

ELIANA PEREIRA DUARTE

**APRIMORAMENTO DA TÉCNICA DE REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZOL XTT
APLICADA AO CONTROLE DA VIABILIDADE DA VACINA BCG PRODUZIDA NO
BRASIL**

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2011

APRIMORAMENTO DA TÉCNICA DE REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZOL XTT
APLICADA AO CONTROLE DA VIABILIDADE DA VACINA BCG PRODUZIDA NO
BRASIL

ELIANA PEREIRA DUARTE

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de
Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância
Sanitária.

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Maria Esther de Magalhães Machado Tônus

Rio de Janeiro

2011

APRIMORAMENTO DA TÉCNICA DE REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZOL XTT
APLICADA AO CONTROLE DA VIABILIDADE DA VACINA BCG PRODUZIDA NO
BRASIL

ELIANA PEREIRA DUARTE

Aprovado em 23 de fevereiro de 2011

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta dos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle de Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ.

Prof. Dr. Antônio Eugenio C. C. de Almeida
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Prof^a. Dra. Maria Regina Branquinho
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Prof^a. Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Suplente)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Prof^a. Maria Esther de Magalhães Machado Tonus - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2011

Duarte, Eliana Pereira

Aprimoramento da técnica de redução do sal de tetrazol XTT aplicada ao controle da viabilidade da vacina BCG produzida no Brasil. / Eliana Pereira Duarte. – Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2011.

xii, 33 f. ; il.; tab.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária)
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde,
programa de pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011
Orientador: Maria Esther de Magalhães Machado Tonus

1. Vacinas. 2. Microbiologia – I. Título

A Deus;
À minha família, meu marido e minha filha;
À minha prima Fátima;
Aos meus amigos Esther e Antonio.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS, pela oportunidade de crescimento profissional;

À M. Esther M. Machado Tonus, pela orientação e pelos importantes conhecimentos transmitidos;

Ao colega de trabalho, Antonio Carlos G. de Vasconcellos pela colaboração na rotina do laboratório;

À Célia Romão pelo incentivo na realização deste trabalho;

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

RESUMO

A quantidade de bacilos viáveis presentes na vacina BCG é um importante requisito de qualidade deste produto, fazendo parte do controle exigido pela Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde. Este controle objetiva avaliar a viabilidade dos bacilos no produto final, a estabilidade da vacina após *stress* térmico (termoestabilidade), além de permitir o monitoramento da consistência da produção. A contagem de colônias em meio sólido é o método oficial recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Farmacopéia Brasileira para a determinação da viabilidade do BCG. A difícil dispersão do bacilo e seu crescimento lento conferem limitações ao método convencional, como a variabilidade dos resultados, a baixa reprodutibilidade e o prolongado tempo de análise. Este trabalho avaliou o método alternativo de redução do sal de tetrazol XTT modificado pelo uso de solução de cloreto de sódio 0,9% como diluente na determinação do número de viáveis em vacinas produzidas com BCG Moreau - RJ. O XTT é reduzido em formazana por ação enzimática das células metabolicamente ativas e a sua dosagem feita em leitor de ELISA. Por tratar-se de uma medida metabólica, a dosagem da formazana produzida proporcionalmente à respiração celular é um melhor indicador da viabilidade dos bacilos quando comparado aos métodos que dependem do cultivo e multiplicação celular. Foi demonstrada a redução do efeito *background* quando o uso do caldo Middlebrook 7H9 foi substituído por solução de cloreto de sódio 0,9% conferindo melhores ajustes lineares em 3, 24 e 48 horas e coeficiente de determinação (R^2) de 0,99 em conformidade com a resolução Nº 899/2003 da ANVISA referente à validação de métodos bioanalíticos. A considerável redução do tempo de ensaio de 4 semanas para no máximo 48 horas, o relativo baixo custo, a facilidade de execução da técnica e os resultados obtidos são fortes incentivos à continuação dos estudos de validação e de correlação dos resultados de viabilidade do BCG fornecidos pela redução do XTT com àqueles obtidos pela técnica convencional de contagem de colônias em Lowenstein-Jensen.

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

ABSTRACT

The quantity of bacilli present in BCG vaccine is an important quality requirement, as part of the control required by the Brazilian Ministry of Health. This control aims to evaluate the viability of the bacilli in the final product, the stability of the vaccine after thermal stress (thermal stability), and allows monitoring the consistency of production. The colony counting on solid medium is the official method recommended by the World Health Organization and by the Brazilian Pharmacopoeia. The hard spreadind of the bacillus and its slow growth are considered limitations to the conventional method, such as variability, low reproducibility and time consuming. The present work evaluated the alternative method of reduction of XTT salt of tetrazole modified by the use of using saline as diluent in determining the number of vaccines produced with viable BCG Moreau-RJ. XTT is reduced to formazan by enzymatic action of metabolically active cells and its measurement by ELISA reader. As a result of metabolic measurement, the quantity of formazan produced in proportion to cellular respiration is a better indicator of the viability of bacilli compared to methods depending on cultivation and cell multiplication. It has been demonstrated in our study the reduction of background effect when Middlebrook 7H9 broth was replaced by saline giving best linear fit after 3, 24 and 48 hours of incubation and coefficient of determination (R^2) of 0.99 in accordance with Resolution No. 899/2003 ANVISA on the validation of bioanalytical methods. The reduction of length of assay from 4 weeks to 48 hours, the relative low cost, easiness of the technique and the results are strong incentives to further studies on validation and correlation of the results of viability of BCG provided by reducing the XTT with those obtained by conventional technique of counting colonies on Lowenstein-Jensen.

Key words: vaccine, BCG, counting, colony.

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP – Adenosina 5'-trifosfato
BCG – Bacilo de Calmette e Guérin
BRABCG003 – Vacina de referência de trabalho lote 003
BSM – Bissulfato de sódio menadiona
CE – Carreador ou acoplador de elétrons
DO – Densidade ótica
ID - Intradérmico
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INPPAZ – Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis
LJ – Lowenstein-Jensen
mg - Miligrama
mL – Mililitro
nm - Nanômetro
OMS – Organização Mundial da Saúde
PNI - Programa Nacional de Imunizações
RJ – Rio de Janeiro
 R^2 – Coeficiente de determinação
SR – Solução de reação
TB – Tuberculose
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância
XTT - 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide
WHO – EPI – *World Health Organization – Expanded Programme on Immunization*
 μL - Microlitro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxograma do estudo de adaptação da técnica de redução do XTT ao controle da vacina BCG produzida no Brasil.....	06
FIGURA 2 – Soluções de XTT preparadas a 3 mg/mL com solução de cloreto de sódio 0,9% e com caldo Middlebrook 7H9.....	13
FIGURA 3 – Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelos controles negativo, de opacidade e pelas misturas preparadas como branco.....	14
FIGURA 4 – Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação, sem a correção da opacidade.....	17
FIGURA 5 – Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação, com a correção da opacidade.....	18
FIGURA 6 - Aspecto da reação em microplaca após 3, 24 e 48 horas de incubação.....	19

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelos controles negativo, de opacidade e pelas misturas preparadas como branco.....	13
TABELA 2 - Características dos ajustes de linearidade obtidos pelo método de redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação quando foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9% e caldo Middlebrook 7H9 no preparo das diluições da vacina.....	15
TABELA 3 - Ajustes de linearidade obtidos pelo método de redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação quando foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9%, com e sem correção da opacidade a cada diluição de vacina.....	16
TABELA 4 - Limites de detecção do método de redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação quando foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9%, com e sem correção da opacidade a cada diluição de vacina.....	19
TABELA 5 - Limites de quantificação do método de redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação quando foi utilizada salina 0,9%, com e sem correção da opacidade a cada diluição de vacina avaliada.....	20

LISTA DE QUADROS

Quadro I – Concentrações da vacina BRABCG003 analisadas para a construção das curvas analíticas.....	11
---	----

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	01
2 - OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	05
3 - MATERIAL E MÉTODOS	06
3.1 – Local de realização do estudo.....	06
3.2 – Fluxograma do estudo.....	06
3.3 – Vacina de referência de trabalho – BRABCG003.....	07
3.4 – Descrição da técnica de redução do XTT.....	07
3.4.1 – Sal de tetrazol XTT.....	07
3.4.2 – Carreador de elétrons (CE).....	08
3.4.3 – Solução de reação (SR).....	08
3.4.4 – Branco 1 (opacidade).....	08
3.4.5 – Branco 2 (inespecificidade dos diluentes).....	08
3.4.6 – Controle negativo.....	08
3.4.7 – Execução do ensaio.....	09
3.4.8 – Leitura.....	09
3.5 – Descrição das etapas do estudo.....	09
3.5.1 – 1ª Etapa – Avaliação do diluente usado na diluição das vacinas: solução salina ,9% e caldo Middlebrook 7H9.....	09
3.5.2 – 2ª Etapa – Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica usando ou não a correção do branco (opacidade).....	10
3.5.2.1 – Linearidade.....	10
3.5.2.2 – Sensibilidade.....	12
3.5.2.3 - Limite de detecção (LD).....	12
3.5.2.4 – Limite de quantificação (LQ)	12
4 – RESULTADOS	13
5 - DISCUSSÃO	21
6 – CONCLUSÕES	26
7 – PERSPECTIVAS	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO	34

1 - INTRODUÇÃO

O BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) vem sendo utilizado na prevenção da tuberculose (TB) 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).

A vacina consiste em uma suspensão liofilizada de bacilos, sendo sua ação equivalente àquela da infecção natural pelos bacilos virulentos, porém isenta de efeito patogênico e permanece sendo a única medida preventiva contra as formas mais graves da tuberculose - miliar ou disseminada e meníngea quando aplicada em crianças logo após o nascimento, sendo a proteção conferida em pelo menos 80% dos vacinados (FILHO et al., 1990; JANEIRO, 2003; AZAMBUJA et al., 2006).

Apesar da importância da vacina BCG no controle da TB na maior parte dos países onde a doença é endêmica, os relatos não permitem afirmar que exista a prevenção da infecção primária e da reativação da TB latente, não sendo assim comprovada a eficácia da vacina na prevenção da principal fonte de dispersão do patógeno na população e, portanto da forma pulmonar da TB. Assim apesar de sua ação controversa, em face dos resultados conflitantes quanto à sua eficácia protetora, o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) é o maior fornecedor de vacinas BCG, distribuindo mais de 120 milhões de doses por ano para mais de 100 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1999; RITZ et al, 2008).

A vacina empregada no Brasil é obtida pela técnica clássica de cultura de BCG na superfície de meio de cultura líquido Sauton. Após o período de incubação a 37 °C é feita a coleta dos véus, pesagem da massa bacilar, adição do diluente glutamato de sódio a 2% e homogeneização. A suspensão final é então envasada e liofilizada. A porcentagem de unidades viáveis ou partículas bacterianas cultiváveis é então determinada, havendo sempre uma queda do número de BCG viáveis devido ao *stress* do processo de liofilização (BLOOM; FINE, 1994).

Apesar da aparente simplicidade desse método tradicional de produção, aspectos importantes devem ser cuidadosamente observados para que se obtenha o produto final de acordo com as especificações de qualidade necessárias.

A vacina BCG no organismo funciona como uma infecção artificial que, como outras micobactérias, é capaz de induzir alguma proteção contra a TB. Assim uma

vez administrado, o BCG induz a sensibilização do organismo, desencadeando a resposta imune celular. Portanto, existe a necessidade de multiplicação e permanência do BCG viável no organismo, sendo a quantidade de bacilos viáveis presente na vacina um fator essencial à intensidade e duração da proteção conferida pelo produto e assim um requisito de qualidade essencial no controle da qualidade do mesmo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993).

A Série de Requerimentos Técnicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a vacina BCG liofilizada reúne critérios mínimos necessários à produção e ao controle da qualidade da vacina. São citadas avaliações durante o processo de produção e no produto final, objetivando garantir a segurança e eficácia do produto. Composto assim o controle, avalia-se a quantidade de bacilos viáveis, termoestabilidade, sensibilidade tuberculínica, extensão de reações cutâneas em animais, pesquisa de micobactéria virulenta, identidade de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e esterilidade bacteriana e fúngica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio sólido é a técnica oficialmente recomendada pela Farmacopéia Brasileira e pela OMS para a determinação da viabilidade do BCG e da termoestabilidade da vacina. Consiste no preparo de diluições da vacina em meio de cultura líquido, inoculação de volumes destas diluições na superfície de meio sólido de sensibilidade comprovada como Lowenstein-Jensen, Ogawa e Middlebrook 7H11, indicados pela OMS, e incubação a 37 ± 1 °C por quatro a cinco semanas e contagem das colônias. Já a Farmacopeia Brasileira prevê a utilização do meio sólido de Lowenstein-Jensen. O resultado é expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) do produto reconstituído conforme orientação do fabricante (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977; BRASIL, 2010).

As condições experimentais para a realização dessa técnica requerem cuidadosa padronização, para que o tratamento estatístico demonstre a inexistência de variações que ultrapassem àquelas previstas pela distribuição de Poisson, e que são atribuídas a erros experimentais. Mesmo assim vários autores ainda se referem à técnica como de grande variabilidade e baixa reprodutibilidade, sobretudo para a

vacina preparada por meio da técnica tradicional de cultivo na superfície de meio líquido.

A OMS, reforça a problemática decorrente da utilização da contagem em meio sólido, apontando a necessidade da busca de métodos alternativos, dentre os quais a dosagem de ATP (adenosina trifosfato), a redução de sais de tetrazol e outros métodos bioquímicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006; 2010).

Segundo Liu e colaboradores (1997), os sais de tetrazol vêm sendo empregados como indicadores de reações de oxido-redução em sistemas vivos desde 1894 e como receptores de elétrons, estes compostos catiônicos são reduzidos por ação enzimática, gerando produtos com coloração intensa detectável espectrofotometricamente e expressos em densidade ótica. A reação consiste na conversão do sal oxidado em formazana reduzida, cuja dosagem é feita com base na alteração de coloração e intensidade do substrato original da reação (ALTMAN, 1974).

A dosagem da formazana produzida proporcionalmente à respiração celular é um melhor indicador de viabilidade quando comparado aos métodos que dependem do cultivo e multiplicação celular, por se tratar de uma medida de atividade metabólica (NIKŠ; OTTO, 1990; ROSLEV; KING, 1993).

O INCQS realiza desde 1984 o controle da vacina BCG-ID usada pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MS), avaliando a qualidade de aproximadamente 250 lotes /ano, fornecendo assim subsídios que garantam o uso do produto em conformidade com as especificações da Farmacopéia Brasileira e da OMS.

Desta forma, os lotes de vacina BCG são avaliados quanto à esterilidade bacteriana e fúngica, determinação de unidades viáveis do BCG, termoestabilidade, homogeneidade, identidade para BAAR, pesquisa de micobactérias virulentas e pH.

A análise de viabilidade e termoestabilidade da vacina BCG é realizada pela técnica de contagem em meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ) conforme recomendação da OMS e da Farmacopéia Brasileira (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987; BRASIL, 2010). No entanto, tendo em vista as limitações oferecidas por este método e a constante necessidade do aprimoramento do controle e da melhoria da qualidade dos resultados, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos alternativos que ofereçam maior precisão. De fato, existe a necessidade da

revisão dos requerimentos de qualidade da vacina BCG em vigor visando a atualização de metodologias e padrões empregados no controle, conforme abordado em recentes encontros de especialistas da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2003; 2004c; 2006; 2010).

A técnica de redução do sal de tetrazol XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfenil)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) apresenta indicadores como precisão e especificidade (KAIRO et al, 1999), que a favorecem no que se refere à adequação aos parâmetros de desempenho de métodos conforme disposto na Resolução nº 899 / 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2003).

A avaliação da redução do XTT no controle da viabilidade da vacina BCG no INCQS demonstrou também aspectos vantajosos relacionados à redução do tempo de análise (3 a 48 horas), praticidade na execução e relativo baixo custo, uma vez que independe de equipamento específico, mas somente de leitor de ELISA. No entanto os estudos realizados até o momento evidenciaram a existência de efeito *background* atribuído provavelmente a componentes do caldo Middlebrook 7H9 empregado na técnica para o preparo da solução XTT e diluição das vacinas. Observações relacionadas aos controles e brancos avaliados em paralelo evidenciaram a importância do estudo e adequação do método e reagentes à natureza do produto analisado, em nosso caso a matriz da vacina, tendo em vista a detecção de interferentes que podem alterar a sensibilidade do método. Portanto, as avaliações desta técnica devem incluir um maior detalhamento dos procedimentos de preparo e tratamento dos dados fornecidos por estes controles (TONUS, 2008).

2 - OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 – Aprimorar a técnica de redução do sal de XTT ao controle da viabilidade da vacina BCG produzida no Brasil.

2.1.1 – Comparar o efeito *background* quando o caldo Middlebrook 7H9 é substituído por solução de cloreto de sódio 0,9%, através das densidades óticas;

2.1.2 - Avaliar o efeito do caldo Middlebrook 7H9 e da solução de cloreto de sódio 0,9% no ajuste linear de ensaios realizados com cada um destes diluentes.

2.1.3 – Avaliar os seguintes parâmetros de desempenho da técnica quando se utiliza solução de cloreto de sódio 0,9% como diluente: linearidade, sensibilidade e limites de detecção e de quantificação.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do estudo

O estudo foi desenvolvido no Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3.2. Fluxograma do estudo

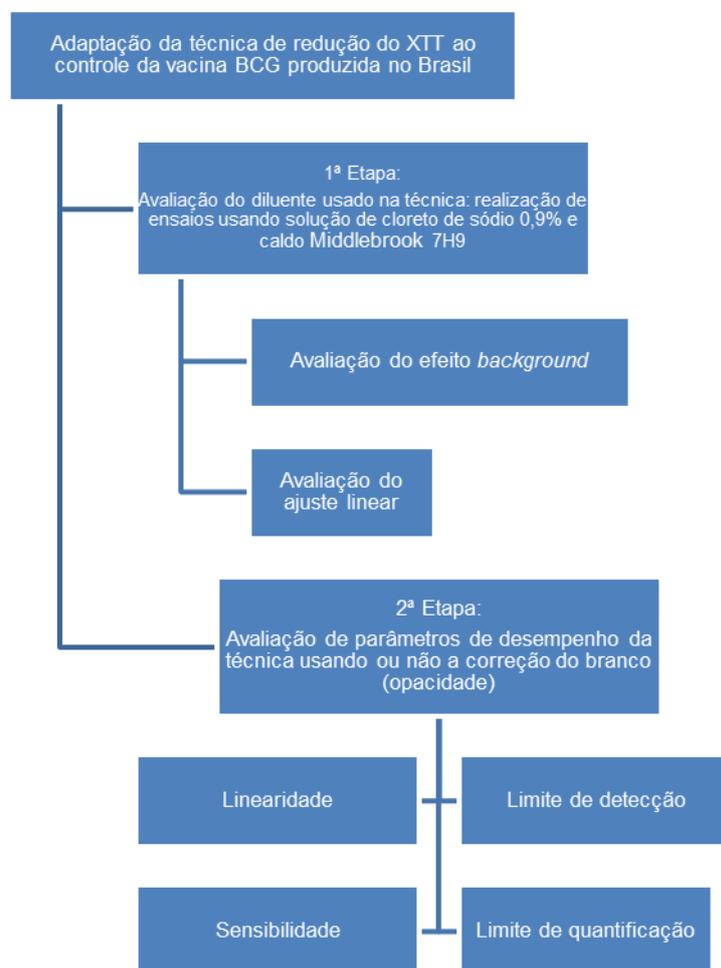


FIGURA 1 – Fluxograma do estudo de adaptação da técnica de redução do XTT ao controle da vacina BCG produzida no Brasil.

3.3. Vacina de referência de trabalho - BRABCG003

Foi empregado o lote de vacina de referência de trabalho BRABCG003 (cepa Moreau - RJ) produzido pela Fundação Atauilho de Paiva em 1996. Este lote é usado na rotina do controle do INCQS e dos fabricantes nacionais da vacina BCG desde 1998, após ter sido avaliado no fabricante, no INCQS e no Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ). Nessa ocasião o lote foi avaliado quanto à esterilidade bacteriana e fúngica, vácuo, hipersensibilidade tuberculínica, pesquisa de micobactéria virulenta em cobaias, homogeneidade e identidade BAAR, viabilidade e termoestabilidade.

Cada ampola contém 50 doses (5 mg) de uma suspensão liofilizada de BCG preparada em glutamato de sódio a 2%. As ampolas são mantidas a temperaturas iguais ou inferiores a – 18 °C e reconstituídas com 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%.

Nos ensaios convencionais de contagem de unidades viáveis de BCG em meio de cultura sólido de LJ, esta vacina fornece contagem média de 9×10^6 UFC/mL conforme gráfico de controle de Shewhart mantido no Setor de Vacinas / BCG do Departamento de Microbiologia para monitoramento dos procedimentos de ensaio (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004b).

3.4 - Descrição da técnica de redução do XTT

3.4.1 - Sal de tetrazol XTT:

As soluções a 3 mg/mL do sal de tetrazol XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) Sigma® (95% de pureza) foram preparadas no momento de uso, utilizando-se solução de cloreto de sódio 0,9% (ANEXO) e aquecimento em banho termostático a 60 °C durante 30 minutos para a solubilização do sal de tetrazol e posterior esterilização por filtração em membrana de 0,22 µm.

Na primeira etapa deste estudo a coloração inicial da solução de XTT foi avaliada utilizando-se caldo Middlebrook 7H9 para o preparo da solução de sal.

3.4.2 - Carreador de elétrons (CE):

Foi utilizado bissulfato de sódio menadiona (BSM) Sigma® a 10 mg/mL em solução tampão fosfato 0,005M pH 7,4 (ANEXO). A solução foi preparada, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm e congelada a -70 °C até o momento de uso.

3.4.3 - Solução de reação (SR):

As soluções de reação foram preparadas no momento de uso adicionando-se 10 µL da solução de CE (3.4.2) a cada mililitro das soluções de XTT (3.4.1).

3.4.4 – Branco 1 (opacidade):

O branco 1 foi preparado para desconto (correção) da opacidade a partir de 100 µL de cada diluição da vacina acrescidos de 25 µL de solução de cloreto de sódio 0,9%, em triplicatas preparadas em microplaca de 96 poços de fundo plano.

As misturas foram homogeneizadas suavemente em agitador orbital de placas por 1 minuto e incubadas em câmara úmida a 37 +/- 1 °C por 3, 24 e 48 horas.

3.4.5 – Branco 2 (inespecificidade do diluente):

O branco 2 foi preparado para controle de inespecificidade originada pelo diluente usado no preparo das diluições seriadas da vacina. Consistiu em 100 µL do diluente empregado (caldo Middlebrook 7H9 sem enriquecimento ou solução de cloreto de sódio 0,9%) acrescidos de 25 µL de SR (3.4.3).

3.4.6 – Controle negativo:

O controle negativo foi preparado para controle de inespecificidade originada pela matriz da vacina. Consistiu em 100 µL de vacina inativada por calor (1 hora a 70°C em banho-maria) acrescidos de 25 µL de SR (3.4.3).

3.4.7 - Execução do ensaio:

Volumes de 100 μL da vacina reconstituída ou das suas diluições foram depositados, em triplicata, em placas de 96 poços de fundo plano e foram acrescentados 25 μL de SR (3.4.3).

As misturas foram homogeneizadas suavemente em agitador orbital de placas por 1 minuto e incubadas em câmara úmida a 37 +/- 1°C por 3, 24 e 48 horas.

3.4.8 – Leitura:

A leitura foi realizada em leitor de microplacas Bio-Rad modelo 3550 em comprimento de onda de 450 nm e filtro de referência de 655 nm.

Quando realizado, o desconto branco foi feito através da subtração da densidade ótica média do branco 1 (3.4.4) das densidades óticas obtidas para as misturas de vacina e SR (3.4.3).

3.5. Descrição das etapas do estudo

3.5.1 - 1ª etapa - Avaliação do diluente usado na diluição das vacinas e no preparo das soluções de XTT: solução de cloreto de sódio 0,9% e caldo Middlebrook 7H9 sem enriquecimento

Esta etapa do estudo consistiu em um ensaio para avaliação paralela, e em triplicata, do uso de solução de cloreto de sódio 0,9% e de caldo Middlebrook 7H9 sem enriquecimento no preparo das diluições da vacina de referência de trabalho BRABCG003 e períodos de incubação de 3, 24 e 48h. Foram estudados os ajustes lineares das curvas preparadas com cada um dos diluentes empregados, com base nos coeficientes de determinação e angular e *lack-of-fit*.

A avaliação do efeito *background* foi realizada com base nos valores de densidade ótica fornecidos pelo controle negativo (3.4.6) pelos brancos 2 preparados com os diferentes diluentes (3.4.5). Para a complementação das avaliações foram preparadas em paralelos duas soluções do sal de tetrazol XTT, utilizando-se solução de cloreto de sódio 0,9% e caldo Middlebrook 7H9 para a observação da coloração inicial da solução de reação.

3.5.2 - 2ª Etapa - Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica com e sem a correção do branco 1 (opacidade)

A avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica foi realizada a partir de curvas analíticas construídas com base em 3 ensaios realizados em momentos diferentes.

3.5.2.1 - Linearidade

O estudo da linearidade foi realizado para verificar se o método é capaz de produzir resultados diretamente proporcionais à quantidade de unidades viáveis de BCG em uma determinada faixa de concentração da vacina.

A faixa de trabalho foi definida com base nos valores de referência especificados na Farmacopéia Brasileira para a vacina BCG - ID (BRASIL, 2010): 2 a 10×10^6 UFC/mL para o produto mantido conforme orientação do fabricante e ao menos 20% do limite mínimo de referência para avaliação da termoestabilidade.

Conforme esquema apresentado no QUADRO 1, a faixa de trabalho se estendeu de $0,28 \times 10^6$ a 18×10^6 UFC/mL com sete diluições espaçadas por fator de diluição 2.

Para a execução de cada ensaio incluído na construção de cada uma das curvas analíticas foi empregada uma ampola da vacina de referência de trabalho BRABCG003, cujo número médio de unidades viáveis corresponde a 9×10^6 UFC/mL (3.3) em ensaios de contagem em meio sólido de Lowenstein-Jensen realizados na rotina do Setor de Vacinas / BCG do Departamento de Microbiologia.

Para a obtenção da maior concentração da faixa de trabalho (18×10^6 UFC/mL), empregou-se a metade do volume de diluente recomendado para a reconstituição de uma ampola da vacina BRABCG003, iniciando-se a diluição com o produto reconstituído a 2 mg/mL e portanto duplamente concentrado (QUADRO 1).

Para o preparo de cada diluição seriada foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9%.

QUADRO I. Concentrações da vacina BRABCG003 analisadas para a construção das curvas analíticas.

Concentração (mg/mL)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
Concentração * (x 10 ⁶ UFC/mL)	18,0	9,0	4,5	2,25	1,125	0,562	0,28

* Considerando o valor médio de 9 x 10⁶ UFC/mL.
UFC – Unidade Formadora de Colônias.

Para a estimativa dos parâmetros da reta de regressão - coeficientes angular e linear, coeficiente de determinação R^2 , testes F para avaliação da existência de inclinação significativa (5%) e cálculo de desvio significativo de linearidade - *lack-of-fit* (5%) - foi utilizada a pasta de Avaliação da linearidade / ANOVA, desenvolvida pela Coordenação do Programa da Qualidade do INCQS por meio do Microsoft Excel e validada por reprodução manual dos resultados.

O cálculo da concentração medida da vacina foi realizado por aplicação da densidade ótica média produzida pela formazana nas misturas de vacina e solução de reação na equação da reta conforme segue:

$$y = a + bx,$$

onde: y = densidade ótica medida e corrigida da formazana na vacina em análise;

x = concentração (mg/mL) da vacina em análise;

a = coeficiente linear (intercepto da linha de regressão);

b = coeficiente angular (inclinação da curva de regressão).

Para a expressão do resultado em UFC/mL, a concentração medida (x) foi multiplicada pela concentração média de viáveis da vacina de referência de trabalho BRABCG003 (9 x 10⁶ UFC/mL).

3.5.2.2 - Sensibilidade

A sensibilidade do método consiste na variação das densidades óticas obtidas em função da concentração de unidades viáveis de BCG na vacina.

Este parâmetro de desempenho foi expresso como a inclinação da curva de regressão, ou seja, o coeficiente angular que deve ser não nulo para que o método seja considerado válido quanto à sensibilidade.

3.5.2.3 - Limite de detecção (LD)

O limite de detecção consiste na menor concentração de unidades viáveis de BCG presente na vacina que pode ser detectada pelo método.

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a fórmula a seguir conforme orientação do Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2010):

$$LD = \bar{\chi} + ts$$

Onde: $\bar{\chi}$ = média dos valores de densidade ótica obtidos nos controles negativos (3.4.6);

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$ = valor da abscissa t (Student) para $(1-\alpha) \times 100\%$ nível de confiança e $(n-1)$

graus de liberdade;

s = desvio padrão dos valores de densidade ótica obtidos nos controles negativos

(3.4.6).

3.5.2.4 - Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação consiste na menor concentração de unidades viáveis de BCG presente na vacina que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão.

Para o cálculo do limite de quantificação foi utilizada a fórmula a seguir conforme orientação do INMETRO (INMETRO, 2010):

$$LQ = \bar{\chi} + 5s$$

Onde: $\bar{\chi}$ = média dos valores de densidade ótica obtidos nos controles negativos (3.4.6);

s = desvio padrão dos valores de densidade ótica obtidos nos controles negativos

(3.4.6).

4 – RESULTADOS

4.1 - 1ª etapa - Avaliação do diluente usado na diluição das vacinas e no preparo da solução de XTT: solução de cloreto de sódio 0,9% e caldo Middlebrook 7H9

A diferença de coloração da solução quando foi empregada a solução de cloreto de sódio 0,9% e o caldo Middlebrook 7H9 pôde ser evidenciada no momento da adição destes diluentes ao XTT para a solubilização (FIGURA 2). A ausência de coloração na solução preparada com solução de cloreto de sódio 0,9% demonstrou ser este diluente mais adequado ao preparo da solução de reação.

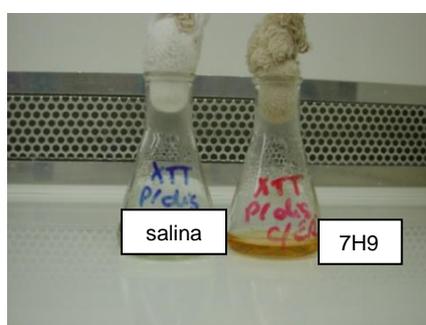


FIGURA 2 – Soluções de XTT preparadas a 3 mg/mL com solução de cloreto de sódio 0,9% e com caldo Middlebrook 7H9.

Os valores de densidade ótica fornecidos pelo controle negativo e pelos brancos preparados com os dois tipos de diluente nos três períodos de incubação avaliados, encontram-se relacionados na TABELA 1 e permitem, como melhor visualizado na FIGURA 3, a caracterização destes interferentes.

TABELA 1. Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelos controles negativo, de opacidade e pelas misturas preparadas como branco.

Tempo (h)	Controle negativo (vacina inativada + SR)	Branco 1 (opacidade) ^a (vacina + s. salina 0,9%)	Branco 2	
			(s.salina 0,9% + SR)	(7H9 + SR)
3	0,042	0,073	0,01	0,013
24	0,054	0,076	0,018	0,027
48	0,053	0,062	0,015	0,033

^a - Vacina duplamente concentrada

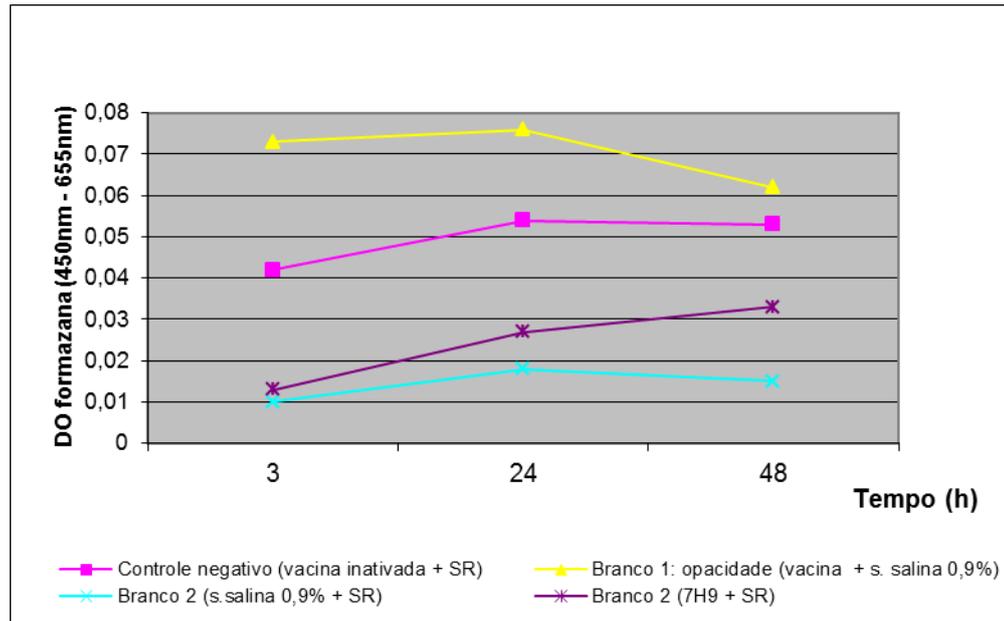


FIGURA 3. Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelos controles negativo, de opacidade e pelas misturas preparadas como branco.

Assim o branco 1, apesar de ter sido preparado com a vacina duplamente concentrada em relação ao controle negativo, indica ser a opacidade normal da vacina um importante fator a ser considerado na interpretação dos resultados.

Os brancos 2 indicaram haver inespecificidade proveniente do diluente, pois a densidade ótica produzida pelo caldo Middlebrook 7H9 mostrou-se mais elevada do que aquela produzida pelo controle preparado somente com solução de cloreto de sódio 0,9%, diferença esta acentuada com o decorrer do tempo de incubação.

O controle negativo indicou que mesmo inativada a vacina forneceu, quando em contato com o XTT, densidades óticas que se elevaram após 3 horas e se estabilizaram após 24 horas, demonstrando a interferência de componentes da matriz da vacina.

A TABELA 2 reúne os dados dos ajustes obtidos a partir das curvas realizadas para avaliação do efeito do caldo Middlebrook 7H9 e da solução de cloreto de sódio 0,9% usados para diluir a vacina BRABCG003.

Observa-se que com o uso do caldo Middlebrook 7H9 houve desvio significativo de linearidade ($p < 0,05$), conforme indicado pelos valores do *lack-of-fit*, mesmo com a eliminação da maior concentração para períodos 3 e 24 horas de incubação. Já quando as diluições foram preparadas com solução de cloreto de

sódio 0,9% todos os parâmetros avaliados indicaram ajuste adequado de linearidade em toda a extensão da faixa de trabalho.

Os coeficientes angulares significativos ($p < 0,05$) indicam a existência de sensibilidade da técnica independente do diluente empregado no ensaio.

TABELA 2. Características dos ajustes de linearidade obtidos pelo método de redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação quando foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9% e caldo Middlebrook 7H9 no preparo das diluições da vacina.

Tempo (h)	Solução de cloreto de sódio 0,9%				Caldo Middlebrook 7H9			
	Coeficiente angular ^a	R ²	Lack-of-fit ^b	Faixa de trabalho (mg/mL)	Coeficiente angular ^a	R ²	Lack-of-fit ^b	Faixa de trabalho (mg/mL) ^c
3	$p < 0,05$	0,99	$p \geq 0,05$	0,031 a 2,0	$p < 0,05$	0,99	$p < 0,05$	0,031 a 1,0
24	$p < 0,05$	0,99	$p \geq 0,05$	0,031 a 2,0	$p < 0,05$	0,99	$p < 0,05$	0,031 a 1,0
48	$p < 0,05$	0,99	$p \geq 0,05$	0,031 a 2,0	$p < 0,05$	0,99	$p < 0,05$	0,031 a 2,0

^a - $p < 0,05$ indica coeficiente angular não nulo, ou seja a existência de inclinação da curva de regressão linear.

^b - $p \geq 0,05$ indica ausência de desvio significativo dos resíduos.

^c - 6 ou 7 diluições avaliadas.

4.2 - 2ª Etapa - Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica com ou sem a correção do branco 1 (opacidade)

Os resultados do estudo de linearidade da técnica encontram-se na TABELA 3. Os ajustes lineares foram obtidos com ou sem o desconto das densidades óticas relativas à opacidade de cada diluição da vacina. Em ambos os casos os ajustes lineares (*lack-of-fit*, $p \geq 0,05$) foram obtidos somente após a redução da faixa de trabalho pela eliminação das menores concentrações da vacina.

Desta forma, a faixa linear de trabalho do método ficou entre 1,1 e $18,0 \times 10^6$ UFC/mL após 24 a 48 horas de incubação.

TABELA 3. Estudo da linearidade^a do método de redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação quando foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9%, com e sem correção da opacidade a cada diluição de vacina.

	Tempo (h)	R ²	Faixa de trabalho abrangida		Concentração de viáveis (x 10 ⁶ UFC/mL)	
			mg/mL	DO	Teórica	Medida ^b
Sem correção de opacidade	3	0,99	0,25 a 2,0	0,043 a 0,411	2,25 a 18,0	2,3 a 18,03
	24	0,99	0,125 a 2,0	0,098 a 1,969	1,125 a 18,0	1,0 a 17,99
	48	0,99	0,125 a 2,0	0,103 a 2,486	1,125 a 18,0	1,16 a 18,02
Com correção de opacidade	3	0,99	0,25 a 2,0	0,036 a 0,347	2,25 a 18,0	2,28 a 17,99
	24	0,99	0,125 a 2,0	0,092 a 1,889	1,125 a 18,0	1,04 a 18,02
	48	0,99	0,125 a 2,0	0,097 a 2,419	1,125 a 18,0	1,14 a 17,99

^a - Os ajustes de linearidade apresentaram coeficiente angular não nulo ($p < 0,05$) e inexistência de desvio significativo dos resíduos (*lack-of-fit*, $p \geq 0,05$).

^b - Valores obtidos por aplicação das equações de ajuste da reta de regressão. R² = coeficiente de determinação. DO = densidade ótica.

As FIGURAS 4 e 5 ilustram os ajustes lineares antes e após o desconto dos valores relativos aos controles de opacidade.

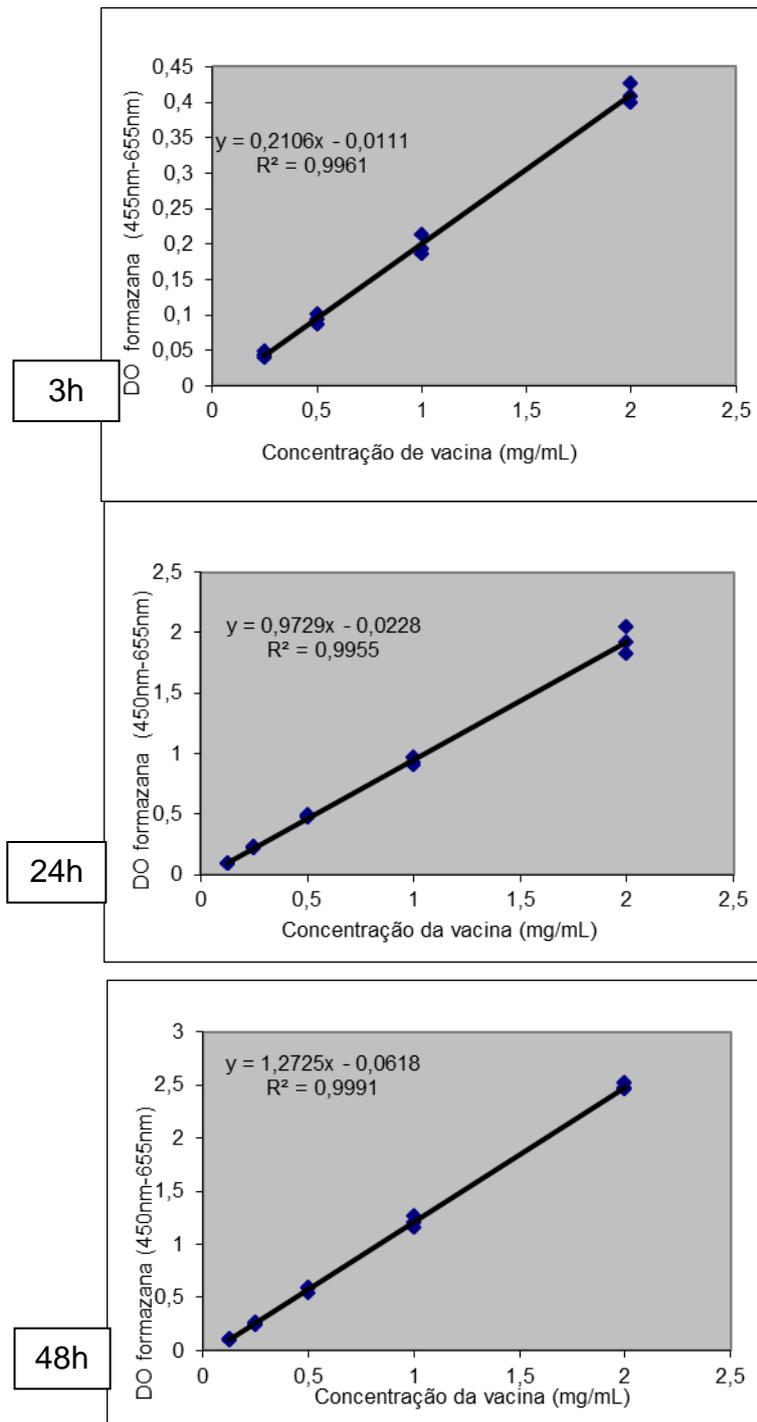


FIGURA 4. Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação, sem a correção da opacidade. DO – Densidade ótica. y = densidade ótica da formazana presente na vacina em análise. x = concentração (mg/mL) conhecida ou teórica da vacina. R^2 = coeficiente de determinação.

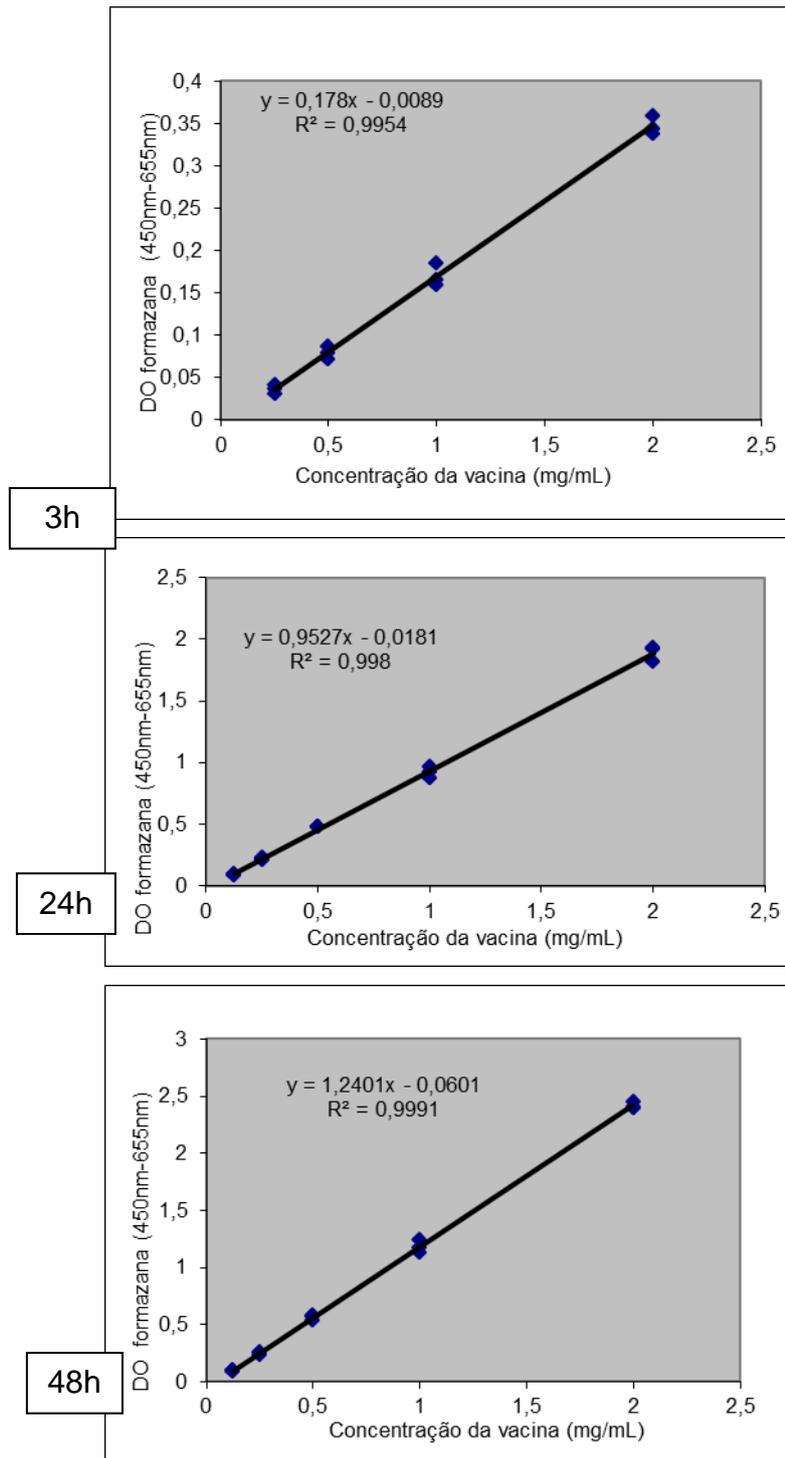


FIGURA 5. Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação, com a correção da opacidade. DO – Densidade ótica. y = densidade ótica da formazana presente na vacina em análise. x = concentração (mg/mL) conhecida ou teórica da vacina. R^2 = coeficiente de determinação.

A FIGURA 6 ilustra a reação em microplaca, destacando-se as diferenças na intensidade da coloração resultantes das diluições decrescentes de vacina. Evidenciou-se igualmente a ausência de coloração nas sequencias do branco 1, uma vez que não foi acrescentada solução de reação. O aumento de intensidade de coloração decorrente da reação de redução pelo BCG viável foi evidenciado com o aumento do tempo de incubação, o que não ocorreu no controle negativo e nos brancos 1 e 2.

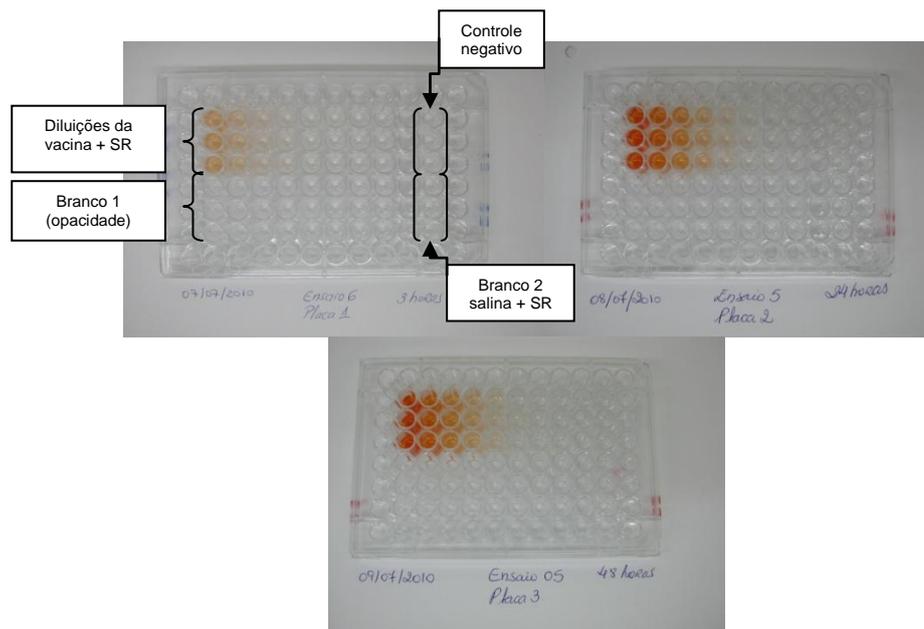


FIGURA 6. Aspecto da reação em microplaca após 3, 24 e 48 horas de incubação. SR = solução de reação.

As TABELAS 4 e 5 reúnem os dados relativos aos limites de detecção e de quantificação, obtidos a partir dos valores de densidade ótica por meio da equação da reta de regressão e convertidos em concentração de unidades viáveis de BCG (3.5.2.1).

TABELA 4. Limites de detecção do método de redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação quando foi utilizada salina 0,9%, com e sem correção da opacidade a cada diluição de vacina.

	Tempo (h)	Concentração		
		mg/mL	Densidade optica	Número de viáveis (UFC/mL)
Sem correção de opacidade	3	0,053	0,304	$2,7 \times 10^6$
	24	0,071	0,086	$0,77 \times 10^6$
	48	0,082	0,113	$1,02 \times 10^6$
Com correção de opacidade	3	0,023	0,179	$1,61 \times 10^6$
	24	0,042	0,063	$0,53 \times 10^6$
	48	0,054	0,092	$0,82 \times 10^6$

TABELA 5. Limites de quantificação do método de redução do XTT após 3, 24 e 48 horas de incubação quando foi utilizada salina 0,9%, com e sem correção da opacidade a cada diluição de vacina avaliada.

	Tempo (h)	Concentração		
		mg/mL	Densidade optica	Número de viáveis (UFC/mL)
Sem correção de opacidade	3	0,88	0,471	$4,23 \times 10^6$
	24	0,116	0,131	$1,18 \times 10^6$
	48	0,127	0,149	$1,34 \times 10^6$
Com correção de opacidade	3	0,059	0,381	$3,43 \times 10^6$
	24	0,087	0,11	$0,99 \times 10^6$
	48	0,099	0,128	$1,15 \times 10^6$

5 – DISCUSSÃO

A sobrevivência do bacilo às etapas críticas do processo clássico de produção da vacina BCG faz da quantidade de unidades viáveis presentes no produto final um importante indicador de sua qualidade e consistência de produção, além de permitir a avaliação da termoestabilidade, ou seja, resistência do bacilo ao *stress* térmico (MILSTIEN; GIBSON, 1990; LUGOSI, 1992). As avaliações da viabilidade devem demonstrar quantidades aceitáveis de unidades viáveis do BCG de acordo com os limites estabelecidos na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

As limitações oferecidas pelo método convencional de contagem de colônias em meio sólido, as características do micro-organismo de difícil dispersão e crescimento lento, bem como as dificuldades na padronização das condições de trabalho, são fortes incentivos ao desenvolvimento e validação de métodos alternativos de maior precisão e simplicidade de execução (STAVRI et al., 1974; GHEORGHIU; LAGRANDERIE, 1979; KAIRO et al., 1999; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006).

Segundo Jensen e colaboradores (2008) as dosagens bioquímicas da viabilidade, sobretudo aquelas baseadas na função enzimática, são capazes de detectar atividade metabólica preservada pelos bacilos durante a liofilização, mas que bem provavelmente se perde durante a semeadura em meio sólido. Consequentemente, apenas as bactérias com atividade metabólica suficiente para superar as condições impostas pelo crescimento em meio sólido são capazes de formar colônias. Isto pode acarretar a subestimativa do número de viáveis presentes no produto final liofilizado e dificuldades nos estudos de correlação de resultados com a técnica convencional.

Dentre os métodos bioquímicos estudados, a redução dos sais de tetrazol em formazana quantificável por colorimetria, vem sendo avaliada com resultados encorajadores obtidos por diferentes autores em avaliações de vacinas preparadas com diferentes subcepas de BCG (KAIRO et al., 1999; STEFANOVA; ZHELEV, 2003; JANASZEK-SEYDLITZ, 2004; ARGÜELLES et al., 2004; 2005; TONUS, 2008).

Segundo Tonus (2008) o caldo Middlebrook 7H9 empregado no preparo das soluções do XTT e na diluição das vacinas foi capaz de produzir elevado

background. Existe a necessidade do estudo de interferentes na estruturação do teste com o propósito de conhecê-los e buscar alternativas capazes de reduzir o seu efeito. O efeito *background* pode alterar a sensibilidade do sistema detector que mede o analito, neste caso o número de unidades metabolicamente ativas do BCG. Deste modo, uma vez caracterizado o tipo de interferente, o seu efeito pode ser corrigido, dependendo do erro produzido ser do tipo constante ou proporcional (INMETRO, 2010).

As densidades óticas produzidas pelos controles preparados por Tonus (2008) foram sempre bem maiores do que as obtidas no presente estudo, o que foi provavelmente decorrente do uso do caldo Middlebrook 7H9 acrescido de solução de enriquecimento já no preparo da solução do sal de tetrazol XTT. De fato esta diferença pôde ser evidenciada ao prepararmos em paralelo as duas soluções apresentadas na FIGURA 2. O uso do caldo Middlebrook 7H9, mesmo isento de solução de enriquecimento, para a solubilização do sal de tetrazol XTT conferiu coloração inespecífica imediatamente após a sua adição ao pó reagente e intensificação durante o aquecimento.

Portanto, no presente estudo, o efeito *background* supostamente produzido pelo caldo Middlebrook 7H9, foi de fato evidenciado pelas diferenças entre as densidades óticas mais elevadas produzidas pelo branco 2 preparado com caldo Middlebrook 7H9 em comparação com o branco 2 preparado somente com solução de cloreto de sódio 0,9% (TABELA 1). A FIGURA 3 permite verificar que as densidades óticas do branco 2 preparado com solução de cloreto de sódio 0,9% permanecem praticamente constantes e bem próximas de zero ao longo do período máximo de incubação avaliado de 48 horas, sendo portanto um interferente de efeito constante e desprezível. Desta forma, pode-se dizer que a substituição do caldo Middlebrook 7H9, usado por Kairo e colaboradores (1999) e Tonus (2008) por solução de cloreto de sódio 0,9%, permitiu eliminar o efeito de um interferente.

De fato, os resultados também obtidos na primeira fase do estudo e apresentados na TABELA 2, demonstram claramente que apesar da adequação dos coeficientes angular e de determinação (R^2) aos critérios de ajuste de linearidade, a análise da significância dos resíduos (*lack-of-fit*) evidenciou desvio de linearidade quando foi empregado o caldo Middlebrook 7H9 no preparado das diluições da vacina, o que não foi revertido mesmo com a eliminação da maior concentração da

faixa de trabalho nos períodos de 3 e 24 horas de incubação. Esta observação reforça ser a solução de cloreto de sódio 0,9% mais adequada do que o caldo Middlebrook 7H9 para a diluição da vacina avaliada no presente estudo pela técnica de redução do XTT.

Os melhores ajustes lineares obtidos por Tonus (2008) ao empregar o XTT a 1 mg/mL podem ser decorrentes da interferência do caldo Middlebrook 7H9 enriquecido empregado tanto para solubilizar o sal, como diluir a vacina. Ao reduzir a concentração do sal de 3 mg/mL para 1 mg/mL, o *background* foi igualmente reduzido, porém sua interferência não foi eliminada podendo ter ocorrido quantificação inespecífica. Isto justifica também a redução da faixa linear quando o mesmo autor prolongou o período de incubação de 3 para 24 e 48 horas.

Já o controle negativo preparado com vacina reconstituída com solução de cloreto de sódio 0,9% e inativada por calor permitiu avaliar a interferência da matriz da vacina, principalmente do glutamato de sódio empregado no preparo da suspensão final de BCG. Os valores de densidade ótica fornecidos pelos controles negativos foram sempre inferiores àqueles fornecidos pelos controles de opacidade (branco 1). Deve-se notar, no entanto, que a vacina empregada para o controle de opacidade nesta primeira etapa do estudo encontrava-se duplamente concentrada. De qualquer forma, estes dois controles permitiram constatar a interferência da matriz do produto, tornando adequado avaliar a técnica mediante a correção dos valores de densidade ótica fornecidos a cada diluição da vacina sem a adição da solução de reação contendo o XTT. Este procedimento permite assim a correção do erro proporcional decorrente da inespecificidade de componentes presentes na matriz da vacina.

Os ajustes lineares obtidos no presente estudo (TABELA 3), estão em conformidade acordo com a Resolução nº 899 / 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) que dispõe dos requisitos necessários à validação de métodos bioanalíticos. O desconto da densidade ótica fornecida pelo controle de opacidade a cada diluição da vacina, não interferiu no ajuste linear, porém após 24 a 48 horas de incubação nota-se o aumento da faixa linear de trabalho.

Já a análise dos limites de detecção e quantificação demonstrou mais claramente o efeito da correção do erro proporcional decorrente da opacidade. Quando os valores de opacidade são descontados, pode-se detectar e quantificar

concentrações ligeiramente menores de unidades viáveis de BCG, como demonstram as TABELAS 4 e 5.

Considerando os valores de referência de 2×10^6 a 10×10^6 UFC/mL preconizados na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) para a vacina BCG-ID foi constatado que a faixa linear obtida no presente estudo e que se estende de $1,0 \times 10^6$ a $18,0 \times 10^6$ UFC/mL atende inicialmente aos critérios desta análise, devendo no entanto ser avaliadas ainda a exatidão e a precisão dos resultados. Já para as análises de termoestabilidade da vacina, a técnica deverá ser aprimorada buscando a extensão da faixa de trabalho que deve prever a quantificação de valores mínimos de $0,4 \times 10^6$ UFC/mL.

No entanto, foi demonstrado que a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante, permite avaliar maiores concentrações de viáveis características das amostras coletadas durante o processo de produção da vacina, ou seja anteriormente a sua formulação final e liofilização. Isto demonstra a aplicabilidade desta técnica rápida ao controle do processo produção.

Aspectos vantajosos oferecidos pelos métodos bioquímicos, sobretudo a sua rapidez, têm incentivado a sua aplicação ao desenvolvimento, avaliação e validação de técnicas alternativas ao método convencional. Assim Jensen e colaboradores (2008) conseguiram boa correlação entre a técnica convencional de cultivo em meio sólido com a dosagem de ATP após introduzirem uma pré-incubação da vacina em meio de cultura anteriormente a dosagem enzimática propriamente dita. Os autores concluíram tratar-se de um método rápido, robusto e preciso de estimativa da viabilidade do BCG. No entanto a aplicação deste método modificado de dosagem do ATP durante estudo colaborativo internacional para estabelecimento de vacinas padrão pela OMS, não permitiu demonstrar sua vantagem em relação ao método convencional na estimativa consistente da viabilidade em preparações de vacina liofilizada, apesar da inexperiência de alguns participantes (HO et al, 2011). Este fato demonstra a necessidade da continuação na busca de alternativas que facilitem o controle da vacina.

Portanto, o aprimoramento das técnicas bioquímicas, dentre elas, a redução dos sais de tetrazol visa garantir, de forma ágil e segura, a obtenção de resultados

precisos e correlacionáveis com a técnica convencional, buscando a garantia da qualidade da vacina BCG.

Assim, o presente estudo propiciou o conhecimento de aspectos importantes deste método alternativo e demonstrou como aplicar recursos para o aumento de sua especificidade, o que somado aos seus demais aspectos vantajosos, como o relativo baixo custo e a facilidade de execução, justificam a avaliação de sua exatidão, repetitividade e precisão intermediária.

6 – CONCLUSÕES

- A solução de cloreto de sódio 0,9% foi considerada adequada para o preparo da solução de XTT a 3 mg/mL e para o preparo das diluições da vacina BCG produzida no Brasil e que é reconstituída também com salina 0,9%. Neste caso, o ajuste da reta de regressão foi obtido após 3, 24 e 48 horas de incubação, preenchendo os requisitos: coeficiente angular não nulo ($p < 0,05$), coeficiente de determinação ($R^2 \geq 0,99$) e ausência de desvio significativo da reta por análise dos resíduos - *lack-of-fit* ($p \geq 0,05$).
- O caldo Middlebrook 7H9 sem enriquecimento não foi considerado adequado para o preparo da solução de XTT a 3 mg/mL e para o preparo da diluição da vacina BCG produzida no Brasil, tendo em vista a existência de desvio significativo da reta por análise dos resíduos - *lack-of-fit* ($p < 0,05$) e apesar dos demais requisitos mostrarem-se adequados: coeficiente angular não nulo ($p < 0,05$) e coeficiente de determinação ($R^2 \geq 0,99$).
- O controle negativo (vacina inativada e solução de reação) apresentou densidades óticas baixas, porém sempre superiores àquelas observadas no branco 2 (isento de vacina). Isto pode indicar a existência de reação inespecífica do XTT com componentes da matriz da vacina e/ou contribuição única da opacidade, caracterizando um interferente com erro proporcional.
- O branco 1, preparado com vacina e solução de cloreto de sódio 0,9% apresentou densidades óticas maiores, porém proporcionais àquelas do controle negativo, confirmando a existência de reação inespecífica do XTT com componentes da matriz da vacina e/ou contribuição única da opacidade, caracterizando um interferente com erro proporcional.
- O branco 2, preparado com solução de cloreto de sódio 0,9% ou caldo Middlebrook 7H9 solução de reação, forneceram densidades óticas menores do que àquelas do branco 1 e do controle negativo, reforçando a hipótese de que a opacidade atribuída à matriz da vacina seja a principal fonte de inespecificidade.
- Os ajustes lineares foram obtidos com ou sem a correção (subtração das densidades óticas) dos controles de opacidade (branco 1) a cada diluição da vacina. Sendo a faixa linear de 1×10^6 a 18×10^6 UFC/mL. No entanto,

quando é feita a correção da opacidade referente ao branco 1, pode-se detectar ($LD = 0,53 \times 10^6$ UFC/mL a 24 horas) e quantificar ($1,15 \times 10^6$ UFC/mL em 48 horas) as menores concentrações de unidades viáveis de BCG.

7 – PERSPECTIVAS

Tendo em vista a adequação e aprimoramento das condições do ensaio de redução do XTT a vacina BCG produzida no Brasil, torna-se fundamental o estudo de outros parâmetros de desempenho da técnica como:

- Robustez;
- Exatidão;
- Repetitividade;
- Precisão intermediária.

REFERÊNCIAS

ALTMAN, F.P. Studies on the reduction of tetrazolium salts III. The products of chemical and enzymatic reduction. **Histochemistry**, v.38, p.155-171, 1974.

ARGÜELLES, C.; Trovero, A.; Mazza, M.; Segata, G.; Sala, C.; Vecchi Arbit, M. Método rápido para La determinación de unidades viables em BCG inmunoterapeutica. In: Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 17.; Buenos Aires, 17 a 21 out.,2004.

ARGÜELLES, C.; Lammer, M.; Palmerio, S.; Rodriguez, A.; Traverro, A. Método rápido para la determinación de unidades viables em vacunas BCG: comparacion de dos sales de tetrazolio. In: Congreso Latinoamericano de Microbiologia de Medicamentos, 1., Buenos Aires, 7 a 11 nov., 2005.

AZAMBUJA, H.C.; Espina, C.A.; Filho, C.T.; Ferreira, R.T. Impacto da vacina BCG – ID na incidência de tuberculose meningea, miliar e pulmonar de zero a 4 anos no Estado do RS. **Saúde para todos**. Secretaria da Saúde, Rio Grande do Sul, 21 fev. 2006. Seção Pneumologia. Disponível em: <<http://www.saude.rs.gov.br>>. Acesso em: 21 fev. 2006.

BLOOM, B.R.; Fine, P.E.M. The BCG experience: Implications for future vaccines against tuberculosis. In: BLOOM, Barry R. (Ed) **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. Cap. 31, p. 531 – 557.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010. p.783-784.

BRASIL. Resolução N.º 899 da ANVISA, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”: anexo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 02 de jun. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 13 de maio de 2006.

FILHO, V.W.; Castilho, E.A. de; Rodrigues, L.C.; Huttly, S.R.A. Effectiveness of BCG vaccination against tuberculosis meningitis: a case control study in São Paulo, Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v.68, p.69-73, 1990.

GHEORGHIU, M. ; Lagranderie, M. Mesure rapide de la viabilité du BCG par dosage de l'ATP. **Annales de Microbiologie**. (Institut Pasteur), v.130B, n.2, p.147-155, 1979.

HO, M.M.; Markey, K.; Rigsby, P. Hockley, J.; Corbel, M.J. Report of an International collaborative study to establish the first WHO reference reagents for BCG vaccines of three different sub-strains. *Vaccine*, v.29, p.512-518, 2011.

INSTITUTO Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 – fevereiro, 2010.

JANEIRO, N. Vacina BCG. **Revista da Faculdade Medicina de Lisboa**. Série 3, v.8, n.5, p.301-302, 2003.

JANASZEK-SEYDLITZ, W. Rapid colorimetric assay for determination of viability of BCG vaccine. In: European Congress of Clinical Microbiology and infectious Diseases, 14; 2004, Prague. ECCMID Meeting Abstracts. Disponível em: <http://www.blackwellpublishing.com/eccmid14/abstract.asp?id=1591>. Acesso em: 27 fev.2007.

JENSEN, S.E.; Hubrechts, P.; Bjarke, M. K.; Hasløv, K.R. Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilized BCG Danish 1331 vaccine. **Biologicals**, v.36, p.308-314, 2008.

KAIRO, S.K.; Bedwell, J.; Tyler, P.C.; Carter, A.; Corbel, M.J. Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. **Vaccine**, v.17, p.2423-2428, 1999.

LIU, Y.; Peterson, D.A.; Kimura, H.; Schubert, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n.2, p.581-593, 1997.

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

MILSTIEN, J.B.; Gibson, J.J. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. **Bulletin of the World Health Organization**, v.68, n.1, p. 93 -108, 1990.

NIKŠ, M.; OTTO, M. Towards an optimized MTT assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 130, p. 149-151, 1990.

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

_____. WHO Expert Committee on Biological Standardization: thirty-sixth report. Requirements for dried BCG vaccine. **Technical Report Series**. n. 745, 1987.

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

_____. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. A discussion document. **WHO/V&B/99.23**, 1999.

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

_____. **Weekly epidemiological record**, v.79, n.4, p. 25-40, 2004a.

_____. **Manual of Laboratory Methods**. WHO/VSQ/97.04, 2004b.

_____. Meeting Report. WHO consultation on the characterization of BCG vaccines, Geneva, Switzerland, 8 - 9 December, 2004c.

_____. WHO discussion on the improvement of the quality control of BCG vaccines. Pasteur Institute , Paris, France, 7 June, 2005. Meeting Report. **Vaccine** (2006), doi: 10.1016/j.vaccine.2006.03.014. Disponível online em: <<http://www.sciencedirect.com>> Artigo em publicação, 2006.

_____. WHO Informal Consultation on standardization and evaluation of BCG vaccines Geneva, Switzerland 22 – 23 September 2009. **Vaccine**, v.28, p.6945-6950, 2010.

RITZ N., Hanekom W.A., Robins-Browne R., Britton W.J., Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. **FEMS Microbiology Review**, v.32. p.821-41, 2008.

ROSLEV, P.; King, G.M. Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as na indicator of viability in respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.9, p.2891-6, 1993.

STAVRI, D.; Stavri, H.; Baroni, M.; Nigulescu, M.; Lungu, E. Facteurs d'erreur intervenant dans la détermination du nombre d'unités viable du vaccin BCG lyophilisé. **Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie**, v.33, n. 2, p.171-179, 1974.

STEFANOVA, T.R.; Zhelev, P.Z. Alternative rapid method for viability determination of BCG vaccine by tetrazolium salt assay. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.17, n.1, p. 124-128, 2003.

TONUS, M.E.M.M. 2008. Avaliação da Técnica de Redução d Sal de Tetrazol XTT para a determinação da Viabilidade do BCG Moreau-RJ em Amostras de Vacina. Dissertação, Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária, Fiocruz / INCQS, Rio de Janeiro, 80p.

ANEXO**1. CALDO MIDDLEBROOK 7H9**

Sulfato de amônio.....	0,5 g
L-ácido glutâmico.....	0,5 g
Citrato de sódio.....	0,1 g
Piridoxina.....	0,001 g
Biotina.....	0,0005 g
Fosfato dissódico.....	2,5 g
Fosfato monopotássico.....	1,0 g
Citrato de ferro amoniacal.....	0,04 g
Sulfato de magnésio	0,05 g
Cloreto de cálcio.....	0,0005 g
Sulfato de zinco	0,001 g
Sulfato de cobre	0,001 g
Água purificada contendo 2,0 mL de glicerol	900 mL

2. SOLUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO 0,9%

Cloreto de sódio	0,9 g
Água purificada	100 mL

3. SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO 0,005M pH 7,4

Solução A	
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O.....	0,069 g
Água purificada.....	100 mL

Solução B	
Na ₂ HPO ₄	0,284 g
Água purificada.....	400 mL

Solução final	
Solução A.....	70 mL
Solução B.....	200 mL