			4
	23.22			10
Exemplo	2.50			5
	2.52			5
	24.00			10

**Figura 3** – Visualização da planilha “Qui-ensaio” da Pasta BCGCALCVAL adaptada ao cálculo do  $\chi^2$  combinado.

Como pode ser visualizado na Figura 3, foi introduzida, na Pasta BCGCALCVAL, uma planilha específica para o cálculo e interpretação do  $\chi^2$  combinado, com base na tabela de distribuição de  $\chi^2$  para o nível de significância 0,05.

Como ilustrado na Figura 4 a seguir, uma vez introduzidos os valores de contagens obtidos em cada tubo e a primeira diluição da amostra, a Pasta BCGCALCVAL adaptada forneceu automaticamente os valores de  $\chi^2$  de cada diluição, os valores de  $t$  e o “status” de validação para cada combinação de diluição (d1/d2/d3 ou d1/d2 ou d2/d3 ou ainda d1/d3), assim como os resultados finais de UFC/mL para cada uma destas.

BCGCALCVAL																																																				
Amostra: Monografia				Ensaio: XXXXXXXX				Livro: XXXXXX				Página: XXXXXX		2/1/2007 22:02		Operador: Esther																																				
Diluição	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	o2	Somatório	n	Média	CHI2	UFC/mL																																				
20000	23	25	26	52	32						5558	158	5	31.6	17.9	Inválido	6.3E+06																																			
40000	12	13	12	16	19						1074	72	5	14.4	2.6	Valido	5.8E+06																																			
80000	4	12	9	6	7	9	5	8	9	8	641	77	10	7.7	6.2	Valido	6.2E+06																																			
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="6">Teste de significância entre diluições</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Diluições testadas</th> <th>Desvio padrão</th> <th colspan="3">Resultado UFC/mL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>d1</td> <td>d2</td> <td>d3</td> <td>0.5</td> <td>6.1E+06</td> <td>valido</td> </tr> <tr> <td></td> <td>d2</td> <td>d3</td> <td>-0.4</td> <td>6.0E+06</td> <td>valido</td> </tr> <tr> <td>d1</td> <td></td> <td>d3</td> <td>0.2</td> <td>6.2E+06</td> <td>valido</td> </tr> <tr> <td>d1</td> <td>d2</td> <td></td> <td>0.7</td> <td>6.0E+06</td> <td>valido</td> </tr> </tbody> </table>																	Teste de significância entre diluições						Diluições testadas		Desvio padrão	Resultado UFC/mL			d1	d2	d3	0.5	6.1E+06	valido		d2	d3	-0.4	6.0E+06	valido	d1		d3	0.2	6.2E+06	valido	d1	d2		0.7	6.0E+06	valido
Teste de significância entre diluições																																																				
Diluições testadas		Desvio padrão	Resultado UFC/mL																																																	
d1	d2	d3	0.5	6.1E+06	valido																																															
	d2	d3	-0.4	6.0E+06	valido																																															
d1		d3	0.2	6.2E+06	valido																																															
d1	d2		0.7	6.0E+06	valido																																															
Responsável pelo Cálculo:											Conferente:																																									

CHI2 = valores de  $\chi^2$ ; Desvio padrão = valores de  $t$ .

**Figura 4** – Visualização da planilha “Cálculo Referência” da Pasta BCGCALCVAL adaptada ao cálculo do  $\chi^2$  combinado.

### 3.3 - Descrição das avaliações realizadas:

3.3.1 - Avaliação do impacto da aplicação do teste do  $\chi^2$  às contagens, tendo-se analisado:

a) 154 contagens em amostras de vacina (462 diluições) executadas, no INCQS, pela técnica tradicional descrita em 3.1.1 entre os anos de 2002 e 2003;

b) 155 contagens em amostras de vacina (465 diluições) executadas, no INCQS, pela técnica modificada descrita em 3.1.2 no ano de 2005.

Os valores de  $\chi^2$  foram calculados e avaliados quanto a sua conformidade, por meio da pasta BCGCALC. Neste estudo foi possível a associação das freqüências de

invalidação aos operadores da homogeneização das suspensões e inoculação dos volumes de 0,1 mL da diluição por tubo contendo LJ.

3.3.2 - Avaliação comparativa do impacto da aplicação do teste  $t$  aos ensaios de contagem de UFC/mL com o emprego dos sistemas de cálculo descritos em 3.2.1 (mínimo de 3 diluições válidas quanto ao  $\chi^2$  para o cálculo por meio de fórmulas de interpolação – pasta BCGCALC) e 3.2.2 (mínimo de 2 diluições válidas quanto ao  $\chi^2$  para o cálculo por meio de fórmulas limite – pasta BCGCALCVAL), tendo-se analisado:

- a) 283 contagens em amostras de vacina executadas, no INCQS, pela técnica convencional descrita em 3.1.1 entre os anos de 2002 e 2004;
- b) 285 contagens em amostras de vacina executadas, no INCQS, pela técnica modificada descrita em 3.1.2 no ano de 2005 .

3.3.3 – Avaliação do impacto da aplicação do teste do  $\chi^2$  combinado e do teste  $t$  com o emprego dos sistemas de cálculo descritos em 3.2.1 e 3.2.2 para interpretação dos resultados de 31 ensaios (285 contagens em amostras de vacina) executados no INCQS em 2005, empregando-se a técnica modificada descrita em 3.1.2.

3.4 – Fonte de consulta dos ensaios incluídos no estudo:

Os dados referentes aos ensaios avaliados encontram-se arquivados nos livros de registro de Ensaios de Contagem de Unidades Viáveis de BCG do Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS.

## 4 – RESULTADOS

**Tabela 4.1** - Diluições consideradas inválidas pelo teste do  $\chi^2$  quando diferentes operadores empregaram a técnica tradicional (3.1.1) para contagem de unidades viáveis de BCG em amostras de vacina. As avaliações estatísticas de  $\chi^2$  foram realizadas utilizando-se a pasta BCGCALC.

	Diluições *		
	Nº total	Inválidas	%
Operador A	132	30	22,7
Operador B	330	106	32,0
Total	462	136	29,0

\* Diluição: série de tubos contendo LJ inoculados com uma mesma diluição da amostra de vacina.

**Tabela 4.2** – Diluições consideradas inválidas pelo teste do  $\chi^2$  quando diferentes operadores empregaram a técnica modificada (3.1.2) buscando a redução do efeito de variáveis nos ensaios de contagem de unidades viáveis de BCG. As avaliações estatísticas de  $\chi^2$  foram realizadas utilizando-se a pasta BCGCALCVAL..

	Diluições*		
	Nº total	Inválidas	%
Operador A	135	04	2,9
Operador B	54	06	11,1
Operador C	276	34	12,3
Total	465	44	9,4

\*Diluição: série de tubos contendo LJ inoculados com uma mesma diluição da amostra de vacina.

**Tabela 4.3** - Contagens de viáveis consideradas inválidas, por operador, segundo critério do  $\chi^2$ , antes e após a introdução das modificações na técnica tradicional. Utilizou-se para tal avaliação, o critério de cálculo baseado na aplicação das fórmulas de interpolação (mínimo de três diluições válidas) conforme item 3.2.1 e a pasta BCGCALC.

Contagens em amostras de vacina	Técnica tradicional			Técnica modificada		
	Nº total	Inválidas	%	Nº total	Inválidas	%
Operador A	44	26	59	45	04	12,5
Operador B	110	79	72	18	06	33,3
Operador C	-----	-----	-----	92	32	34,8
Total	154	105	68	155	42	27,0

**Tabela 4.4** - Índices de invalidação das contagens de viáveis em amostras de vacina segundo o critério do  $\chi^2$  e do teste  $t$ , considerando-se os esquemas de cálculo baseados nas fórmulas de interpolação (mínimo de três diluições válidas) e nas fórmulas limite (mínimo de duas diluições válidas), aplicados aos resultados fornecidos pela técnica tradicional e pela técnica modificada:

Contagens em amostras de vacina	Mínimo 3 diluições			Mínimo 2 diluições		
	Nº total	Inválidas	%	Nº total	Inválidas	%
Técnica convencional	283	190	67	283	68	24
Técnica modificada	285	112	39	285	18	6



**Tabela 4.5** - Impacto da aplicação do cálculo baseado em no mínimo três diluições válidas quanto ao  $\chi^2$  e teste  $t$  em 31 ensaios realizados pela técnica modificada:

Total de ensaios	Total de amostras incluídas <sup>a</sup>	Número de amostras		Total de invalidações por ensaio	Repetições necessárias		
		Válidas	Inválidas		Amostras em análise	Amostras de vacina referência	Total de amostras
31	285	173	112	197 <sup>b</sup>	182 <sup>c</sup>	23	205 (72%)
		61%	39%	79%			

<sup>a</sup> – Incluída uma amostra de vacina de referência de trabalho por ensaio;

<sup>b</sup> – Como 15 ensaios foram rejeitados por invalidação da amostra de vacina de referência de trabalho, do total de 197 amostras inválidas, 15 correspondem a vacina de referência de trabalho e 182 a amostras de vacina em análise;

<sup>c</sup> – 182 amostras agrupadas em 23 ensaios.

**Tabela 4.6** - Impacto da aplicação do cálculo baseado em no mínimo duas diluições válidas quanto ao  $\chi^2$  e teste  $t$  em 31 ensaios realizados pela técnica modificada:

Total de ensaios	Total de amostras incluídas <sup>a</sup>	Número de amostras			Repetições necessárias <sup>c</sup>		
		Válidas para 3 diluições	Válidas para 2 diluições	Inválidas <sup>d</sup>	Amostras em análise	Amostras vacina referência	Total de amostras
31	285	173 (61%)	94 (33%)	18 <sup>b</sup>	26 <sup>c</sup>	04	30 (10,5%)
		267 (94%)		6 %			

<sup>a</sup> – Incluída uma amostra de vacina de referência por ensaio;

<sup>b</sup> – Uma amostra de vacina de referência implicando na repetição de nove amostras incluídas em um único ensaio;

<sup>c</sup> – 26 amostras agrupadas em quatro ensaios;

<sup>d</sup> – Critério de invalidação: médias decrescentes em diluições crescentes (03 amostras – 16,7%); teste  $t$  (12 amostras – 66,6%) e  $\chi^2$  válido para ao menos duas diluições (03 amostras – 16,7%).

**Tabela 4.7** - Impacto da aplicação do cálculo baseado em no mínimo duas diluições válidas quanto ao  $\chi^2$  combinado e teste  $t$  em 31 ensaios realizados pela técnica modificada:

Total de ensaios	Ensaio válidos para $\chi^2$ combinado	Número de amostras				Repetições necessárias		
		Total	Válidas para $t$ com 3 diluições	Válidas para $t$ com 2 diluições	Inválida <sup>c</sup>	Amostra em análise	Amostra vacina referência	Total de amostras
31	31 <sup>a</sup>	285 <sup>b</sup>	223 (80%)	55 (20%)	06	06 <sup>d</sup>	01	07 (2,4%)
			278 (98%)		2 %			

<sup>a</sup> – Dois ensaios válidos após a eliminação de um valor aberrante e um ensaio válido após a eliminação de dois valores aberrantes;

<sup>b</sup> – Incluída uma amostra de vacina de referência por ensaio;

<sup>c</sup> – três amostras inválidas segundo o critério de contagens decrescentes com relação às diluições crescentes e três amostras inválidas segundo o critério do teste  $t$ ;

<sup>d</sup> – agrupadas em um ensaio.

## 5 – DISCUSSÃO

O cultivo em meio sólido permanece sendo a técnica oficialmente recomendada pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987) para avaliação da viabilidade do BCG em amostras de vacina, apesar de sua variabilidade e baixa reprodutibilidade (STAVRI et al, 1974; GHEORGHIU; LAGRANGE; FILLASTRE, 1988; ; MILSTIEN; GIBSON, 1990; DIETRICH; VIRET; HESS, 2003).

Este fato é evidenciado quando se faz necessário o estabelecimento de critérios de validação dos ensaios e da própria técnica, itens inerentes ao sistema da qualidade e cuja aplicação eleva os níveis de exigência dos procedimentos.

Desta forma, buscando assegurar a credibilidade dos resultados obtidos, o aprimoramento da técnica é de fundamental importância, que é viabilizado ao se manter em níveis aceitáveis os efeitos de variáveis através da padronização e controle rigoroso dos procedimentos.

Segundo a OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977), o erro esperado designado como erro amostral está previsto pela distribuição de Poisson, podendo gerar variações metodologicamente aceitáveis. As variações que extrapolam o limite do erro amostral previsto, podem também ocorrer e são decorrentes de erros experimentais. A existência do erro experimental é revelada quando a variação observada é maior do que aquela prevista estatisticamente pelo erro amostral, o que pode ser detectado por meio da distribuição de  $\chi^2$  e do teste  $t$ . O primeiro indicando a inoculação e crescimento não uniformes entre tubos e o segundo a desproporcionalidade das diluições com relação ao fator de diluição empregado para o preparo destas.

A parede celular rica em lipídeos confere ao BCG hidrofobicidade e portanto a tendência à formação de grumos, dificultando a sua dispersão e a obtenção de

suspensões homogêneas, sobretudo em relação à vacina clássica produzida por cultivo em superfície de meio líquido, método adotado para a produção nacional da vacina.

Segundo Gheorghiu e colaboradores (GHEORGHIU; LAGRANDERIE; BALAZUC, 1996) a massa bacilar, quando triturada, além de sofrer perda de viabilidade, adquire heterogeneidade com elevada frequência de grumos de dimensões variáveis, ou seja agregados formados por diferentes quantidades de bacilos.

O que STAVRI e colaboradores (STAVRI et al, 1974) ratificam, afirmando que o controle da viabilidade da vacina clássica é alterado pela presença de grumos bacterianos, refletindo mais o nível de agregação do que propriamente a sua viabilidade.

Desta forma deduz-se serem os cuidados dispensados à reconstituição e à homogeneização das diluições, fatores importantes que implicariam diretamente na avaliação estatística dos procedimentos de ensaio.

Estes aspectos do produto, aliados à falta de detalhamento prático das etapas do ensaio, fazem, dos parâmetros estatísticos descritos pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977), fatores limitantes, visto que reduzem apreciavelmente a probabilidade de aceitação dos ensaios como válidos, justificando assim a sua ampla discussão neste estudo.

De fato, a avaliação da técnica tradicional com relação ao critério do  $\chi^2$  (Tabela 4.1) revelou elevadas frequências de invalidação por ocorrência de contagens de colônias aberrantes em uma mesma série de tubos de LJ inoculados com uma mesma diluição de vacina. Ou seja, de 462 séries de tubos inoculados com a mesma diluição de vacina, 136 teriam seus valores de  $\chi^2$  calculados excedendo os valores de  $\chi^2$  tabelados para o nível de significância 0,05, gerando assim 29% de invalidação das séries de diluições segundo este critério, demonstrando elevado índice de erro experimental embutido nos ensaios.

Considerando a recomendação da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977) de rejeição e repetição dos ensaios a cada invalidação pelo  $\chi^2$ , leva a dedução de que a instituição deste critério para avaliação dos ensaios realizados pela técnica tradicional, implicaria em elevada ocorrência de invalidações e conseqüentemente execução de grande número de novos testes.

Por conseguinte, esta medida seria dificilmente aplicável tendo em vista a grande demanda de análises do controle nacional, o alto custo de cada ensaio além do tempo necessário para a emissão de laudos conclusivos, uma vez que se necessita de ao menos 60 dias para a conclusão de cada ensaio, quando se avalia a termoestabilidade do produto.

A observação de diferentes freqüências de invalidação segundo o operador (Tabela 4.1), indicou a provável contribuição deste fator, que somado a difícil dispersão do BCG, conferiria aumento de variabilidade à técnica.

Buscando identificar fatores que uma vez controlados reduziriam a ocorrência deste tipo de erro experimental, se analisou as diferentes etapas do ensaio em que as variações mais provavelmente estivessem associadas aos operadores. Assim a homogeneização das suspensões antes da tomada das amostras e a precisão ao dispensar os volumes de 0,1 mL de inóculo em cada tubo com LJ, adquiriram caráter crítico, uma vez que a técnica tradicional não fixava condições necessárias à padronização destas etapas do ensaio.

Cabe mencionar que tal avaliação foi possibilitada por existir uniformidade quanto às condições de cultivo oferecidas pelo meio de cultura (LJ) contido em cada tubo proveniente de um mesmo procedimento de produção. A homogeneidade e superfície do meio sólido (área do bisel), a perfeita vedação dos tubos após inoculação e a reduzida formação de líquido de condensação garantiram homogeneidade entre os tubos. Já o efeito das possíveis variações de viabilidade do meio de cultura, decorrentes de homogeneização durante o preparo do lote, bem como dos diferentes ciclos de

coagulação, foram minimizadas através da aleatorização dos tubos com relação às diferentes partidas do meio.

Portanto, estas medidas visaram minimizar os efeitos indesejáveis conferidos à técnica pelo sistema de cultivo empregado. Segundo alguns autores (LUGOSI, 1992; STAVRI et al, 1974), a sensibilidade reduzida do meio de LJ, o recipiente e o sistema de vedação, bem como o tamanho do inóculo, contribuem para o reduzido crescimento do bacilo ou mesmo a confluência de colônias, dificultando as contagens, o que gera resultados de viabilidade subestimados e/ou tendenciosos.

A substituição do tipo de recipientes empregados para o preparo das diluições, o emprego de material volumétrico automático calibrado na distribuição dos volumes de inóculo por tubo de LJ, a padronização do tempo e dos movimentos na homogeneização das diluições, bem como a definição do número de rinsagens, mostraram-se medidas de controle eficazes para a redução da heterogeneidade entre as contagens de colônias de uma mesma diluição de vacina. A redução das freqüências de invalidação pelo  $\chi^2$  pode ser constatada quando se compara os valores das Tabelas 4.1 e 4.2, tendo a porcentagem de invalidações passado de 29% para 9,4% do total de diluições avaliadas antes e após a modificação da técnica.

Além do critério estatístico do  $\chi^2$ , as diferenças entre as médias das contagens obtidas nas diluições seriadas devem também ser avaliadas por meio do teste *t*. Trata-se de um teste de significância que compara as diferenças entre as médias das contagens de diferentes diluições com o desvio padrão esperado quando o nível de significância é de 0,05 conforme derivado da distribuição de Poisson. A condição para a realização desta análise consiste na inexistência de erro experimental detectado pelo teste do  $\chi^2$  comentado anteriormente.

Para o cálculo do número de UFC/mL da amostra ensaiada, a OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977) sugere a aplicação de fórmulas de

interpolação que relacionam cumulativamente as médias obtidas em cada uma das diluições. O emprego das médias das diferentes diluições é vantajoso pelo aspecto ponderado deste esquema de cálculo. No entanto, a aplicação das fórmulas de interpolação, apesar de não objetivamente explicitado na referida publicação oficial, implicaria na inclusão das médias de pelo menos duas das três diferentes diluições, devendo logicamente, as mesmas estarem válidas quanto ao  $\chi^2$  e teste  $t$ .

A eleição de uma entre as 4 fórmulas de interpolação (3.2.1.1) é baseada no valor acumulado das médias com relação ao número ótimo de colônias ( $\omega$ ). Este fato faz desta recomendação um fator limitante visto que a invalidação de pelo menos uma das três diluições impossibilitaria o cálculo uma vez que a média em questão estaria inválida não podendo ser incluída no cálculo.

Como apresentado na Tabela 4.3, ensaios realizados pela técnica modificada e avaliados com a aplicação do  $\chi^2$ , teste  $t$  e fórmulas de interpolação, apesar de oferecerem condições para redução da freqüência de invalidação com relação à técnica tradicional (68%), ainda produziriam 27% de rejeição.

Face à necessidade da implementação da análise estatística para a validação dos ensaios, porém de forma que os critérios adotados não contribuíssem para a inviabilização da aplicação da técnica ao controle da qualidade da vacina BCG, buscou-se avaliar o impacto da utilização de recursos estatísticos de menor rigor, mas que garantissem a análise dos dados sem a distorção dos resultados.

Desta forma, avaliou-se o emprego das médias das contagens fornecidas por duas ou três diluições, desde que estatisticamente válidas. Para tal, a aplicação das fórmulas de interpolação não seria indicada, pois implicaria muito freqüentemente na utilização das médias das três diluições como pode ser verificado no item 3.2.1.1, sendo portanto obrigatório que todas as médias incluídas no cálculo estivessem válidas para os critérios do  $\chi^2$  e do teste  $t$ .



Buscando minimizar as implicações acarretadas por esta obrigatoriedade, avaliou-se a aplicação das fórmulas limite, também citadas pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977) e que permitem o cálculo pontual das UFC/mL de cada diluição da vacina em análise. Desta forma seria viabilizado o cálculo das UFC/mL a partir das médias fornecidas por pelo menos duas diluições consideradas válidas quanto aos critérios do  $\chi^2$  e do teste  $t$ , sendo o resultado final a média das UFC/mL obtidas para cada diluição.

A aplicação deste sistema de cálculo permitiu a redução de invalidações decorrentes da execução da técnica modificada, de 39% para 6%, representando uma diminuição significativa, conforme apresentado na Tabela 4.4.

O aumento das possibilidades de combinação entre as diluições válidas implicou na redução de freqüência das invalidações, por meio da eliminação de uma das 3 diluições que porventura fosse considerada inválida quanto a um dos critérios estatísticos.

Cabe ainda mencionar que a OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977) cita as possibilidades de combinação entre as diluições respeitando, para avaliação do teste  $t$ , o fator de diluição 2, ao passo que a presente avaliação incluiu outra possibilidade de combinação entre a primeira e a terceira diluições, quando o fator de diluição 4, exigiu a modificação da fórmula de comparação entre o desvio padrão esperado e a diferença entre as médias de contagens obtidas na primeira e na terceira diluições.

Quando se avaliou, sob o aspecto global, o impacto da aplicação dos cálculos aos ensaios realizados pela técnica modificada, foi revelado o número de repetições necessárias em consequência às invalidações dos ensaios (Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7).

Deve-se considerar que a cada ensaio realizado, uma amostra de vacina de referência de trabalho é obrigatoriamente avaliada em paralelo objetivando a validação do processo, que deve obedecer a distribuição normal (Curva de Gauss) (BUNCHAFT, 1997), e ainda monitorar a existência de tendências ao longo do tempo (gráfico controle de

Shewhart) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997) Sendo assim, a invalidação da contagem de UFC/mL da vacina de referência de trabalho implicaria na rejeição da totalidade das amostras incluídas no ensaio, e a conseqüente repetição destas por meio da realização de novos testes.

Desta forma, a Tabela 4.5 permite verificar que quando aplicadas as fórmulas de interpolação e, portanto 3 diluições para o cálculo, a invalidação da vacina de referência foi responsável pela rejeição de 15 dos 31 ensaios realizados, contribuindo, em grande proporção, para a repetição de 72% das amostras ensaiadas.

Como apresentado na Tabela 4.6, o estudo do impacto do cálculo baseado em no mínimo duas diluições válidas de cada amostra, revelou uma redução apreciável da freqüência de repetições necessárias, de 205 amostras (Tabela 4.5) para 30 amostras, representando 10,5% do número total de amostras incluídas nos 31 ensaios avaliados. A amostra de vacina de referência foi responsável pela rejeição de somente um dos ensaios avaliados por este sistema de cálculo.

Observa-se ainda, com base nos dados da Tabela 4.6, que das 267 amostras cujas contagens foram consideradas válidas, 173 (61%) tiveram seus cálculos baseados nas médias das três diluições e 94 (33%) nas médias de duas diluições válidas quanto aos critérios do  $\chi^2$  e do teste t.

Para a análise do impacto da aplicação do  $\chi^2$  combinado, como também referido pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977), os mesmos 31 ensaios foram avaliados objetivando-se verificar até que ponto os erros experimentais, detectados pelo  $\chi^2$  individual das diluições, poderiam ser diluídos e portanto considerados não significativos no universo de amostras incluídas no ensaio.

Como ilustra a Tabela 4.7, somente três dos 31 ensaios avaliados tiveram seus valores de  $\chi^2$  combinado acima do  $\chi^2$  tabelado ao nível significância 0,05. Este dado revela

que a maioria das invalidações pelo  $\chi^2$  individual das diluições indicaria equivocadamente a existência de diferença significativa entre os valores segundo a distribuição de Poisson.

Assim, ficou demonstrado que o valor do  $\chi^2$  combinado oferece base mais segura para a verificação da existência de erros experimentais, evitando-se desta forma a rejeição indevida de dados, que uma vez inseridos no cálculo final de UFC/mL da amostra, forneceriam condições mais precisas de estimativa.

Na medida em que é possibilitada a análise pelo  $\chi^2$  combinado, 223 (80%) das amostras avaliadas puderam ter suas UFC/mL calculadas com base em três diluições, contra somente 55 (20%) calculadas com base em duas diluições e portanto em dois pontos de observação. Vale mencionar que quando se inclui no cálculo as médias das contagens de três diluições pela fórmula limite, os resultados, em termos de UFC/mL, são idênticos àqueles fornecidos pela fórmula de interpolação. A possibilidade do cálculo baseado nas médias de contagens de duas diluições, aliada à análise combinada do  $\chi^2$ , permitiu assim a validação dos ensaios, uma vez que o número médio de colônias da diluição eliminada de cada amostra não foi necessária ao cálculo final de UFC/mL. É importante salientar que a inclusão destes valores aberrantes poderiam distorcer os valores de UFC/mL das amostras, resultando na obtenção de resultados equivocados, caso não fosse aplicado o teste *t*.

A reavaliação do  $\chi^2$  combinado após a eliminação de médias de contagens de diluições cujo  $\chi^2$  individual excedeu o valor crítico, possibilitou a validação geral dos 31 ensaios pelo  $\chi^2$  combinado, implicando em 100% de validação das amostras incluídas em cada um destes ensaios.

A Tabela 4.7 indica ainda que somente seis (2%) das 285 amostras incluídas nos 31 ensaios foram consideradas inválidas, implicando em repetição de somente 2,4% destas, incluindo a vacina de referência de trabalho avaliada em paralelo.

A constatação de que as seis invalidações deveram-se a erros experimentais, detectados pelo teste  $t$  e decorrentes do preparo das diluições, indica ser ainda, esta etapa do ensaio, suscetível a desvios. De fato, esta foi a única etapa do ensaio para a qual não se fixou condições que minimizassem a ocorrência de erros experimentais. Do total de seis amostras consideradas inválidas, três não estavam de acordo com o critério de contagens decrescentes com relação às diluições crescentes. As outras três amostras foram rejeitadas pelo critério do teste  $t$ , demonstrando desproporcionalidade entre as diluições e, portanto desvios com relação ao fator de diluição empregado.

Isto sugere ser necessária a introdução, na etapa de diluição, de outras medidas, como a utilização de pipetas automáticas calibradas, a homogeneização mecânica das suspensões e o aumento do tempo de homogeneização, logo após a reconstituição da vacina e durante o preparo das diluições, o que segundo STAVRI e colaboradores (STAVRI et al, 1974) reduz ainda mais os valores de  $\chi^2$  e conseqüentemente a dispersão de resultados.

A importância destas medidas é confirmada pelas observações de Brown e Brown (BROWN; BROWN, 1982) de que o grau de agregação do BCG pode resultar em valores subestimados de UFC/mL e portanto na avaliação equivocada das concentrações das suspensões, visto serem a dose, a quantidade e o tamanho dos grumos variáveis claramente interdependentes.

As características conferidas à vacina pela técnica clássica de produção contribuem significativamente para as variações entre avaliações de um mesmo lote de produto final. De fato, Gheorghiu e colaboradores (GHEORGHIU; LAGRANGE; FILLASTRE, 1988), relatam que uma suspensão líquida de vacina preparada pela forma clássica produziu, em contagens por microscopia direta, aproximadamente  $10^8$  microrganismos em 1 mg de peso úmido, ao passo que a inoculação em meio de cultura rendeu, em número de

colônias, aproximadamente  $21 \times 10^6$  mg/ampola. Avaliações de diferentes lotes preparados a partir desta mesma suspensão renderam entre  $15 \times 10^6$  e  $30 \times 10^6$  UFC/mL.

O fato de inexistir, até o presente, ensaios “in vitro” capazes de prognosticar a indução de resistência imune em humanos, a determinação do número de viáveis presentes em cada lote do produto final constitui o principal meio de avaliar a qualidade da vacina, pois indica a consistência da produção conforme originalmente avaliada nos estudos clínicos. A manutenção das concentrações de bacilos viáveis lote a lote constitui assim o principal indicador do nível de qualidade, pois possibilita o monitoramento de fases essenciais da produção como a formulação, a homogeneização da suspensão durante o envase e a sobrevivência do BCG à liofilização, processo ao qual o BCG demonstra maior suscetibilidade.

A determinação e manutenção do nível de bacilos viáveis necessário para induzir hipersensibilidade tuberculínica sem que seja conferida reatogenicidade à vacina, é também amplamente discutido sendo dependente dos resultados das contagens e de seus limites, justificando mais ainda o desenvolvimento de técnicas e/ou introdução de medidas que minimizem a variabilidade das avaliações (LUGOSI, 1992; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993)

Segundo Lugosi (LUGOSI, 1982) o controle estatístico dos produtos biológicos, com base em probabilidade lógica, elimina a interpretação subjetiva e assegura a decisão objetiva de seleção de produtos mais eficientes com reatogenicidade aceitável. Modelos estatísticos exatos contribuem com o progresso da padronização do BCG e explicam as contradições existentes entre dados laboratoriais e de campo quando se avalia a eficácia de vacinações com o BCG.

Portanto, o desenvolvimento de métodos alternativos vem sendo encorajado pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2003; 2004) visando reduzir a problemática acarretada, para fabricantes e laboratórios de controle, pela variabilidade e baixa

reprodutibilidade dos resultados do ensaio tradicional de contagem em meio sólido, e sua correlação aos estudos de campo.

A dosagem de adenosina trifosfato (ATP) por reação de bioluminescência (GHEORGHIU; LAGRANDERIE, 1979; JANASZEK; ALEKSANDROWICZ; SITKIEWICZ, 1987; ASKGAARD et al, 1995; SHI; KLEGERMAN; GROVES, 1989) e a redução de sais de tetrazol com posterior leitura colorimétrica (BERNAS; DOBRUCK, 2002; DENIZOT; LANG, 1986; MSHANA et al, 1998; SLADOWSKI et al, 1993) constituem técnicas cuja aplicação e aprimoramento vêm sendo discutidos frente a adaptações, buscando aumento de sensibilidade e precisão, porém por comparação e correlação (curvas de calibração) com os resultados fornecidos por contagem em meio sólido. Este fato justifica mais uma vez a necessidade do aumento dos níveis de precisão da técnica tradicional, bem como a disponibilidade de um padrão de referência estável e adequadamente estabelecido por estudos interlaboratoriais.

Apesar da forte contribuição do presente estudo em fixar condições específicas para a realização dos ensaios de contagem de UFC/mL de forma a torná-los individual e estatisticamente válidos, a técnica deve ainda ser avaliada quanto a sua reprodutibilidade.

Somente a avaliação da estreiteza entre os resultados obtidos a partir de uma mesma amostra homogênea por meio do procedimento de ensaio cujas condições (robustez) estejam adequada e integralmente descritas, permitirão avaliar a precisão do método. Os estudos da repetitividade (precisão intra-ensaio) e da precisão intermediária (precisão intralaboratorial) possibilitarão o cálculo dos intervalos de confiança dos resultados de rotina e estudos interlaboratoriais permitirão o conhecimento da reprodutibilidade da técnica (SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE SCIENCE ET TECHNOLOGIE PHARMACEUTIQUE, 2002).

## 6 – CONCLUSÕES

6.1 – Foi evidenciada a necessidade da adaptação da técnica tradicional, visando a redução do efeito de variáveis, e, portanto a redução do erro experimental;

6.2 – Foi constatada a eficácia das seguintes condições específicas introduzidas na técnica tradicional buscando a redução do efeito das variáveis nos resultados final:

- Utilização de erlenmeyers de 25 mL para o preparo do pool de vacina reconstituída, bem como para o preparo das diluições, o que permitiu a melhor homogeneização e dispersão do bacilo nas suspensões;
- Utilização de pipeta automática de repetição calibrada para a inoculação dos volumes de 0,1 mL nos tubos contendo LJ, o que conferiu precisão à etapa de inoculação ;
- Estabelecimento do período fixo de 1 minuto para homogeneização da amostra reconstituída e das suspensões durante o preparo das diluições, o que contribuiu para o aumento e uniformização do grau de dispersão dos bacilos nas suspensões;
- Estabelecimento de três rinsagens de pipeta e/ou ponteira no momento da tomada dos volumes a serem diluídos e inoculados nos tubos com LJ, prevendo igualmente a melhor homogeneização.

6.3 – Foi evidenciada a necessidade da avaliação de medidas que uma vez aplicadas a etapa de diluição venham a promover a redução da ocorrência de erros experimentais que foram evidenciados pela aplicação do teste  $t$  e do critério do número de colônias decrescentes com relação às diluições crescentes, mesmo com a introdução das modificações na técnica tradicional.

6.4 – Foi constatada a aplicabilidade dos seguintes parâmetros estatísticos e de cálculo aos ensaios realizados pela técnica modificada:

- Aplicação das fórmulas limite (3.2.2) para o cálculo de UFC/mL das diluições;
- Análise do  $\chi^2$  para cada nível de diluição (3.2.2.2.1) das amostras seguida da análise do  $\chi^2$  combinado do ensaio (3.2.2.2.2);
- Aplicação do teste  $t$  às diluições consideradas válidas quanto ao  $\chi^2$  combinado (3.2.2.3);
- Cálculo do número de UFC/mL como a média dos números de viáveis de pelo menos duas diluições consideradas válidas para os critérios acima descritos.

6.5 – Para a informatização do cálculo, validação e interpretação dos ensaios recomenda-se o uso da pasta BCGCALVAL (3.2.2.3).



## **7 – PERSPECTIVAS**

7.1 – Sugere-se a validação da técnica modificada objetivando avaliar a sua repetitividade e precisão intermediária, permitindo a expressão dos resultados e dos intervalos de confiança nas análises de rotina (SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE SCIENCE ET TECHNOLOGIE PHARMACEUTIQUE, 2002).

7.2 – Conforme previsto nos recentes relatórios da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2003; 2004), a eminente recomendação oficial de ensaios alternativos em substituição à contagem por cultivo em meio sólido, constitui uma realidade frente a qual o INCQS deve estar preparado. Considerando a praticidade, a rapidez na obtenção do resultado, o baixo custo e a disponibilidade dos equipamentos necessários, sugere-se o desenvolvimento, implantação e validação da técnica colorimétrica de determinação da viabilidade do BCG por redução de sais de tetrazol.

## REFERÊNCIAS

ASKGAARD, D. S. et al. Firefly luciferase assay of adenine trifosphate as a tool of quantification of the viability of BCG vaccines. **Biologicals**, 23: 55 – 60, 1995.

BERNAS, T.; DOBRUCK, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT. Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. **Citometry**, 47: 236 – 242, 2002.

BRASIL. Resolução N.º 199, de 12 de junho de 2002. Aprova o Fascículo 3 da Parte II da 4ª edição da **Farmacopéia Brasileira**, em anexo elaborada pela Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira – CPRFB. Instituída pela Portaria N.º 12 – ANVS, de 20 de janeiro de 2000.

BROWN, C. A .; BROWN, I. N. *Mycobacterium bovis*, BCG, modulation of murine antibody responses: influence of dose and degree of aggregation of live and dead organisms. **Br. J. Path.**, 63, p. 133-143, 1982.

BUNCHAFT, G. **Estatística sem mistérios**. 3 ed. Petrópolis, RJ: Vozes, 1997.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, 89: 271 – 277, 1986.

DIETRICH, G.; VIRET, J.F.; HESS, J. *Mycobacterium bovis* BCG-based vaccines against tuberculosis: novel developments. **Vaccine**, 21, p-667-670, 2003.

GHEORGHIU, M.; LAGRANDE, M. Mesure rapide de la viabilité du BCG par dosage de L'ATP. **Ann. Microbiol.** (Inst. Pasteur), 130 B (2): 147 – 156, 1979.

GHEORGHIU, M., LAGRANGE, P.H.; FILLASTRE, C. The stability and immunogenicity of a dispersed-grown freeze-dried Pasteur BCG vaccine. **J. of Biol. Stand.**, 16, p. 15-26, 1988.

GHEORGHIU, M.; LAGRANDE, M.; BALAZUC, A . M. Stabilization of BCG Vaccines. **Dev. Biol. Stand.**, 87: 251 - 261, 1996.

INCQS. Validação dos resultados dos ensaios de contagem do número de BCG viáveis obtidos por programa informatizado fornecido pela OPAS. **Dossiê de Validação, 1998**. Arquivo do Setor de Vacinas / BCG, Lab. de Produtos, Depart. Microbiologia, INCQS.

INCQS. Validação dos cálculos dos números de BCG viáveis obtidos por programa informatizado desenvolvido no INCQS. **Dossiê de validação da Pasta BCGCALC, 2000.** Arquivo do Setor de Vacinas / BCG, Lab. de Produtos, Depart. Microbiologia, INCQS.

INCQS. **Dossiê de desenvolvimento, validação e manutenção da Pasta BCGCALCVAL, 2005.** Arquivo do Setor de Vacinas / BCG, Lab. de Produtos, Depart. Microbiologia, INCQS.

JANASZEK, W.; ALEKSANDROWICZ, J.; SITKIEWICZ, D. The use of firefly bioluminescent reaction for the rapid detection and counting of mycobacterium BCG. **J. Biol. Stand.**, 15: 11 – 16, 1987.

LUGOSI, L. Stabilité de la viabilité du vaccin BCG Sec (Souche Pasteur 1173 – P2) stocké à 4 °C pendant 540 jours: Étude Statistique. **Ann. Microbiol.** (Inst. Pasteur), 133B: 475 – 489, 1982.

LUGOSI, L. Theoretical and methodological aspects of BCG vaccine from the discovery of Calmette and Guérin to molecular biology. A review. **Tuberc. Lung. Dis.**, 73, p. 252-261, 1992.

MILSTIEN, J. B. and GIBSON, J. J. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. **Bull of the World Health Org.**, 68 (1), p. 93-108, 1990.

MSHANA, R.N.; TADESSE, G.; ABATE, G.; MIORNER, H. Use of 3 – (4 - 5 Dimethylthiazol - 2yl) – 2,5 – Diphenyl Tetrazolium Bromide for rapid detection of Rifampin – Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J. of Clinical Microbiol.** , 36 (5): 1214 – 1219, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. In vitro assays of BCG products. **WHO/TB/Techn. Guide/9**, 1977.

\_\_\_\_\_. Immunological Basis for Immunization/ Module 5: Tuberculosis. **WHO/EPI/GEN/93.15**, 1993.

\_\_\_\_\_. **Manual of laboratory methods.** VSQ / 97.04, Part I, 1997.

\_\_\_\_\_. **Meeting Report. WHO consultation on the characterization of BCG strains,** Imperial College, London 15 - 16 December 2003.

\_\_\_\_\_. **Meeting Report. WHO consultation on the characterization of BCG vaccines,** Geneva, Switzerland, 8 - 9 December, 2004.

\_\_\_\_\_. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for dried BCG vaccine. **WHO Techn. Rep. Ser. 329**, 1966.

\_\_\_\_\_. WHO Expert Committee on Biological Standardization: thirty-sixth report). **Technical Report Series N° 745**, 1987.

SHI, M.; KLEGERMAN, M.E.; GROVES, M.J. Viability of freeze-dried Tice™ – substrain BCG by bioluminescent measurement of adenosine triphosphate. **Microbios**, 59: 145 – 155, 1989.

SLADOWSKI, D.; STEER, S.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M. An improved MTT assay. **J. Immunol. Methods**, 157: 203 – 207, 1993.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE SCIENCE ET TECHNOLOGIE PHARMACEUTIQUE, 2002). Guide de Validation des Méthodes de Dosage Biologique. **STP Pharma Pratiques** 12(6), p. 1-20, 2002.

STAVRI, D. et al. Facteurs d'erreur intervenant dans la détermination du nombre d'unités viable du vaccin BCG lyophilisé. **Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.**, 33(2), p. 171-179, 1974.

## Anexo A

### Meios de Cultura: composição e preparo

#### Meio sólido de Lowenstein-Jensen

- Composição do meio base

Fosfato de potássio monobásico.....	2,5g
Sulfato de magnésio heptahidratado.....	0,24g
Dicitrato de tri-magnésio 14-hidratado.....	0,6g
L - asparagina.....	3,6g
Farinha de batata.....	30,0g
Verde malaquita.....	0,4g
Água destilada.....	600mL

- Preparo da base

- a) pesar, em recipiente de aço inoxidável com capacidade para 5 litros, a quantidade recomendada pelo fabricante para preparar 3600 mL de meio;
- b) adicionar 72 mL de glicerol;
- c) adicionar 3600 mL de água destilada e misturar utilizando bastão de vidro;
- d) aquecer até a dissolução completa dos ingredientes, **evitando a fervura do meio**;
- e) transferir para erlenmeyer com capacidade para 6 litros;
- f) autoclavar a 121 °C durante 15 minutos;
- g) pH final:  $4,8 \pm 0,2$  a 25 °C.

- Preparo da suspensão de ovos:

- a) utilizar 12 dúzias de ovos não embrionados de tamanho médio, de casca lisa sem ranhuras, com no máximo 01 semana de postura;
- b) lavar bem os ovos com água e detergente neutro utilizando escova;
- c) enxaguar em água corrente;
- d) enxaguar em água destilada;
- e) dispor os ovos dentro de um recipiente limpo, forrado com gaze, podendo ser armazenado à temperatura de 2 a 8 °C por no máximo 24 horas;
- f) colocar os ovos lavados em recipiente contendo álcool etílico a 70% durante 15 - 20 minutos;
- g) enxugar cada ovo com gaze;
- h) quebrar os ovos, colocar a clara e a gema em bécher esterilizado com capacidade para 1000 mL;
- i) bater o conteúdo, utilizando uma batedeira manual, até que seja obtido aspecto homogêneo;
- j) transferir para recipiente de vidro esterilizado com capacidade para 12 litros.

- Preparo e distribuição do meio:

- a) resfriar a base até aproximadamente 50 °C, agitar suavemente se necessário, e transferir para o recipiente contendo a suspensão de ovos;
- b) homogeneizar a mistura através de movimentos circulares;
- c) filtrar a mistura em gaze estéril disposta em recipiente de aço inoxidável, também estéril, com capacidade para 12 litros possuindo, na parte inferior, uma abertura conectada a uma cânula de borracha;
- d) colocar a mistura sob **permanente agitação** em agitador magnético e distribuir, assepticamente, através da cânula, 15 mL da mistura em tubos de ensaio 25 x 200 mm

providos de rolhas de gaze, tendo-se o cuidado de verter o meio somente em um lado do tubo e evitando a formação de bolhas;

e) pH final -  $7,0 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Coagulação do meio:

a) ligar o coagulador e aguardar até que seja atingida temperatura de  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;

b) acionar o registrador automático e realizar um primeiro ciclo de coagulação com o equipamento vazio, devendo assim permanecer a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos;

c) distribuir os tubos nas 4 bandejas do coagulador e prendê-los com fita adesiva tomando-se a precaução de manter a posição do envase e nunca encostar um tubo no outro, permitindo assim a circulação do ar;

d) introduzir as bandejas no coagulador somente quando a temperatura atingir  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;

e) depois de colocar as bandejas, esperar a temperatura atingir  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e coagular o meio durante 45 minutos a partir dessa temperatura;

f) retirar os tubos das bandejas e colocá-los em caixas plásticas para armazenamento;

g) repetir as etapas com todos os tubos envasados mantendo-se o início da coagulação sempre a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e nunca ultrapassando a temperatura de  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Condições de armazenamento

Armazenar os tubos de meio de cultura entre  $2$  e  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  acondicionados em caixas plásticas, ao abrigo da luz e identificados (número de cadastro do lote e data de preparo), por no máximo 2 meses.

## Meio Líquido Sauton 1/4

- Composição

Sulfato de magnésio heptahidratado .....	0,125g
Ácido cítrico monohidratado .....	0,55g
Fosfato dipotássico.....	0,125g
L-asparagina .....	1,0g
Citrato férrico de amônio .....	0,0125g
Glicerina.....	15mL
Água destilada .....	1000mL

- Preparo:

- a) dissolver todos os componentes sob aquecimento brando;
- b) esterilizar a 121 °C durante 15 minutos;
- c) pH final: 7,0 +/- 0,2 a 25°C.