

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA INSTITUTO
NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE FUNDAÇÃO OSWALDO
CRUZ

Dener Oliveira Lima e França

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE DOSAGEM DE ATP POR BIOLUMINESCÊNCIA
PARA A DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DO BCG EM AMOSTRAS DE
VACINA LIOFILIZADA**

Rio de Janeiro

2022

Dener Oliveira Lima e França

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE DOSAGEM DE ATP POR BIOLUMINESCÊNCIA
PARA A DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DO BCG EM AMOSTRAS DE
VACINA LIOFILIZADA**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Dr^a Talita Coelho de Souza

Preceptores: Antonio Carlos Gaspar de Vasconcellos e Eliana Pereira Duarte

Rio de Janeiro

2022

Catálogo na Fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

França, Dener Oliveira Lima

Avaliação da técnica de dosagem de ATP por bioluminescência para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina liofilizada. / Dener Oliveira Lima França. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

52 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Tutora: Talita Coelho Souza.

Preceptora: Eliana Pereira Duarte.

Preceptor: Antonio Carlos Gaspar Vasconcellos.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Vacina. 2. BCG. 3. ATP. 4. Bioluminescência. 5. Controle da Qualidade. I. Título.

Evaluation of the technique for viability of freeze-dried BCG vaccine by bioluminescent measurement of adenosine triphosphate.

Dener Oliveira Lima e França

Avaliação da técnica de dosagem de ATP por bioluminescência para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina liofilizada

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Magno Maciel Magalhães (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Wlamir Corrêa de Moura (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Lilia Ribeiro Seródio (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Talita Coelho de Souza (Doutora) – (Tutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Antonio Carlos Gaspar de Vasconcellos– (Preceptor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Eliana Pereira Duarte – (Preceptor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ

Dedico esse trabalho a minha mãe, Aline Oliveira, que sempre lutou muito para que eu pudesse realizar meus sonhos. Admiro e amo muito você!

AGRADECIMENTOS

À coordenação do curso de Pós-graduação na pessoa da coordenadora Dra. Silvana do Couto Jacob.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde na pessoa do diretor Dr. Antônio Eugênio de Almeida.

À Dra. Talita Coelho de Souza, pela orientação e pelos importantes conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de trabalho, Antonio Carlos G. de Vasconcellos, Eliana Pereira Duarte e Karen Vasconcelos de Farias Faro pela colaboração na rotina do laboratório e pela participação no presente trabalho.

À Claudia Ribeiro Souto e Márcia dos Santos Guimarães pela colaboração e incentivo na realização deste trabalho.

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

RESUMO

A tuberculose é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e figura como a principal doença bacteriana transmissível. Aproximadamente dois bilhões de pessoas, no mundo, estão infectadas com tuberculose latente não apresentando sintomas. Estima-se que anualmente 10 milhões de pessoas desenvolvam tuberculose ativa e 1,5 milhões evoluam para óbito. As medidas preventivas incluem o rastreamento de grupos de risco, detecção e tratamento dos casos e imunização com vacina bacilo Calmette-Guérin (BCG). A vacina BCG é preparada com cepas atenuadas de *Mycobacterium bovis* e submetida a testes de controle da qualidade que incluem a determinação da viabilidade dos bacilos mediante contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para tal, é necessária incubação de cerca de quatro semanas para que seja possível observar o crescimento das colônias bacterianas. Por isso, torna-se imperativa a utilização de métodos alternativos, como o ensaio de dosagem de ATP, para tornar o processo mais rápido. Assim, propôs-se um estudo para avaliar se o método de dosagem de ATP por bioluminescência pode ser utilizado para estimar a viabilidade do BCG em amostras de vacina liofilizada. A concentração de ATP foi determinada por medição da bioluminescência na presença de luciferina/luciferase. Inicialmente, definiu-se detalhes importantes para modificação do protocolo da Organização Mundial da Saúde, tais como o uso de tampão Tris-EDTA (TE) para extração do ATP e o volume de solução de reação adequado para os ensaios. Em seguida avaliou-se a linearidade, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), e a precisão do método. Por fim, correlacionou-se a dosagem de ATP com a técnica de contagem de UFC. Demonstrou-se que a extração de ATP da vacina BCG utilizando tampão TE aquecido apresentou rendimento superior em relação a utilização, apenas, da solução de detecção do kit. Além disso, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de ATP detectada utilizando diferentes volumes da solução de detecção. O método de dosagem de ATP da vacina BCG apresentou boa correlação linear para o padrão de ATP ($R^2 = 0,999$), para amostras de vacina BCG (viabilidade) ($R^2 = 0,999$), e para os materiais de referência BRA/BCG/003 ($R^2 = 0,992$), Moreau-RJ ($R^2 = 0,991$), Tokyo ($R^2 = 0,984$) e Russian BCG-I ($R^2 = 0,953$). O LD e LQ encontrados foram de 0,014 ng/ml e 0,080 ng/ml, respectivamente. O método de dosagem de ATP em vacina BCG liofilizada apresentou boa repetibilidade com coeficiente de variação <19% para amostras de viabilidade e <12% para amostras de termoestabilidade, e boa precisão intermediária com coeficiente de variação de 16,2% para amostras de viabilidade e 25,9% para a referência BRA/BCG/003. O método também apresentou boa correlação com a contagem de UFC. Conclui-se que o método de dosagem de ATP em vacina BCG liofilizada obtém resultados com linearidade e precisão para estimar a viabilidade do BCG. Além disso, os resultados obtidos com o método apresentam boa correlação com os resultados obtidos com o método tradicional recomendado pela farmacopeia brasileira. Portanto, sugere-se que o método pode ser adequado para fins de controle da qualidade de vacinas BCG liofilizadas.

Palavras-chaves: Vacina. BCG. ATP. Bioluminescência. Controle da qualidade.

ABSTRACT

Tuberculosis is caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* and is the main transmissible bacterial disease. Approximately two billion people worldwide are infected with latent tuberculosis without symptoms. It is estimated that annually 10 million people develop active tuberculosis and 1.5 million die. Preventive measures include screening risk groups, detection and treatment of cases and immunization with the bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine. The BCG vaccine is prepared with attenuated *Mycobacterium bovis* and submitted to quality control tests that include the determination of the viability of the bacilli by counting colony forming units (CFU). For this, it is necessary to incubate for four weeks so that it is possible to observe the growth of bacterial colonies. Therefore, it becomes imperative to use alternative methods, such as the ATP dosage assay, to make the process faster. Thus, a study was proposed to evaluate whether the method of ATP measurement by bioluminescence can be used to estimate the viability of BCG in lyophilized vaccine samples. ATP concentration was determined by measuring bioluminescence in the presence of luciferin/luciferase. Initially, important details were defined to adapt the World Health Organization protocol, such as the use of Tris-EDTA (TE) buffer for ATP extraction and the adequate volume of reaction solution for the assays. Then, linearity, detection (DL) and quantification (QL) limits, and results precision were evaluated. Finally, the ATP dosage was correlated with the CFU counting technique. It was demonstrated that the extraction of ATP from the BCG vaccine using heated TE buffer showed superior yield compared to using only the kit detection solution. Furthermore, it was observed that there is no statistical difference between the amount of ATP from the vaccine detected using different volumes of the detection solution. The ATP measurement method of the BCG vaccine showed good linear correlation for the ATP standard ($R^2 = 0.999$), for BCG vaccine samples (viability) ($R^2 = 0.999$), and for the BRA/BCG/003 reference materials ($R^2 = 0.992$), Moreau-RJ ($R^2 = 0.991$), Tokyo ($R^2 = 0.984$) and Russian BCG-I ($R^2 = 0.953$). The DL and QL found were 0.014 ng/ml and 0.080 ng/ml, respectively. The ATP measurement method in lyophilized BCG vaccine showed good repeatability with a coefficient of variation <19% for viability samples and <12% for thermostability samples, and good intermediate precision with a coefficient of variation of 19.2% for viability samples and 25.9% for the reference BRA/BCG/003. The method also showed good correlation with the CFU count. It is concluded that the ATP dosage method of the BCG vaccine obtains results with linearity and precision to estimate the viability of BCG. Furthermore, the results obtained with the method present a good correlation with the results obtained with the traditional method recommended by the Brazilian pharmacopoeia. Therefore, it is suggested that the method may be suitable for routine quality control purposes of lyophilized BCG vaccines.

Keywords: Vaccine. BCG. ATP. Bioluminescence. Quality control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma geral do ensaio da técnica de dosagem de ATP da vacina BCG utilizado no presente estudo.....	25
Figura 2. Esquema de diluição do ATP padrão.....	26
Figura 3. Avaliação da equivalência ou possível superioridade da extração de ATP utilizando tampão Tris-EDTA aquecido em relação a solução de detecção de ATP do Kit comercial.....	32
Figura 4. Determinação da eficiência dos ensaios de dosagem de ATP da vacina BCG utilizando diferentes volumes da solução de detecção de células viáveis.....	33
Figura 5. Avaliação da linearidade do método microbiológico alternativo de dosagem de ATP com as diferentes amostras de BCG.....	35
Figura 6. Correlação entre a quantidade de ATP e a contagem de UFC.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema de diluição termoestabilidade.....	28
Tabela 2 - Esquema de diluição viabilidade.....	28
Tabela 3 - Dados brutos para estimativa do Limite de Detecção e do Limite de Quantificação.....	36
Tabela 4 - Dados para estimativa da repetibilidade de amostras de BCG mantidas sob refrigeração	36
Tabela 5 - Dados para estimativa da repetibilidade de amostras de BCG submetidas a estresse térmico.....	37
Tabela 6 - Dados para estimativa da precisão intermediária de amostras de BCG.....	37

LISTA DE SIGLAS

AAR - Álcool-ácido resistente

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP - Adenosina Trifosfato

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

BPF - Boas Práticas de Fabricação

CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

COVID - Doença do Coronavírus (*Corona Virus Disease*)

DP - Desvio Padrão

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EUA - Estados Unidos da América

FAP - Fundação Atauípho de Paiva

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human immunodeficiency virus*)

IL - Interleucina

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INF- γ - Interferon Gama

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD - Limite de Detecção

LJ - Löwenstein Jensen

LQ - Limite de Quantificação

ml - Mililitro

ng - Nanograma

NIBSC - *National Institute for Biological Standards and Control*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PNI - Programa Nacional de Imunização

POP - Procedimento Operacional Padronizado

SARS-CoV-2 - coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2

SUS - Sistema Único de Saúde

TE - Tris-EDTA

UFC - Unidade Formadora de Colônia

URL - Unidade Relativa de Luz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Tuberculose	14
1.2 Vacina BCG	15
1.3 Controle da qualidade da vacina BCG	18
1.4 Método alternativo – Dosagem de ATP	19
1.5 Justificativa	20
2 OBJETIVO	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Local de realização do estudo	23
3.2 Materiais de referência	23
3.3 Amostras de vacina BCG liofilizada	24
3.4 Meios de cultura e reagentes	24
3.5 Determinação de ATP da vacina BCG	24
3.5.1 Reconstituição e pré-incubação da vacina BCG.....	25
3.5.2 Extração do ATP.....	25
3.5.3 Curva ATP padrão.....	26
3.5.4 Quantificação do ATP.....	26
3.6 Avaliação do método de extração do ATP	27
3.7 Determinação da quantidade de solução de detecção de viabilidade celular	27
3.8 Determinação de UFC em amostras de vacina BCG	27
3.9 Correlação ATP x UFC	29
3.10 Linearidade	29
3.11 Limite de Detecção	29
3.12 Limite de Quantificação	30
3.13 Precisão	30
3.13.1 Repetibilidade.....	30
3.13.2 Precisão intermediária.....	31
3.14 Análise dos dados	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Avaliação do método de extração do ATP	32
4.2 Seleção da quantidade de solução de detecção de viabilidade celular	32
4.3 Avaliação da linearidade	34

4.4 Limites de detecção e de quantificação.....	36
4.5 Avaliação da repetibilidade.....	36
4.6 Precisão intermediária.....	37
4.7 Correlação entre as técnicas de dosagem de ATP e contagem de UFC	37
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
Anexo A - Meios de Cultura e reagentes: composição e preparo	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

O gênero *Mycobacterium* ou micobactéria é composto por actinobactérias frequentemente encontradas no solo e a maioria das espécies não oferecem riscos à saúde dos seres humanos. Entretanto, algumas espécies podem ser patogênicas para humanos, como a espécie *Mycobacterium tuberculosis*, responsável por causar a tuberculose. As micobactérias apresentam forma bacilar, são aeróbicas obrigatórias, possuem ácidos micólicos na parede celular e podem ser divididas em dois grupos: micobactérias de crescimento lento (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium goodii*) e micobactérias de crescimento rápido (*Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium parafortuitum*) (MADIGAN, 2021; MEEHAN *et al.*, 2021).

M. tuberculosis apresenta crescimento lento e, assim como outras micobactérias, suas colônias, em meio sólido, crescem formando agregados bacterianos devido ao alto teor de lipídios e a natureza hidrofóbica da sua superfície celular. A presença de ácidos graxos no envelope celular confere às micobactérias característica álcool-ácido resistente (AAR), portanto esses micro-organismos são identificados por coloração de Ziehl-Neelsen ou de Kinyoun e não pelo tradicional método de coloração de Gram (MADIGAN, 2021).

A tuberculose humana é uma doença infecciosa transmissível, causada por agentes etiológicos pertencentes ao “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*” composto por: *M. bovis*, *Mycobacterium africanum* e *M. tuberculosis*. As micobactérias são disseminadas por meio de perdigotos expelidos por indivíduos infectados durante a tosse, fala, escarro e/ou espirro. O ato de falar, tossir uma única vez ou espirrar pode lançar no ar numerosas gotículas contendo partículas infecciosas, e apenas 10 bacilos são suficientes para causar uma infecção. Em seguida, as micobactérias são inaladas e ingeridas por fagócitos, principalmente macrófagos, presentes nos alvéolos pulmonares, onde as bactérias podem ser eliminadas e/ou podem sobreviver e se multiplicar no interior dessas células. Além disso, os bacilos podem atingir os nódulos linfáticos, chegar à corrente sanguínea e se espalhar para outros sítios anatômicos onde irão se multiplicar (FRIEDEN *et al.*, 2003; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Apesar do grande número de pessoas infectadas, apenas uma pequena proporção (5-10 %) desses indivíduos, que não apresentam comprometimento no sistema imunológico, serão

infectados por bacilos que conseguem evadir o sistema de defesa do hospedeiro, se multiplicar e culminar na progressão da tuberculose. Entretanto, a probabilidade de desenvolver a doença é maior em indivíduos que vivem com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e/ou que apresentam desnutrição, diabetes, consumo de álcool e tabagismo (OMS, 2021).

Indivíduos que desenvolvem tuberculose ativa apresentam sintomas que variam de acordo com o sítio anatômico onde os bacilos se multiplicam. A grande maioria dos pacientes irá desenvolver tuberculose pulmonar, que provoca sintomas como: tosse persistente (três semanas ou mais), dor no peito, hemoptise ou expectoração (secreção de dentro dos pulmões), febre, perda de apetite, sudorese noturna, emagrecimento e fraqueza ou fadiga. Pacientes com tuberculose extrapulmonar sentem dores no órgão afetado pelas bactérias (CDC, 2016).

A tuberculose é a principal doença bacteriana transmissível responsável por causar mortes no mundo, bem como é a principal causa de morte de indivíduos portadores do HIV e um dos principais colaboradores para resistência antimicrobiana (OMS, 2021). Aproximadamente dois bilhões de pessoas (um terço da população mundial), estão infectadas com tuberculose latente, ou seja, os indivíduos estão infectados com *M. tuberculosis*, mas não apresentam sintomas (OMS, 2016). Estima-se que todo ano aproximadamente 10 milhões de pessoas desenvolvam tuberculose ativa e 1,5 milhões acabam indo a óbito (OMS, 2021). No Brasil foram notificados aproximadamente 70 mil novos casos em 2020 e ocorreram cerca de 4,5 mil mortes em decorrência da tuberculose em 2019 (BRASIL, 2021).

O tratamento da tuberculose consiste na combinação de diferentes antimicrobianos durante um longo período (seis meses) (FOX; ELLARD; MITCHISON, 1999). Também é preciso ter um bom suporte e acompanhamento médico para que o paciente não abandone o tratamento (OMS, 2021). As medidas preventivas incluem o rastreamento de grupos de risco (pessoas que vivem em contato direto com pessoas com tuberculose ativa), detecção e tratamento dos casos e imunização com vacina bacilo Calmette-Guérin (BCG) que confere 50 % a 80 % de proteção contra a doença (HARRIS, 2013; HAWN *et al.*, 2014; OMS, 2018).

1.2 Vacina BCG

A vacina BCG foi criada por Léon Calmette e Alphonse Guérin em 1921, quando foi utilizada para a primeira vacinação em humanos, em Paris. A vacina BCG, atualmente utilizada para o controle da tuberculose humana, é composta por micro-organismos vivos

derivados de uma cepa de *M. bovis* atenuada, que foi isolada por Nocard em 1902, no Instituto Pasteur de Paris (LUGOSI, 1992; OETTINGER *et al.*, 1999).

Calmette e Guérin demonstraram que o BCG atenuado era seguro. Posteriormente, a partir de 1924, culturas de cepas de BCG foram enviadas do Instituto Pasteur para diferentes laboratórios em todo o mundo. Além disso, em 1928, a vacina BCG tornou-se internacionalmente aceita e as vacinações em massa tiveram início em alguns países. Devido ao aumento da produção da vacina BCG em diferentes países e as variações no seu processo de manutenção e/ou produção, foram geradas diversas subcepas com variações no genótipo e fenótipo do BCG, o que pode acarretar a redução nos níveis de virulência e a perda na eficácia da subcepa original (OMS, 1993; OMS, 2003).

Em 1966 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu algumas exigências para a vacina liofilizada e, até os dias de hoje, incentiva que a produção de vacinas seja feita com o menor número possível de passagens, não ultrapassando 12. Além disso, são recomendadas algumas padronizações no processo de produção e controle da qualidade das vacinas, bem como, na caracterização molecular das subcepas. Todas essas medidas foram tomadas com o intuito de controlar a diversificação crescente das subcepas obtidas do lote semente (MILSTIEN; GIBSON, 1990; OMS, 1966; OMS, 2003).

A vacina BCG liofilizada continua sendo o principal mecanismo utilizado para a prevenção da tuberculose, mesmo com todo o desenvolvimento tecnológico observado na área de produção de vacinas. Em 2019, aproximadamente 88 % das crianças do mundo receberam a vacina BCG durante o primeiro ano de vida (CHARD *et al.*, 2020). A vacina BCG apresenta 80-90 % de eficácia contra a tuberculose disseminada e 52-60 % contra a meningite tuberculosa. Em neonatos e crianças em idade escolar a proteção, conferida pela vacina, é de 70 % (MILSTIEN; GIBSON, 1990; MANGTANI *et al.*, 2014).

A vacina BCG foi introduzida no Brasil em 1924 e um ano depois foram iniciadas as primeiras campanhas de vacinação com a vacina BCG, preparada com a cepa chamada posteriormente de BCG Moreau-RJ. A vacina era produzida apenas pela Fundação Atauilho de Paiva (FAP) que era a maior produtora da vacina BCG no país (FAP, 2021). Entretanto, atualmente, foram aplicadas algumas restrições à produção da vacina BCG na FAP pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2016; 2021b).

A ANVISA, a autoridade regulatória nacional, criada pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro 1999, é uma autarquia sob regime especial, vinculada ao Ministério da Saúde. A agência está presente em todo o território nacional por meio das coordenações de portos, aeroportos, fronteiras e recintos alfandegados. A ANVISA atua promovendo a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária (nacionais ou importados), tais como medicamentos, alimentos, cosméticos, saneantes, derivados do tabaco, produtos médicos, sangue, hemoderivados e serviços de saúde. Além disso, atua fiscalizando os ambientes, os processos, os insumos e as tecnologias associadas, bem como, o controle de portos, aeroportos, fronteiras e recintos alfandegados (COSTA; ROZENFELD, 2000; CALCIOLARI, 2008; ANVISA, 2021).

Em 2016, por meio da ação de órgãos da vigilância sanitária, a FAP teve a fabricação de BCG suspensa pelo descumprimento de requisitos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) de medicamentos (BRASIL, 2016). Além disso, em 2019, após uma inspeção conjunta nas instalações da FAP constatou-se que a empresa não cumpre os requisitos de BPF, tendo sido evidenciadas diversas não conformidades culminando na classificação da FAP em condição insatisfatória. Sendo assim, a fabricação e o comércio de produtos farmacêuticos foram interditados (BRASIL, 2021b).

Por essas questões, no Brasil, a vacina BCG liofilizada preparada com a subcepa Moreau-RJ, produzida pela FAP, foi substituída por vacina BCG liofilizada contendo a subcepa Moscow 361 I, produzida pelo *Serum Institute of India*. A vacina é disponibilizada gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e apresenta uma eficácia elevada conferindo 78 % de proteção contra a forma disseminada da tuberculose (FAP, 2021; BRASIL, 2021; 2021a).

Atualmente, a população brasileira tem aderido cada vez menos à vacinação contra tuberculose. Em 2018 a cobertura vacinal foi de 99,72 %, em 2019 foi de 88,23 % e até outubro de 2020 a cobertura vacinal foi de 63,88 %. A queda na cobertura vacinal pode ser explicada pela pandemia de COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2, aumento de movimentos antivacinas, medo dos eventos adversos, desconhecimento dos benefícios que a vacina oferece e disseminação de informações falsas sobre vacinas (BRASIL, 2020).

O BCG é cultivado na superfície do meio líquido Sauton e retirado após 6 a 9 dias de incubação. Em seguida, a massa bacteriana, obtida por filtragem e prensagem, é

homogeneizada por meio de esferas de aço inoxidável. Por fim, a suspensão bacteriana é liofilizada e envasada (BLOOM; FINE, 1994). Esse modo clássico de produção das ampolas de vacina BCG confere algumas desvantagens, pois a suspensão fica mais heterogênea, com variado número e tamanho de grumos da vacina. O número de unidades viáveis varia bastante mesmo entre ampolas do mesmo lote (STAVRI *et al.*, 1974; LUGOSI, 1992).

A vacina BCG é uma preparação biológica que induz o desenvolvimento de imunidade, pois simula uma infecção capaz de gerar proteção cruzada contra o agente causador da tuberculose. Após a administração da vacina é desencadeada uma resposta imune celular, induzindo uma resposta Th1 e Th2. As células Th1 vão secretar moléculas importantes para proteção contra micobactéria (IFN- γ), para ativar macrófagos e recrutar células T (IL-2). Já as células Th2 produzem moléculas que vão ativar macrófagos contra as micobactérias (IL-4 e IL-5), regular o processo inflamatório e induzir as células fagocíticas a controlar a replicação das micobactérias (IL-6) além de aumentar a produção de células T (IL-10) (OMS, 1993; ROSEMBERG, 2001; BRICKS, 2004).

Além disso, como ocorre uma participação importante das células da imunidade inata após a vacinação, a proteção conferida pela vacina BCG também se estende para patógenos que não fazem parte da doença-alvo como: *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, e a hanseníase, causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* (BARRETO; PEREIRA; FERREIRA, 2006).

1.3 Controle da qualidade da vacina BCG

A vacina BCG precisa atender a critérios mínimos necessários que garantam a segurança e eficácia do produto (OMS, 1987; BRASIL, 2019). O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é responsável por realizar o controle da qualidade dos lotes de vacina BCG de uso intradérmico utilizados no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (RDC, 2008). Sendo assim, os lotes liberados para distribuição e uso atendem às especificações previstas pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

A Farmacopeia Brasileira 6ª Edição volume II preconiza a realização de alguns testes para a vacina BCG comercializada. Recomenda-se a execução do teste de identidade, utilizando coloração de Ziehl-Nielsen, para detectar somente bacilos álcool-ácido resistentes, por microscopia. Além disso, as características como pH e umidade residual também são

analisadas. Também são feitos testes de segurança biológica para checar a esterilidade do produto, bem como, a presença de micobactérias virulentas e a reatividade cutânea da vacina. Os ensaios microbiológicos incluem a contagem do número de unidades viáveis. Além disso, são avaliadas as embalagens, armazenamento e a rotulagem (BRASIL, 2019).

Um dos principais testes de controle realizado com a vacina BCG liofilizada é a determinação da viabilidade do produto, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Resumidamente, é preciso reconstituir cinco ampolas ou frascos-ampola da vacina com diluente, transferir o conteúdo para um único tubo de vidro, homogeneizar e realizar diluições. Em seguida, a vacina reconstituída é inoculada em meio Löwenstein Jensen (LJ), os tubos são vedados e incubados na posição vertical a cerca de 37 °C por aproximadamente quatro semanas. Após esse período é realizada a contagem das UFCs. O resultado considerado aceitável deve estar de acordo com o histórico do registro do produto submetido à autoridade regulatória nacional, onde o limite máximo não deve ultrapassar quatro vezes o valor definido como limite mínimo (BRASIL, 2019).

Uma das principais desvantagens do teste de contagem de células viáveis é a longa duração do ensaio; dependendo do meio de crescimento, pode ser necessário um período de incubação de até cinco semanas antes que o número de colônias possa ser contado. Outro método que pode ser utilizado para determinar a viabilidade em amostras bacterianas é medição do conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) intracelular (HARRIS; KELL, 1985). Entretanto, para a utilização de técnicas de bioluminescência ou qualquer outro método, é necessária a realização de validação, comparando o método microbiológico alternativo com o método tradicional (BRASIL, 2019).

1.4 Método alternativo – Dosagem de ATP

ATP é uma molécula intracelular que tem a função de carrear a energia química utilizada pelas células em diversas reações, sendo assim, está presente em todas as células vivas e sua detecção é um indicador da presença de micro-organismos viáveis. O ATP pode ser quantificado mediante mensuração de bioluminescência na presença de luciferina/luciferase (LUNDIN, 2000).

Em 1940 foi demonstrado que o ATP é uma molécula importante para que a luciferina seja catalisada pela enzima luciferase. Sendo assim, um substrato orgânico (luciferina) é

rapidamente oxidado, em oxiluciferina, catalisada pela enzima luciferase na presença de ATP, O₂ e Mg²⁺, produzindo luminescência (MCELROY, 1947; ANDO *et al.*, 2008).

Os primeiros estudos relacionados com o método de dosagem de ATP, aplicado à vacina BCG, são da década de 1970 (CRISPEN, 1971; GHEORGHIU; LAGRANDERIE, 1979). Nos anos seguintes, vários estudos sobre a medição da quantidade de ATP no BCG foram relatados, e também foi descrito um método aprimorando a extração de ATP do BCG. Em alguns desses estudos, o teor de ATP medido foi comparado com a viabilidade determinada pela contagem de unidades viáveis (GHEORGHIU; LAGRANDERIE; BALAZUC, 1984; ASKGAARD *et al.*, 1995; HOFFNER; JIMENEZ-MISAS; LUNDIN, 1999).

Apesar de todos os dados correlacionando o ATP intracelular com o número de células viáveis em preparações líquidas e liofilizadas da vacina BCG, foi apenas em 2008 que foi publicado o primeiro artigo descrevendo a validação do método. Jensen e colaboradores desenvolveram um método de dosagem de ATP rápido, robusto e preciso para estimar a viabilidade da vacina BCG (JENSEN *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrado que o ensaio de dosagem de ATP intracelular pode ser usado para determinar, rapidamente, o número de organismos viáveis em várias preparações de vacinas micobacterianas atenuadas, liofilizadas e congeladas, incluindo cepas recombinantes (KOLIBAB *et al.*, 2012). As farmacopeias Europeia e Brasileira já reconhecem a metodologia como ensaio microbiológico alternativo para estimar a viabilidade celular em vacina BCG. Entretanto, é preciso que o método seja validado para que possa ser implementado em substituição à metodologia vigente (BRASIL, 2019).

1.5 Justificativa

A tuberculose é a principal doença bacteriana transmissível responsável por causar mortes no mundo. Bem como, é a principal causa de morte de indivíduos portadores do vírus HIV e um dos principais fatores colaboradores para resistência antimicrobiana. A vacina BCG liofilizada continua sendo o principal mecanismo utilizado para a prevenção da tuberculose. A vacina é feita com *M. bovis* atenuado, que é um micro-organismo de crescimento lento. O controle da qualidade da vacina BCG é feito, principalmente, pela determinação da viabilidade dos bacilos que compõem o produto (contagem de UFC). Para tal, é necessária uma incubação de quatro semanas para que seja possível observar o crescimento das colônias bacterianas o que torna o ensaio demorado. Por isso, torna-se necessária a utilização de

métodos microbiológicos alternativos, como o ensaio de dosagem de ATP, para tornar o processo de determinação de células viáveis mais rápido. Diversos trabalhos já utilizaram, com sucesso, essa metodologia no BCG, bem como, já existem publicações reportando a validação do método e comparando com o método tradicional. O Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS, tem como objetivo implementar o ensaio de dosagem de ATP para dar celeridade ao processo de liberação dos lotes para o PNI e reduzir os custos relacionados ao ensaio de viabilidade da vacina BCG. Para tanto, propomos esse trabalho com a finalidade de padronizar e validar o método de dosagem de ATP por bioluminescência para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina liofilizada.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o método alternativo de dosagem de ATP por bioluminescência pode ser utilizado para determinar a viabilidade de unidades do BCG em amostras de vacina liofilizada.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a equivalência ou superioridade da extração de ATP utilizando tampão Tris-EDTA aquecido em relação a solução de detecção de ATP de um kit comercial;
- b) Determinar a eficiência dos ensaios de dosagem de ATP por bioluminescência utilizando diferentes volumes de solução de detecção de ATP;
- c) Avaliar a linearidade do método alternativo de dosagem de ATP por bioluminescência com diferentes vacinas BCG de referência;
- d) Determinar o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método alternativo de dosagem de ATP por bioluminescência em vacina BCG liofilizada;
- e) Avaliar a precisão dos resultados obtidos no método alternativo de dosagem de ATP por bioluminescência em vacina BCG liofilizada;
- f) Comparar o método alternativo de dosagem de ATP por bioluminescência com o método convencional utilizado no controle da qualidade de vacina BCG liofilizada no Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS mediante correlação dos resultados.

3 METODOLOGIA

3.1 Local de realização do estudo

O presente estudo foi realizado no Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ.

3.2 Materiais de referência

Durante a realização dos ensaios foram utilizados materiais de referência e um lote de vacina BCG referência de trabalho, contendo bactérias (*M. bovis*) viáveis com a virulência atenuada. O material de referência é utilizado como comparador em ensaios de viabilidade (contagem de UFC e ensaios modificados de ATP), biologia molecular e ensaios *in vivo* utilizados em estudos pré-clínicos (DAGG *et al.*, 2014). Os materiais de referência são comercializados pelo *The National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), entre outros. No presente estudo foram utilizados materiais de referência das subcepas: Moreau-RJ (código NIBSC 10/272) (DAGG *et al.*, 2012), Russian BCG-I (código NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (código NIBSC 07/272) (HO *et al.*, 2011).

A vacina de referência contendo a subcepa Moreau-RJ, foi produzida pela Fundação Ataulpho de Paiva (FAP) em 1998 e foi estabelecida como material de referência pela OMS em 2012. Após a liofilização cada ampola apresenta, aproximadamente, $6 \times 10^6 \pm 0,7$ UFC/ampola e $24,7 \pm 7,4$ ng/ampola de ATP (DAGG *et al.*, 2012). Além disso, foi utilizado o lote de vacina BCG referência de trabalho BRA/BCG/003, também preparado com a subcepa Moreau-RJ. Este lote de referência de trabalho é utilizado rotineiramente pelo INCQS e pelo fabricante nacional como controle da vacina BCG desde 1998, após ter sido avaliado pelo fabricante, pelo INCQS e pelo *Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis* (INPPAZ). Este material deve ser reconstituído com 5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9 % e cada ampola apresenta, aproximadamente, 9×10^6 UFC/ml (OMS, 2004b).

A vacina de referência contendo a subcepa Russian BCG-I, foi produzida pelo *Bul Bio - National Center of Infectious and Parasitic Diseases* (BB-NCIPD) Ltd., na Bulgária, em 2006 e foi estabelecida como referência pela OMS em 2009. O material biológico, de acordo com o NIBSC, apresenta $3,4 \times 10^6 \pm 0,5$ UFC/ampola e $7,5 \pm 1,5$ ng/ampola de ATP (MARKEY *et al.*, 2010).

A vacina de referência preparada com a subcepa Tokyo 172 foi produzida em 2006 pelo *Japan BCG Laboratory* localizado em Tóquio, Japão e foi estabelecida pela OMS em

2009 como material de referência. De acordo com o NIBSC, cada ampola contém aproximadamente $49,4 \times 10^6 \pm 5,9$ UFC/ampola e $217,6 \pm 27,5$ ng/ampola de ATP (DAGG *et al.*, 2014).

3.3 Amostras de vacina BCG liofilizada

Os ensaios foram realizados utilizando amostras de vacina BCG liofilizada produzidas pelo laboratório *Serum Institute of India Ltd* e recebidas pelo INCQS para análise de orientação para o PNI. A vacina deve ser reconstituída com 1 ml, sendo que cada 0,1 ml contém 2×10^5 e 8×10^5 UFC. Cada frasco de vacina BCG contém 20 doses (0,05 ml) para bebês com menos de 1 ano de idade ou 10 doses (0,1 ml) para crianças maiores de um ano de idade e adultos. Além disso, a vacina BCG contém glutamato de sódio como estabilizante.

3.4 Meios de cultura e reagentes

O meio Middlebrook 7H9 enriquecido (Difco, Sparks, EUA) foi utilizado para reconstituir as ampolas da vacina BCG. O tampão Tris (0,1 M) com 2 mM de EDTA (TE) (Sigma, EUA) foi empregado na etapa de extração, por aquecimento, do ATP. O meio sólido LJ foi utilizado como substrato para o cultivo das micobactérias para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) de cada diluição da vacina no ensaio de contagem de unidades viáveis de BCG e termoestabilidade da vacina BCG (POP 65.3210.013). O meio líquido Sauton 1:4 foi empregado para diluição das vacinas reconstituídas. A composição e o modo de preparo dos meios encontram-se descritos no Anexo A.

O Kit comercial utilizado para determinação da viabilidade celular foi o *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay* (Promega, Madison, EUA). Esse Kit fornece um reagente (solução de detecção) para determinar o número de células viáveis por meio da quantificação de ATP, o que indica a presença de células metabolicamente ativas. O kit comercial utilizado para preparar a curva ATP padrão 1×10^{-5} M foi o *Molecular Probes® ATP Determination Kit* (número de catálogo A22066) (Invitrogen detection Technologies, Eugene, EUA).

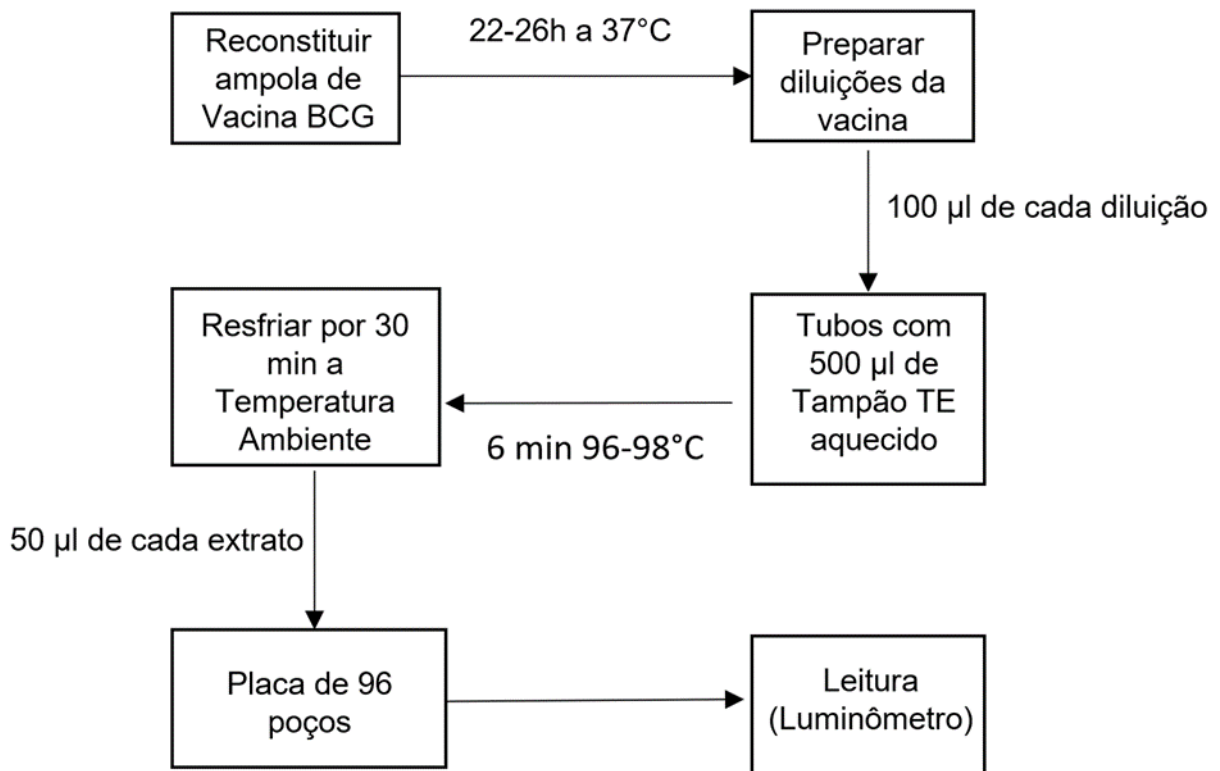
3.5 Determinação de ATP da vacina BCG

No presente estudo foi utilizado como referência o protocolo de estudo colaborativo internacional do 1º candidato a Reagente de Referência BCG da OMS, realizado em 2012, usando ensaio de ATP modificado (DAGG *et al.*, 2012).

3.5.1 Reconstituição e pré-incubação da vacina BCG

Para os ensaios foram utilizadas ampolas de material de referência e lote de referência de trabalho armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ampolas de amostras de vacina BCG armazenadas a $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (viabilidade) e/ou ampolas pré-incubadas por 28 dias a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (termoestabilidade). As ampolas foram reconstituídas com meio Middlebrook 7H9 enriquecido pré-aquecido a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e incubadas por 22 - 26 horas a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma geral do ensaio da técnica de dosagem de ATP da vacina BCG utilizado no presente estudo.



Fonte: O autor, 2022.

3.5.2 Extração do ATP

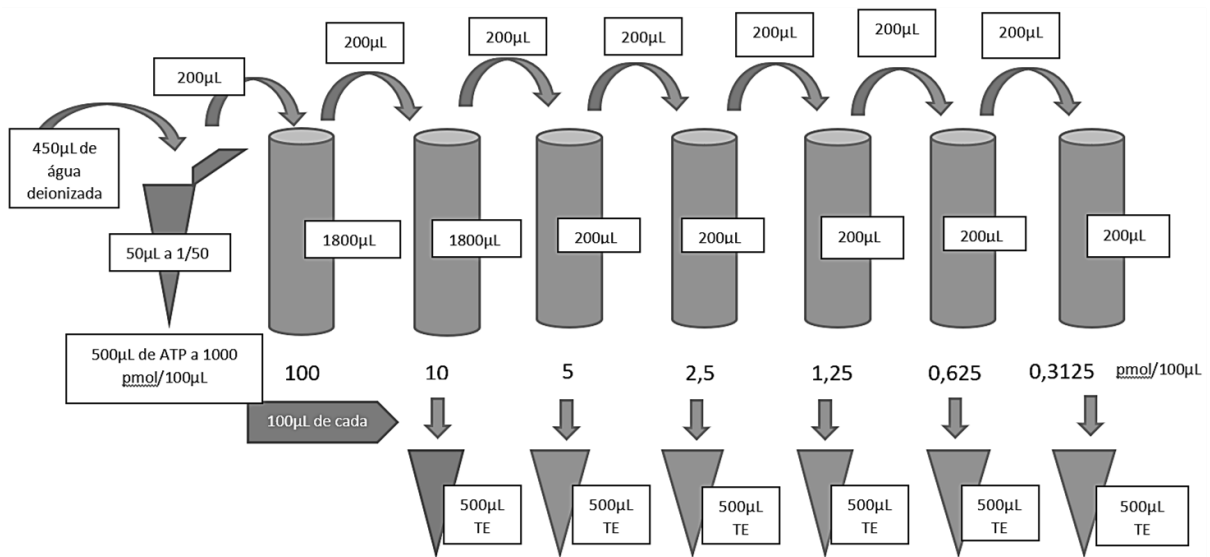
Para a extração do ATP foi utilizado termobloco (Loccus, Cotia, Brasil) ajustado em temperatura de $96 - 98\text{ }^{\circ}\text{C}$ aferido com termômetro calibrado. Em seguida, um volume de $500\text{ }\mu\text{L}$ de tampão TE foi pré-aquecido ($96 - 98\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos em microtubos tipo Eppendorf, com fundo arredondado, de 2 ml com tampa para evitar perda de volume por evaporação. Na sequência, $100\text{ }\mu\text{L}$ das amostras foram transferidos para o tampão TE pré-aquecido, e mantidas a $96 - 98\text{ }^{\circ}\text{C}$ por mais seis minutos. Os microtubos contendo a mistura

de amostra e tampão TE (extratos de ATP) foram resfriados por 30 minutos a temperatura ambiente (15 - 25 °C) (Figura 1).

3.5.3 Curva ATP padrão

A curva ATP padrão foi preparada nas concentrações de 10 a 0,3125 pmol/100 µL conforme demonstrado na Figura 2. Em seguida, 100 µL das diluições de ATP padrão foram transferidas para 500 µL de tampão TE aquecido e tratados conforme descrito no item 3.5.2.

Figura 2 - Esquema de diluição do ATP padrão.



Fonte: O autor, 2022.

A curva ATP padrão foi preparada nas concentrações de 10 a 0,3125 pmol/100 µL utilizando água deionizada estéril (purificada) para diluição.

3.5.4 Quantificação do ATP

Para quantificar o ATP foram transferidos 50 µL de cada extrato de ATP (conforme descrito no item 3.5.2) e das diluições da curva ATP padrão (conforme descrito em 3.5.3) para placa de 96 poços branca, opaca e com fundo chato (OptiPlate-96, Waltham, EUA). Na sequência foram adicionados 50 µL (proporção final 1:1) de solução para detecção de ATP do kit *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay* (Promega, Madison, EUA). A placa foi colocada no luminômetro CentroPRO LB 962 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha) (Figura 1) onde o conteúdo foi homogeneizado por 2 minutos, estabilizado por 10 minutos e a detecção de ATP por bioluminescência foi realizada com leitura de 1 segundo por poço.

3.6 Avaliação do método de extração do ATP

Para avaliar o efeito do tampão TE aquecido na extração de ATP, foi reconstituída uma ampola do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 com 5 ml de meio Middlebrook 7H9 enriquecido. O conteúdo foi transferido para um erlenmeyer estéril e incubado a 37 ± 1 °C por 22 - 26 horas. Após o tempo de incubação, a vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 reconstituída foi separada em dois grupos com três diluições (1/1, 1/2 e 1/4) cada: um grupo teve o ATP extraído com 500 µL de tampão TE aquecido a 96-98 °C por seis minutos, enquanto o outro grupo não recebeu tampão TE e não passou pela etapa de extração por calor. A curva ATP padrão foi feita de acordo com o descrito no item 3.5.3 e 50 µL do conteúdo foi transferido para a placa de 96 poços seguindo o descrito no item 3.5.4.

3.7 Determinação da quantidade de solução de detecção de viabilidade celular

Uma ampola da vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 foi reconstituída com 5 ml de meio Middlebrook 7H9 enriquecido. A suspensão da vacina foi incubada a 37 ± 1 °C por 22 - 26 horas. Posteriormente, foram preparadas três diluições (1/1, 1/2 e 1/4) e o ATP foi extraído utilizando tampão TE aquecido por seis minutos. Os extratos de ATP e a curva ATP padrão, após ter sua temperatura reestabelecida por 30 minutos, foram transferidos para a placa de 96 poços de modo que seu volume estivesse na proporção 1:1 com a solução de detecção de ATP (100 µL, 50 µL ou 25 µL).

3.8 Determinação de UFC em amostras de vacina BCG

A determinação de UFC em amostras de vacina BCG liofilizada foi realizada conforme descrito no procedimento “Ensaio de contagem de unidades viáveis de BCG e termoestabilidade da vacina BCG” (POP INCQS 65.3210.013). Os tubos de LJ utilizados em um mesmo ensaio eram provenientes de um único lote. As ampolas de vacina BCG foram reconstituídas com diluente e volume indicados pelo fabricante e foram homogeneizadas utilizando um agitador. Depois foram feitas três diluições de cada uma das amostras de vacina de acordo com as tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Esquema de diluição termoestabilidade

Diluições	Proporções
1/100	1 ml da vacina reconstituída + 99 ml de Meio Sauton 1:4
1/5000	2 ml da diluição 1/100 + 98 ml de Meio Sauton 1:4
1/10000	4 ml da diluição 1/5000 + 4 ml de Meio Sauton 1:4
1/20000	2 ml da diluição 1/5000 + 6 ml de Meio Sauton 1:4

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 2 - Esquema de diluição viabilidade

Diluições	Proporções
1/100	1 ml da vacina reconstituída + 99 ml de Meio Sauton 1:4
1/10000	1 ml da diluição 1/100 + 99 ml de Meio Sauton 1:4
1/20000	4 ml da diluição 1/10000 + 4 ml Meio Sauton 1:4
1/40000	2 ml da diluição 1/10000 + 6 ml Meio Sauton 1:4

Fonte: O autor, 2022.

Foram utilizados 20 tubos contendo LJ para a inoculação das diluições de cada amostra de vacina BCG, sendo as duas primeiras diluições inoculadas em cinco tubos cada e a terceira diluição inoculada em 10 tubos. A identificação dos tubos foi feita de acordo com a sequência numérica extraída da tabela estatística de aleatoriedade e disposta em modelo padronizado de formulário do ensaio. De acordo com a identificação dos tubos e o esquema de diluição, foram inoculados 100 µL de cada diluição com auxílio de uma pipeta repetidora calibrada. Em seguida, o inóculo foi distribuído uniformemente pela superfície do meio de cultura e os tubos foram mantidos na posição horizontal ao abrigo da luz por 24 horas a temperatura ambiente (15 a 25 °C). Posteriormente os tubos foram vedados com rolhas de silicone embebidas com parafina e incubados a 37 ± 1 °C, protegidos da luz, por 3 a 4 semanas.

Por último realizou-se a contagem de UFC, onde também foram avaliados o aspecto morfológico das colônias e outras características específicas típicas do BCG. As contagens acima de 100 colônias foram desconsideradas.

3.9 Correlação ATP x UFC

A correlação foi estabelecida após ser feito o ensaio de contagem de UFC padrão (descrito no item 3.8) e a dosagem de ATP de amostras de vacina BCG (viabilidade e termoestabilidade) provenientes do mesmo lote. Os dados foram plotados em planilhas de Microsoft Excel 2019, e analisados mediante correlação da quantidade de nanogramas de ATP/ml e o número de UFC/ml.

3.10 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de produzir resultados, com exatidão (dentro de uma determinada faixa), que são diretamente proporcionais à concentração do ATP presente na amostra (RDC, 2017; BRASIL, 2019).

A linearidade do método de dosagem de ATP utilizando ATP padrão foi determinada a partir de ensaios utilizando 6 pontos de concentrações de ATP padrão (1,58; 3,16; 6,33; 12,67; 25,35 e 50,71 ng/ml) feitas em 5 repetições. Além disso, foi feita a linearidade do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 e das vacinas de referência preparadas com as subcepas Moreau-RJ (NIBSC 10/272), Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272), onde cada ampola foi reconstituída com 5 ml, 1 ml, 1 ml e 2 ml de meio Middlebrook 7H9, respectivamente. As ampolas de amostras de vacina BCG, utilizadas tanto para o teste de viabilidade quanto para o teste de termoestabilidade, foram reconstituídas com 1 ml de meio Middlebrook 7H9. A curva de concentração dos materiais de referência e das amostras de vacina BCG foi preparada mediante a transferência de 20, 40, 60, 80 e 100 µL dos líofilos hidratados e o conteúdo foi completado com meio de cultura para um volume final de 100 µL. Em seguida, o ATP foi extraído por calor utilizando tampão TE aquecido a 96 - 98 °C. A temperatura do extrato de ATP foi reestabelecida por 30 minutos a temperatura ambiente (15 a 25 °C). Os resultados de ATP obtidos no ensaio, expressos como Unidade Relativa de Luz (URL), foram comparados com as concentrações de ATP introduzidas com base no valor nominal em ATP descrito para cada amostra.

3.11 Limite de Detecção

O LD foi utilizado para determinar o menor número de ATP proveniente de vacina BCG, que pode ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas pelo método utilizado (BRASIL, 2019). No presente estudo foi

utilizado o ensaio de replicatas do branco de amostras que é metrologicamente mais correto (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). No presente estudo foram analisadas 10 repetições do branco e o resultado obtido foi analisado com emprego da equação a seguir:

$$LD = \bar{X} + 3.s$$

Onde, \bar{X} = média dos valores do branco da amostra;

s = desvio padrão dos brancos da amostra.

3.12 Limite de Quantificação

No presente estudo o LQ foi empregado para estabelecer a menor concentração de ATP, proveniente de vacina BCG, capaz de ser detectada com exatidão e precisão aceitáveis pelo método utilizado (BRASIL, 2019). No presente estudo foram analisadas 10 repetições do branco e para obter o resultado utilizou-se a seguinte equação (INMETRO, 2016):

$$LQ = \bar{X} + 10.s$$

Onde, \bar{X} = média dos valores do branco da amostra;

s = desvio padrão dos brancos da amostra.

3.13 Precisão

A precisão avalia o grau de concordância entre os resultados de testes individuais quando a metodologia é aplicada repetidamente. Geralmente é expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) dos resultados obtidos (BRASIL, 2019). Um planejamento foi executado para avaliar a repetibilidade e a precisão intermediária utilizando amostras de um mesmo lote (viabilidade e termoestabilidade).

3.13.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada pela realização de três ensaios em momentos diferentes pelo mesmo operador. Foram utilizadas ampolas de um mesmo lote de vacina BCG que foram armazenados em duas condições diferentes: 2 a 8 °C (viabilidade) e 37 ± 1 °C por 28 dias (termoestabilidade). Preparou-se um *pool* contendo cinco ampolas reconstituídas para cada uma das condições. Em seguida, foram realizadas diluições (1/1, 1/2 e 1/4), o ATP foi extraído por aquecimento (item 3.5.2) e o extrato foi transferido, em 10 réplicas, para a placa

de 96 poços. Também foi preparada uma curva ATP padrão de acordo com o descrito anteriormente (item 3.5.3) e o resultado foi obtido utilizando luminômetro (item 3.5.4).

3.13.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada mediante a realização de três ensaios por três diferentes operadores. Foram reconstituídas cinco ampolas de vacina BCG - 2 a 8 °C (viabilidade) e 37 ± 1 °C por 28 dias (termoestabilidade) - do mesmo lote e uma ampola do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003. As ampolas foram incubadas por 24 horas a 37 ± 1 °C. O ATP foi extraído por aquecimento (item 3.5.2) e os extratos foram transferidos, em 10 réplicas, para uma placa de 96 poços. Foi feita uma curva ATP padrão (item 3.5.3) e o resultado foi obtido em luminômetro (item 3.5.4).

3.14 Análise dos dados

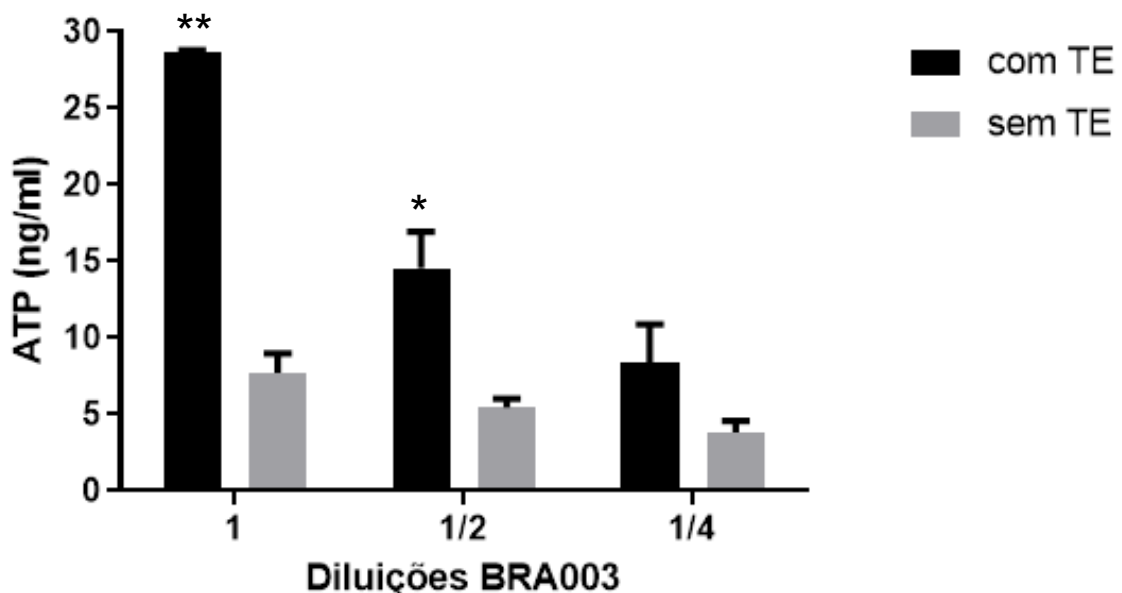
Os cálculos referentes ao conteúdo de ATP de cada ensaio foram feitos, organizados e analisados em planilha Microsoft Excel (Microsoft Office Excel 2019) e *GraphPad Prism 9*.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do método de extração do ATP

Inicialmente, avaliamos o rendimento da extração de ATP da vacina BCG, utilizando tampão TE aquecido ou somente utilizando a solução de detecção de ATP do kit. Com base nos resultados obtidos foi possível observar que a quantidade de ATP extraída de amostras de vacina BCG do lote de vacina BCG referência de trabalho BRA/BCG/003 foi estatisticamente menor no grupo não submetido ao tratamento com tampão TE aquecido (Figura 3).

Figura 3 - Avaliação da equivalência ou possível superioridade da extração de ATP utilizando tampão Tris-EDTA aquecido em relação a solução de detecção de ATP do Kit comercial.



Fonte: O autor, 2022.

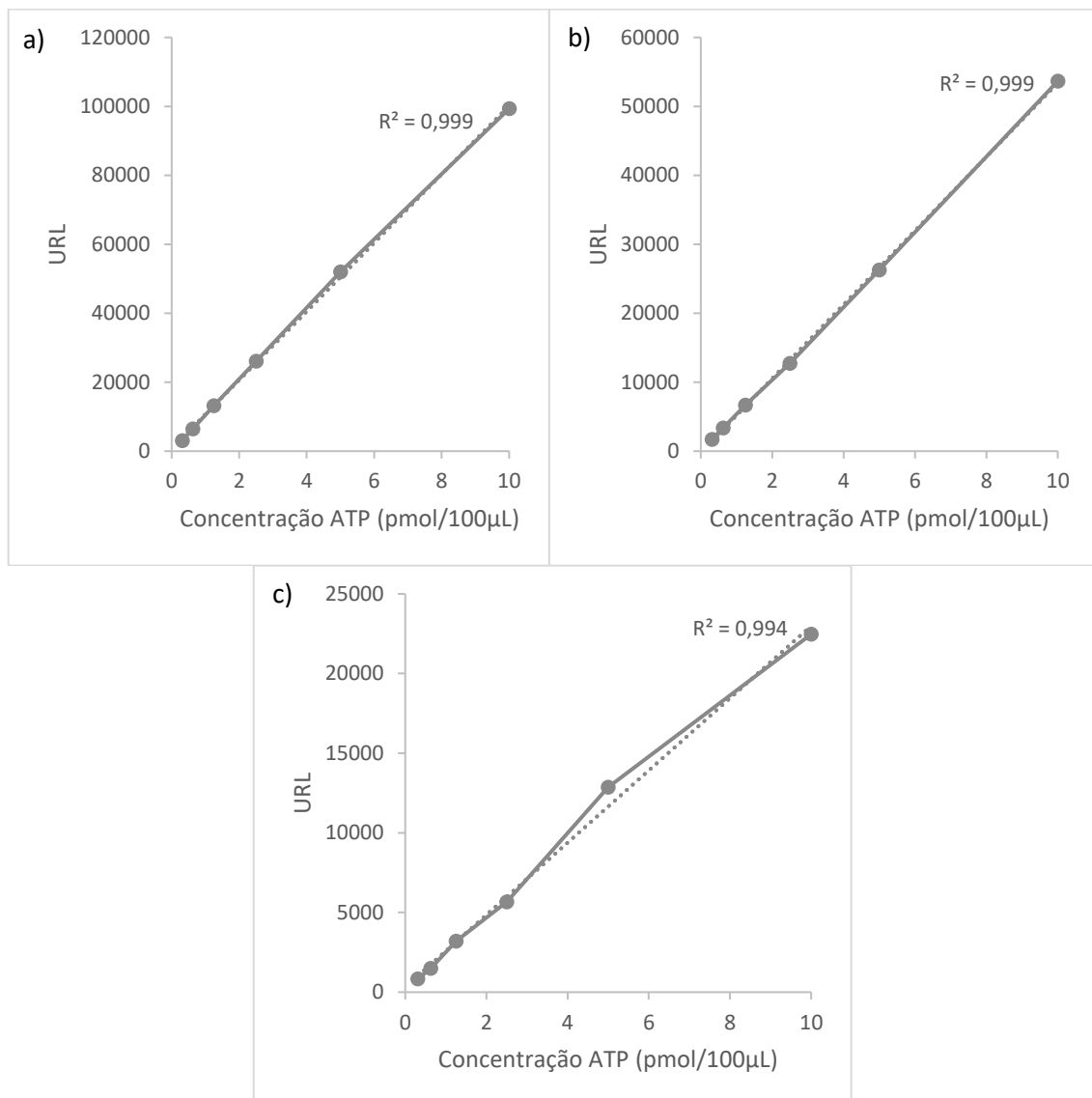
Barra preta representa as amostras de BCG que tiveram o ATP extraído com tampão TE aquecido, barra cinza representa as amostras de BCG que não receberam tampão TE e não passou pela etapa de aquecimento e a linha preta representa o desvio padrão entre o resultado de 2 ensaios independentes, onde foram utilizadas uma ampola de vacina de referência (BRA/BCG/003) para cada ensaio. ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

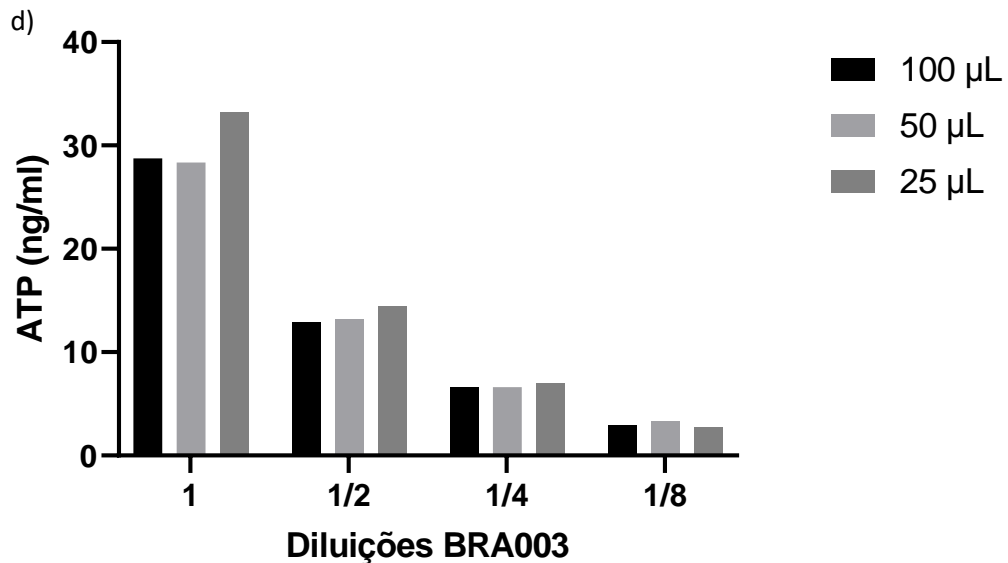
4.2 Seleção da quantidade de solução de detecção de viabilidade celular

Avaliamos se há diferença na eficiência dos ensaios de dosagem de ATP utilizando o lote de vacina BCG referência de trabalho BRA/BCG/003 e diferentes volumes da solução de detecção do kit *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay*. De acordo com os resultados obtidos, não se observou diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de ATP detectada

utilizando os três diferentes volumes (100 μL , 50 μL ou 25 μL) da solução de detecção de ATP do kit comercial. É possível observar na Figura 4d que a quantidade de ATP detectada nos três diferentes grupos foi semelhante. Além disso, as curvas ATP padrão apresentaram $R^2 = 0,999$ (Figura 4a), $R^2 = 0,999$ (Figura 4b) e $R^2 = 0,994$ (Figura 4c) utilizando 100 μL , 50 μL e 25 μL da solução de detecção, respectivamente.

Figura 4 - Determinação da eficiência dos ensaios de dosagem de ATP da vacina BCG utilizando diferentes volumes da solução de detecção de células viáveis.





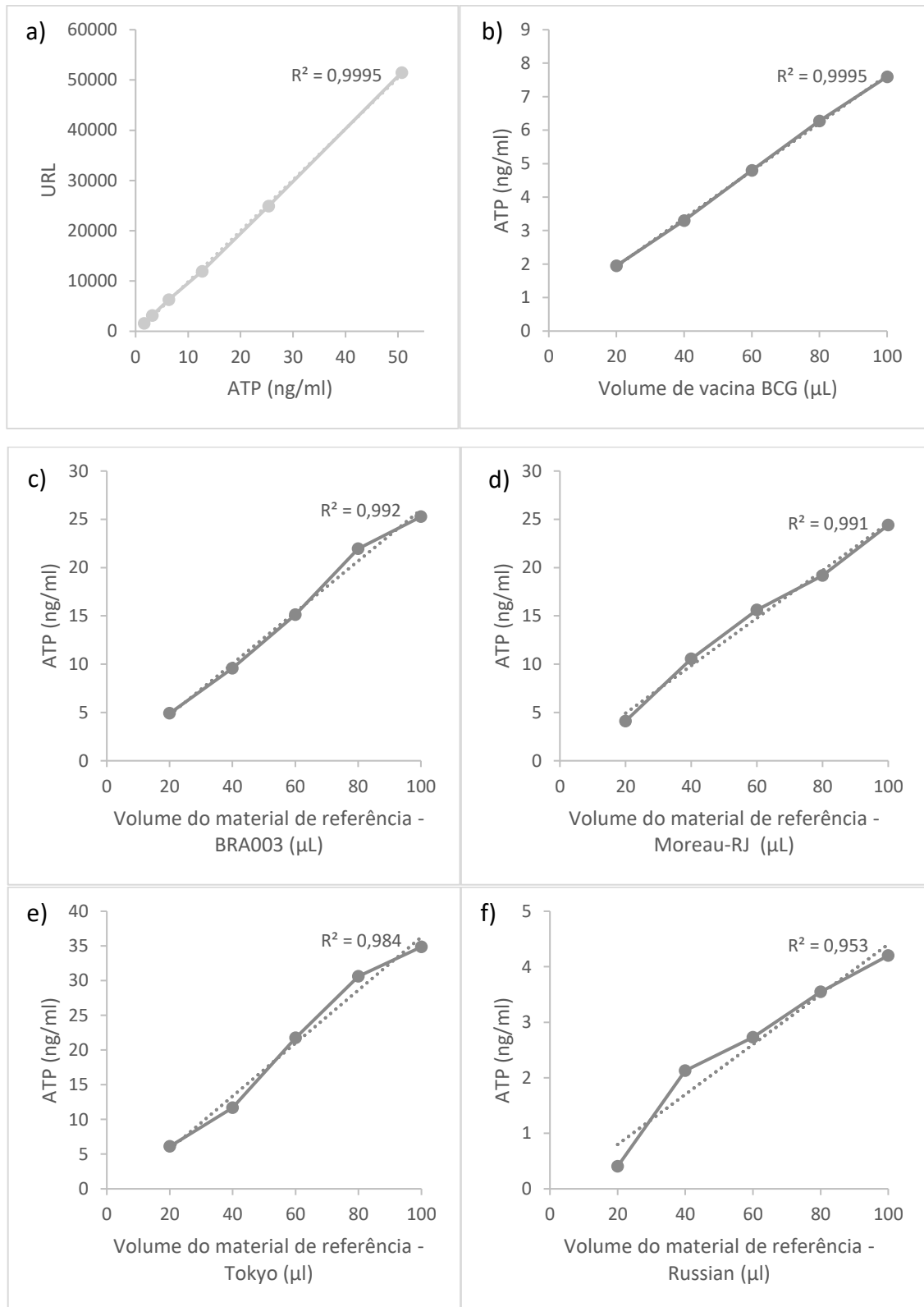
Fonte: O autor, 2022.

A barra preta representa o ensaio realizado com 100 µL da solução de detecção, a barra cinza claro representa o ensaio realizado com 50 µL da solução de detecção do kit *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay* e a barra cinza escuro representa o ensaio realizado com 25 µL da solução de detecção do kit *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay*. O gráfico representa o resultado de experimentos feitos de forma independente para cada volume avaliado utilizando uma ampola do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003.

4.3 Avaliação da linearidade

A linearidade do método de dosagem de ATP utilizando ATP padrão foi estudada na faixa de 1,58 e 50,71 ng/ml. O resultado obtido demonstra que o quadrado do coeficiente de correlação (R^2) foi igual a 0,999 (Figura 5a). Também foi possível obter $R^2 = 0,999$ em ensaios com amostras de vacina BCG (viabilidade) (Figura 5b), $R^2 = 0,992$ utilizando lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 (Figura 5c) e $R^2 = 0,991$ para material de referência Moreau-RJ NIBSC 10/272 (Figura 5d). Além disso, observamos $R^2 = 0,984$ e $R^2 = 0,953$ para amostras de referência preparados com as subcepas Tokyo NIBSC 07/272 (Figura 5e) e Russian BCG-I NIBSC 07/274 (Figura 5f), respectivamente.

Figura 5 - Avaliação da linearidade do método microbiológico alternativo de dosagem de ATP com as diferentes amostras de BCG.



Fonte: O autor, 2022.

A linha contínua representa a ligação entre os pontos de concentração das amostras de BCG, a linha pontilhada representa a tendência linear. Os ensaios foram realizados de forma independente utilizando ATP padrão, um *pool* de cinco ampolas de BCG (viabilidade) e uma ampola de cada lote de material de referência (NIBSC) ou lote de referência de trabalho (BRA/BCG/003).

4.4 Limites de detecção e de quantificação

Para determinar o LD e o LQ utilizou-se o método de repetições do branco. Logo, no presente estudo, foi realizado um ensaio de dosagem de ATP como descrito no item 3.5 e foram feitas 10 repetições do branco (meio Middlebrook 7H9 e tampão TE). O LD encontrado foi de, aproximadamente, 0,014 ng/ml de ATP (Tabela 3) e o LQ foi de, aproximadamente, 0,080 ng/ml (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados brutos para estimativa do Limite de Detecção e do Limite de Quantificação

Parâmetro	URL	ATP pmol/100µL	ng/100µL	ng/ml
LD	99,58	0,003	0,001	0,014
LQ	179,53	0,016	0,008	0,080

Fonte: O autor, 2022.

ATP: adenosina trifosfato, LD: limite de detecção, LQ: limite de quantificação, URL: Unidade Relativa de Luz, ml: mililitro, ng: nanograma, pmol: picomol, µL: microlitro.

4.5 Avaliação da repetibilidade

Para determinar a repetibilidade do método de dosagem de ATP da vacina BCG foi avaliado o grau de concordância entre os resultados de três ensaios independentes realizados em dias diferentes pelo mesmo técnico/analista. O coeficiente de variação (desvio padrão relativo) das amostras, do mesmo lote, nas diluições 1/1, 1/2 e 1/4 foi de 18,2 %, 17,1 % e 14,1 %, respectivamente para o teste de viabilidade (Tabela 4). Para avaliação da termoestabilidade, quando as amostras foram submetidas a estresse térmico antes do ensaio de dosagem, o coeficiente de variação das amostras nas diluições de 1/1, 1/2 e 1/4 foi de 11,9 %, 9,5 % e 6,5 %, respectivamente. (Tabela 5).

Tabela 4 - Dados para estimativa da repetibilidade de amostras de BCG mantidas sob refrigeração

BCG (Viabilidade)				
Diluições	A	B	C	%RDS
1/1	11,8	8,4	11,9	18,2
1/2	6,6	4,6	6,4	17,1
1/4	2,9	2,5	3,2	14,1

Fonte: O autor, 2022.

Os dados foram obtidos através de três ensaios realizados em dias diferentes de forma independente (A, B e C), pelo mesmo técnico/analista, utilizando amostras de vacina BCG (viabilidade). Os valores reportados (ng/ml), referentes a cada ensaio, foram obtidos pelo cálculo da média das repetições. O desvio padrão relativo entre os três ensaios foi expresso na forma de porcentagem (%RDS).

Tabela 5 - Dados para estimativa da repetibilidade de amostras de BCG submetidas a estresse térmico

BCG (Termoestabilidade)				
Diluições	A	B	C	%RDS
1/1	7,3	6,0	5,7	11,9
1/2	3,3	3,2	3,3	9,5
1/4	1,8	1,7	1,8	6,5

Fonte: O autor, 2022.

Os dados foram obtidos através de três ensaios realizados em dias diferentes de forma independente (A, B e C), pelo mesmo técnico/analista, utilizando amostras de vacina BCG (termoestabilidade). Os valores reportados (ng/ml), referentes a cada ensaio, foram obtidos pelo cálculo da média das repetições. O desvio padrão relativo entre os três ensaios foi expresso na forma de porcentagem (%RDS).

4.6 Precisão intermediária

Para determinar a precisão intermediária do método de dosagem de ATP em amostras de vacina BCG, foi avaliado o grau de concordância entre os resultados de três ensaios independentes realizados em dias diferentes por diferentes técnicos/analistas. Com base nos ensaios realizados foi possível demonstrar que o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) das amostras de vacina BCG (viabilidade) de um mesmo lote e do lote de referência de trabalho (BRA/BCG/003) foi de 16,2% e 25,9%, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados para estimativa da precisão intermediária de amostras de BCG

Amostras	A	B	C	%RDS
BCG (viabilidade)	6,9	5,2	6,9	16,2
BRA003	27,7	16,5	27,9	25,9

Fonte: O autor, 2022.

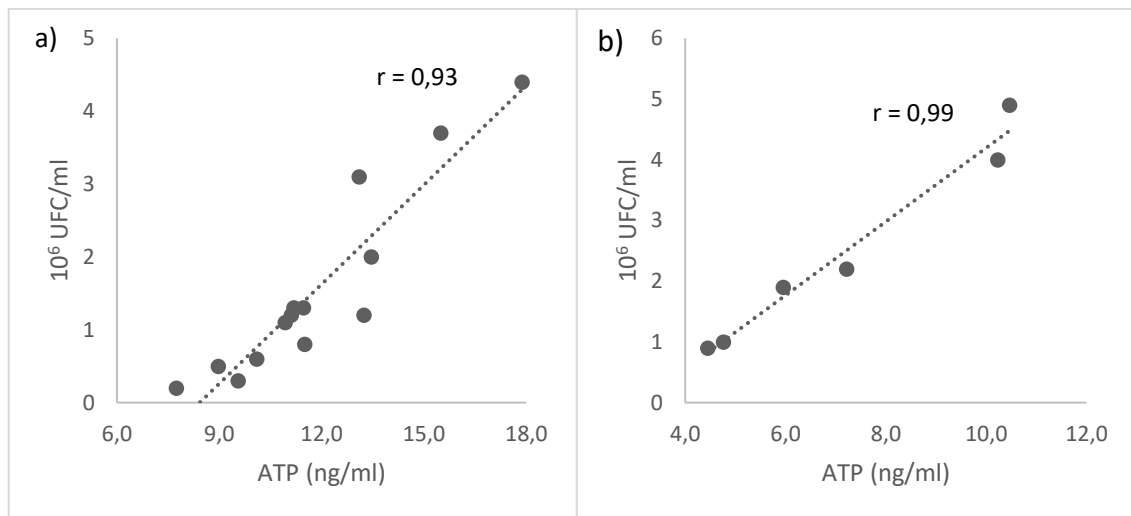
Os dados foram obtidos através de três ensaios realizados em dias diferentes de forma independente (A, B e C), por três técnico/analista diferentes, utilizando amostras de vacina BCG (viabilidade) e material de referência (BRA/BCG/003). Os valores reportados (ng/ml), referentes a cada ensaio, foram obtidos pelo cálculo da média das repetições. O desvio padrão relativo entre os três ensaios foi expresso na forma de porcentagem (%RDS).

4.7 Correlação entre as técnicas de dosagem de ATP e contagem de UFC

Para avaliar a correlação entre a viabilidade determinada pelo método de dosagem de ATP e a viabilidade determinada pelo método de contagem de UFC, foram testadas amostras de vacina BCG liofilizada mantidas em duas diferentes condições de armazenamento: viabilidade (2 a 8 °C) e termoestabilidade (37 ± 1 °C por 28 dias). Cada amostra teve o teor de ATP e o número de UFC determinados. Os dados demonstram uma correlação positiva estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre o teor de ATP e o número de UFC com um coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,93$, em amostras de lotes armazenados por 15-24

meses a 2 a 8 °C (Figura 6a). Além disso, os dados demonstram uma correlação positiva estatisticamente significativa ($p = 0,0002$) entre o teor de ATP e o número de UFC de amostras de lotes armazenados por 1-3 meses a 2 a 8 °C, com um coeficiente de correlação de Pearson, $r = 0,99$ (Figura 6b). Também, foi observado uma correlação baixa, $r = 0,27$, $r = -0,25$ e $r = 0,54$, em outros três diferentes ensaios, feitos em três dias diferentes, com dez, oito e oito amostras de BCG, respectivamente. Essas amostras de BCG foram testadas em dias diferentes e estavam armazenadas por um período superior a 24 meses (dados não mostrados).

Figura 6 - Correlação entre a quantidade de ATP e a contagem de UFC.



Fonte: O autor, 2022.

O gráfico (a) representa a correlação linear entre os resultados da dosagem de ATP (ng/ml) e a contagem de UFC de 14 amostras de BCG armazenadas por 15-24 meses; o gráfico (b) representa o resultado da correlação linear entre ATP e UFC de 6 amostras de BCG armazenadas por 1-3 meses. A linha pontilhada é a linha de tendência linear.

5 DISCUSSÃO

A contagem de UFC é fundamental para o controle da qualidade e estabilidade da vacina BCG. Entretanto, a técnica atualmente utilizada pelo INCQS para estimar a viabilidade, contagem de bacilos viáveis em meio LJ, é lenta, trabalhosa e com alto custo. Portanto, torna-se necessária a aplicação de metodologias alternativas rápidas para substituir o método executado na rotina laboratorial do controle da qualidade de vacina BCG (CRISPEN, 1971; KAMATH *et al.*, 2005; UGAROVA *et al.*, 2016). Além disso, o ensaio de contagem de UFC apresenta muita variação entre os resultados e muitas vezes não é reprodutível devido às dificuldades associadas ao cultivo de micobactérias, incluindo a característica desses microorganismos em formar grumos e sua necessidade de meios de crescimento complexos (UGAROVA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, o ensaio de dosagem de ATP tem sido apontado como um procedimento alternativo, eficiente e mais rápido para quantificar unidades viáveis do BCG (HO *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2008; KOLIBAB *et al.*, 2012; UGAROVA *et al.*, 2016). O ensaio de ATP consiste, basicamente, em provocar uma reação da enzima luciferase com o ATP intracelular, presente em todas as células vivas e, assim, proporcionar uma estimativa confiável do número de células viáveis (IMAMURA *et al.*, 2009). O presente trabalho buscou avaliar a eficiência da técnica de dosagem de ATP na determinação do número de bacilos viáveis de BCG em amostras de vacina liofilizada, comumente utilizadas na rotina laboratorial do setor de vacinas BCG do departamento de microbiologia do INCQS.

Inicialmente, foram avaliados parâmetros relacionados com o protocolo padrão de dosagem de ATP, estabelecido pela OMS (DAGG *et al.*, 2012), e o kit comercial para detecção de células viáveis utilizado nos ensaios. O kit comercial *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay*, fornece a solução de detecção de ATP e o fabricante garante que a extração do ATP pode ser realizada sem a necessidade da utilização de algum outro reagente como, por exemplo, um tampão. Entretanto, os testes realizados para obter essa conclusão foram feitos com cultura de células leucêmicas de linfócitos humanos (Jurkat). Por isso, foi necessário avaliar se a eficiência da extração de ATP em vacina BCG, feita com a solução de detecção, seria equivalente ou não à extração feita utilizando tampão TE aquecido como recomendado pelo protocolo da OMS. Observamos que a extração de ATP foi superior utilizando tampão TE aquecido em três diferentes diluições testadas. Enquanto que a diferença da quantidade de ATP detectado, entre as diluições, em amostras que não tiveram o ATP extraído utilizando tampão TE aquecido, foi mínima. Demonstrando, assim que a utilização do tampão TE

aquecido é necessária para uma boa extração do ATP, corroborando com os dados presentes na literatura (PRIOLI *et al.*, 1985; HOFFNER *et al.*, 1999; JENSEN *et al.*, 2008; KOLIBAB *et al.*, 2012).

A validação do kit realizada pelo fabricante demonstrou uma forte correlação linear entre URL e quantidade de células por poço em ensaios utilizando 100 µL, 25 µL e 4 µL. Além disso, nossos resultados demonstraram que não há diferença expressiva na quantidade de ATP detectada utilizando diferentes volumes (100 µL, 50 µL e 25 µL) da solução de detecção de células viáveis. Também, observamos boa linearidade das curvas ATP padrão feitas com os diferentes volumes dessa solução. Entretanto, a curva ATP padrão, preparada com 25 µL de solução de detecção apresentou menor coeficiente de correlação (R^2) entre as variáveis. Sendo assim, como o laboratório não é equipado para trabalhar com pequenos volumes, nós padronizamos o protocolo para utilizar 50 µL da solução de detecção de ATP na proporção 1:1 com as amostras.

O presente estudo também demonstrou que o método de dosagem de ATP apresenta boa linearidade entre os materiais utilizados na rotina do laboratório: curva ATP padrão na faixa de 0,3125 a 10 pmol/100µL ($R^2 = 0,999$), vacina BCG (viabilidade) ($R^2 = 0,999$), lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 ($R^2 = 0,992$), Moreau-RJ NIBSC 10/272 ($R^2 = 0,991$), Tokyo NIBSC 07/272 ($R^2 = 0,984$) e Russian BCG-I NIBSC 07/274 ($R^2 = 0,953$). Boas correlações lineares utilizando o método de dosagem de ATP já foram descritas anteriormente. Em 2008, Jensen e colaboradores demonstraram que o método de dosagem de ATP apresentava forte correlação linear ($r \geq 0,99$) por meio de um ensaio estabelecendo a relação entre dose e resposta para o ATP extraído do BCG (JENSEN *et al.*, 2008). Já em 2016, Ugarova e colaboradores demonstraram uma forte correlação linear ($R^2 = 0,9986$) entre a concentração de ATP e o sinal de bioluminescência (UGAROVA *et al.*, 2016). Outro estudo, publicado em 2019, também demonstrou uma forte correlação linear ($R^2 = 0,9992$) entre a concentração de ATP e a URL (NAFCHI *et al.*, 2019). A Farmacopeia Brasileira preconiza que o método alternativo não deve possuir um valor de R^2 menor que 0,95, ou seja, todos os resultados encontrados, no presente estudo, estão dentro dos valores considerados aceitáveis (BRASIL, 2019).

Além disso, demonstramos que os resultados obtidos se encontram dentro do LD (= 0,014 ng/ml) e do LQ (= 0,080 ng/ml) do método de dosagem de ATP o que aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos. Outro grupo identificou um LD, em amostras de vacina

BCG, de 0,03 ng, mas o resultado varia de acordo com a metodologia empregada (NAFCHI *et al.*, 2019).

A repetibilidade entre diferentes ensaios apresentou coeficiente de variação < 19 % para amostras de viabilidade e < 12 % para amostras de termoestabilidade. Em um estudo anterior foi demonstrado que o método de dosagem de ATP em amostras de vacina BCG apresentou coeficiente de variação para repetibilidade de 5,5 % para amostras de termoestabilidade e 5,1 % para amostras de viabilidade (JENSEN *et al.*, 2008). Além disso, Nafchi e colaboradores demonstraram coeficiente de variação de 8,3 % para amostras da vacina BCG (NAFCHI *et al.*, 2019). A Farmacopeia Brasileira determina que são aceitáveis para os métodos valores menores que 30 % para o coeficiente de variação na avaliação da repetibilidade. Nossos resultados apresentaram valores mais altos quando comparados com os valores encontrados na literatura (JENSEN *et al.*, 2008; NAFCHI *et al.*, 2019). Entretanto, Jensen e colaboradores avaliaram vacinas BCG preparadas com a subcepa dinamarquesa 1331 e Nafchi e colaboradores avaliaram vacinas BCG preparadas com a subcepa Pasteur 1173P2, ambas diferentes das vacinas investigadas no presente estudo. A utilização de vacinas preparadas com subcepas distintas pode explicar a diferença nos valores de repetibilidade observados no presente estudo e nos estudos anteriores. No entanto, o método de dosagem de ATP apresentou valores considerados aceitáveis pela Farmacopeia brasileira (coeficiente de variação < 30 %), sendo assim, os resultados obtidos com o método de dosagem de ATP apresentaram repetibilidade aceitável entre os resultados de ensaios independentes feitos pelo mesmo operador (BRASIL, 2019).

Os resultados obtidos para o método apresentaram precisão intermediária de 16,2 % para amostras de viabilidade e 25,9 % para o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003. Jensen e colaboradores encontraram valores de 15 % e 9 % para amostras de termoestabilidade e viabilidade, respectivamente. Entretanto, estes autores utilizaram vacina BCG preparada com a subcepa dinamarquesa 1331 (JENSEN *et al.*, 2008). As subcepas da vacina BCG utilizadas no presente estudo e por Jensen e colaboradores foram diferentes o que poderia justificar a diferença entre os resultados encontrados. A Farmacopeia Brasileira também considera coeficiente de variação < 30 % aceitável. Logo, o método de dosagem de ATP da vacina BCG, abordado neste estudo, apresenta resultados com boa precisão entre ensaios independentes feitos em dias e por operadores diferentes (BRASIL, 2019).

No presente estudo, encontramos uma boa correlação linear ($r = 0,93$) entre amostras de vacina BCG (viabilidade e termoestabilidade) armazenadas por um período longo (15 a 24

meses) e uma alta correlação ($r = 0,99$) entre amostras armazenadas pelo período curto (1 a 3 meses). Entretanto, foi observado uma correlação linear baixa ($r = 0,27$, $r = -0,25$ e $r = 0,54$) em outras 23 amostras de BCG, armazenadas por um período superior a 24 meses (dados não mostrados). Acreditamos, que o ensaio com amostras armazenadas por um longo período de tempo apresente maior variabilidade nos resultados diminuindo as chances de se obter uma boa correlação. Além disso, uma clara discriminação na viabilidade foi encontrada entre amostras de termoestabilidade e amostras de viabilidade (não submetidas a estresse térmico) do mesmo lote de vacina; este tratamento térmico de amostras é um teste de controle da qualidade obrigatório para demonstrar a estabilidade da vacina (OMS, 1987; COUNCIL OF EUROPE, 2006; BRASIL, 2019). Há relato na literatura de uma correlação positiva ($p < 0,0001$) entre a quantidade de ATP e as UFC com coeficiente de correlação de $r = 0,934$ em um estudo realizado com 50 amostras de vacina BCG (JENSEN *et al.*, 2008). Ugarova e colaboradores encontraram uma correlação linear de $r = 0,95$ entre quantidade de ATP e contagem de UFC em um estudo realizado com 48 amostras de vacina BCG (UGAROVA *et al.*, 2016). Portanto, nossos dados corroboram com os dados encontrados na literatura, mas a confirmação dos resultados deve ser feita com um número maior de amostras de vacina BCG com período de armazenamento curto (1 a 3 meses).

A Farmacopeia Brasileira determina que para o controle da qualidade de vacina BCG é necessário realizar o teste de esterilidade. Portanto, não foram realizados ensaios para determinar a especificidade do método de dosagem de ATP, pois mesmo o método sendo específico para ATP, mas não para BCG, acreditamos que não faria sentido demonstrar a especificidade usando outros micro-organismos interferentes em amostras contendo, sabidamente, apenas o BCG.

6 CONCLUSÃO

A extração de ATP da vacina BCG utilizando tampão TE aquecido apresentou rendimento superior em relação a utilização apenas da solução de detecção do kit comercial *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay*. Logo, a utilização do tampão TE é indispensável para o ensaio. Além disso, não se observou diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de ATP da vacina BCG detectada utilizando três diferentes volumes (100 µL, 50 µL ou 25 µL) da solução de detecção de ATP do kit comercial. Portanto, o protocolo pode ser realizado com a utilização de um volume de 50 µL da solução de detecção.

O método de dosagem de ATP da vacina BCG apresentou forte correlação linear para o ATP padrão ($R^2 = 0,999$), amostras de vacina BCG (viabilidade) ($R^2 = 0,999$), lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 ($R^2 = 0,992$), material de referência Moreau-RJ NIBSC 10/272 ($R^2 = 0,991$), subcepas Tokyo NIBSC 07/272 ($R^2 = 0,984$) e Russian BCG-I NIBSC 07/274 ($R^2 = 0,953$). Bem como, o método de dosagem de ATP em vacina BCG apresentou limite de detecção e limite de quantificação dentro dos limites considerados aceitáveis para o método.

O método de dosagem de ATP em vacina BCG apresenta boa repetibilidade para amostras de viabilidade e amostras de termoestabilidade, e boa precisão intermediária para amostras de viabilidade e para o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003. Adicionalmente, o método de dosagem de ATP em vacina BCG apresenta boa correlação com a contagem de UFC, sendo $r = 0,93$ entre 14 amostras de vacina BCG (viabilidade e termoestabilidade) armazenadas por um período longo (15-24 meses) e uma alta correlação ($r = 0,99$) entre 6 amostras armazenadas pelo período curto (1-3 meses). Logo, o método pode ser futuramente validado, para substituir o método convencional utilizado no controle da qualidade da vacina BCG do INCQS.

REFERÊNCIAS

- ANDO, Y., *et al.* Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. *Nature Photonics*, 2.1: 44-47, 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). gov.br. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/orgaos/agencia-nacional-de-vigilancia-sanitaria>. Acesso em: 24 jan. 2022.
- ASKGAARD, D. S., *et al.* Firefly luciferase assay of adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines. *Biologicals*, 23.1: 55-60, 1995.
- ASKGAARD, D. S., *et al.* Firefly luciferase assay of adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines. *Biologicals*, 23.1: 55-60, 1995.
- BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M., e FERREIRA, A. A. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 45-54, jul. 2006. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jped/a/TCg8DMtnxLMtRfRvFb5QxZs/?lang=pt>. Acesso em: 17 jan. 2022 ago. 2021.
- BLOOM, B. R.; FINE, P. E. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, 531-557, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria de autorização e registro sanitários. gerência-geral de medicamentos e produtos biológicos. resolução-re nº 3.403, de 20 de dezembro de 2016. *Diário Oficial da União*. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=93&data=21/12/2016>. Acesso em: 24 jan. 2022.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, 6ª ed., 2019. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VOTO Nº 053/2021/SEI/DIRE1/ANVISA. Brasília: Ministério da Saúde, 2021b. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/composicao/diretoria-colegiada/reunioes-dadiretoria/votos/2021/copy2_of_rop-11.2021/item-5-1-2-1-voto-53-2021-dire1.pdf. Acesso em: 24 jan. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coberturas Vacinais no ano da pandemia. Brasília: Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações- Cgpn, 2020. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoestemporarias/externas/56a-legislatura/enfrentamento-pandemia-covid19/apresentacoes-em-eventos/FrancieliFontana.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunizações e Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunizações e Doenças Transmissíveis. – 4. ed. atual. Brasília: Ministério

da Saúde, 2021a. Disponível em:

https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/julho/07/manual_eventos-_adversos_pos_vacinacao_4ed_atualizada.pdf. Acesso em: 16 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública. Brasília, DF: MS, 2021.

BRICKS, L. F. Vacina BCG: via percutânea ou intradérmica?. *Jornal de Pediatria*. Rio de Janeiro, p. 93-98. 2004. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/jped/a/QwzTQygfH95zyzB3prxkVtJ/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 17 jan. 2022.

CALCIOLARI, R. (2008). O poder regulamentar das agências em matéria sanitária. *Revista da Faculdade de Direito da USP*. Consultado em 24 de jan. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Tuberculosis (TB): signs and symptoms. CDC. 2016. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/tb/topic/basics/signsandsymptoms.htm>. Acesso em: 13 jan. 2022.

CHARD, A. N., GACIC-DOBO, M., DIALLO, M. S., SODHA, S. V., e WALLACE, A. S. Routine vaccination coverage—Worldwide, 2019. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69, 1706, 2020.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da vigilância sanitária no Brasil. Rozenfeld S, organizadora. *Fundamentos da vigilância sanitária*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 15-40, 2000.

CRISPEN, R. G. Rapid testing of freeze dried BCG vaccine for stability and viability. In: *Symp Ser Immunobiol Stand*. p. 205-210, 1971.

COUNCIL OF EUROPE,. Alternative methods for control of microbiological quality. General texts 7/2006:4131e42. 5.1.6. 5.5 supplement. In: *The European Pharmacopoeia*. Strasbourg, France. 2006.

COUNCIL OF EUROPE. Vaccine BCG. Freeze-dried. 5.5. Monograph 07/2006:0163. In: *The European Pharmacopoeia*, Strasbourg, France. 2006.

DAGG, B., *et al.* The establishment of sub-strain specific WHO Reference Reagents for BCG vaccine. *Vaccine*, 32.48: 6390-6395, 2014.

DAGG, B., RIGSBY, P., HOCKLEY, J., HO, M. M., WHO Expert Committee on Biological Standardization. *et al.* International collaborative study to evaluate and establish the 1st WHO reference reagent of BCG vaccine of moreau-RJ sub-strain. World Health Organization, 2012.

FOX, W.; ELLARD, G. A.; MITCHISON, D. A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3.10: S231-S279, 1999.

FRIEDEN T.R., STERLING T.R., MUNSIFF S.S., WATT C.J e DYE C. Tuberculose. Lancet, 362:887–899, 2003.

FUNDAÇÃO ATAUPHO DE PAIVA (Rio de Janeiro). Bula Profissional Vacina BCG. Disponível em: <http://www.fundacaoataulphodepaiva.com.br/bula-profissionalvacina-bcg/>. Acesso em: 16 jan. 2022.

GHEORGHIU, M., *et al.* mesure rapide de viabilite du bcg par dosage de l'ATP. Ann Microbiol; 130:147e56, 1979.

GHEORGHIU, M., LAGRANDERIE, M., e BALAZUC, A. M. Methode rapide de controle sur le terrain de la viabilite du vaccin BCG par dosage de l'ATP. Journal of biological standardization, 12, 257-264, 1984.

HARRIS, C. M., e KELL, D. B. The estimation of microbial biomass. Biosensors, 1, 17-84, 1985.

HARRIS, R. E. Epidemiology of chronic disease: global perspectives. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning. p. 682, 2013.

HAWN, T. R., *et al.* Tuberculosis vaccines and prevention of infection. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78.4: 650-671, 2014.

HO, M. M., *et al.* Report of an International collaborative study to establish the first WHO reference reagents for BCG vaccines of three different sub-strains. Vaccine, 29.3: 512-518, 2011.

HO, M. M., *et al.* Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine. Vaccine, 26.36: 4754-4757, 2008.

HOFFNER, S., JIMENEZ-MISAS, C., e LUNDIN, A. Improved extraction and assay of mycobacterial ATP for rapid drug susceptibility testing. Luminescence, 14, 255-261, (1999).

IMAMURA, H., *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106.37: 15651-15656, 2009.
Immunological Basis for Immunization/ Module 5: Tuberculosis. WHO/EPI/GEN/93.15, 1993.

JENSEN, S. E., *et al.* Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine. Biologicals, 36.5: 308-314, 2008.

KAMATH, A. T., *et al.* New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development. Vaccine, 23.29: 3753-3761, 2005.

KOLIBAB, K., *et al.* Characterization of an intracellular ATP assay for evaluating the viability of live attenuated mycobacterial vaccine preparations. Journal of microbiological methods, 90.3: 245-249, 2012.

- KONIECZKA, P., e NAMIESNIK, J. Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory: A practical approach. Boca Raton: CRC Press. 2009.
- LUGOSI, L. Theoretical and methodological aspects of BCG vaccine from the discovery of Calmette and Guerin to molecular biology. A review. *Tubercle and Lung Disease*, 73.5: 252-261, 1992.
- LUNDIN, A. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. 2000.
- MADIGAN, M.T., *et al.* Brock Biology of Microorganisms eBook. 16 ed. Pearson Higher Ed. 574-575 p. 2021.
- MANGTANI, P., *et al.* Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clinical infectious diseases*, 58, 470-480, 2014.
- MARKEY, K., *et al.*, WHO Expert Committee on Biological Standardization, & World Health Organization. International collaborative study to evaluate and establish the 1st WHO reference reagents for BCG vaccines of Russian BCG-I sub-strain (No. WHO/BS/10.2148). World Health Organization. 2010.
- MCELROY, W. D. The energy source for bioluminescence in isolated systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 33, 342-348, 1947.
- MEEHAN, C. J., *et al.* Reconstituting the genus *Mycobacterium*. *bioRxiv*. 2021.
- Meeting Report. WHO consultation on the characterization of BCG strains, Imperial College, London 15-16, 2003.
- MILSTIEN, J. B., e 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*, 68, 93, 1990.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Ministério da Saúde. Vacina BCG completa 44 anos de imunização da população brasileira contra a tuberculose: Além de proteger contra a tuberculose, o imunizante também pode reforçar o sistema imunológico da criança contra outras doenças. Brasil, 1 jul. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/vacina-bcg-completa-44-anos-de-imunizacao-da-populacao-brasileira-contra-a-tuberculose-3>. Acesso em: 16 jan. 2022.
- NAFCHI, M. Z., *et al.* A Modified ATP Assay for Test the Potency of BCG Vaccine. *Archives of Pharmacy Practice*, 1, 20, 2019.
- OETTINGER, T., *et al.* Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and lung disease*, 79, 243-250, 1999.
- ORGANIZATION, WORLD HEALTH. Implementing the WHO Stop TB Strategy: a handbook for national TB control programmes. Geneva: World Health Organization. p. 179. (2008).

PRIOLI, R.P., T.A. e BROWN, I.N. Rapid methods for counting mycobacteria—comparison of methods for extraction of mycobacterial adenosine triphosphate (ATP) determined by firefly luciferase assay. *Tubercle* 66, 99–108, 1985.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC nº 73, de 21 de outubro de 2008. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis > Acessado em: 07 mar. 2022.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis > Acessado em: 08 mar. 2022.

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. *Bol. Pneumol. Sanit.*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 35-59, jun. 2001. Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X2001000100005&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 17 jan. 2022.

STAVRI, D. *et al.* Facteurs d'erreur intervenant dans la détermination du nombre d'unités viable du vaccin BCG lyophilisé. *Arch. Roum. Path. Microbiol.*, 33, 171-179, (1974).
TRABULSI, L.R. e ALTERTHUM, F. *Microbiologia*, 6.ed. São Paulo: Atheneu, p. 484. 2015.

Tuberculosis Fact sheet N°104». WHO. Outubro de 2015. Consultado em 13 de janeiro de 2022. Cópia arquivada em 23 de agosto de 2012.

UGAROVA, N. N., *et al.* A simplified ATP method for the rapid control of cell viability in a freeze-dried BCG vaccine. *Journal of microbiological methods*, 130: 48-53, 2016.

WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for dried BCG vaccine. WHO Tech Rep Ser, 329, 23, 1966.

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

WHO Technical report series no. 745. Requirements for dried BCG vaccine; 1987.

Anexo A - Meios de Cultura e reagentes: composição e preparo

A.1 – Meio Middlebrook 7H9

a) Composição do meio base

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

pH final do meio base: $6,6 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b) Solução de enriquecimento

Albumina bovina, fração V	5,0 g
Dextrose	2,0 g
Catalase (de carne)	0,003 g
Água purificada	100 mL

Esterilização feita por filtração em membrana.

Dissolver os componentes do meio base em 900 mL de água purificada contendo 2,0 mL de glicerol. Aquecer a mistura até dissolução. Distribuir em porções de 180 mL. Autoclavar durante 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A cada porção de 180 mL a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, adicionar asepticamente, 20 mL da solução de enriquecimento. Distribuir em porções de 20 mL em tubos de 25 mm x 200 mm ou similar com tampa de rosca.

A.2 – Tampão Tris-EDTA

Trizma Base	6,06 g
EDTA	0,29 g
Água purificada	500 mL

pH final do tampão Tris-EDTA: $7,75 \pm 0,1$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Autoclavar durante 15 minutos a 121 °C.

A.3 - Meio sólido de Lowenstein-Jensen

a) Composição do meio base

Fosfato de potássio monobásico.....	2,4 g
Sulfato de magnésio	0,24 g
Citrato de magnésio	0,6 g
Asparagina.....	3,6 g
Farinha de batata.....	30,0 g
Verde malaquita.....	0,4 g
Água destilada.....	600 mL

b) Preparo da base

Inicialmente é necessário pesar, em recipiente de aço inoxidável com capacidade para 5 litros, a quantidade recomendada pelo fabricante para preparar 3600 mL de meio. Em seguida, adicionar 72 mL de glicerol 87%, 3600 mL de água destilada e misturar utilizando bastão de vidro. Na sequência verificar o pH que deve ser de $4,8 \pm 0,2$, aquecer sob agitação até a dissolução completa dos ingredientes e interromper o aquecimento assim que for observada ebulição, não deixando que o meio ferva. Logo depois, transferir para Erlenmeyer e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

c) Suspensão de ovos

- utilizar 12 dúzias de ovos não embrionados de tamanho médio, de casca lisa e sem ranhuras. O rendimento esperado é de aproximadamente 6 litros de suspensão;
- lavar bem os ovos com água e detergente neutro utilizando escova;
- enxaguar em água corrente;
- VI) enxaguar em água destilada e descartar ovos rachados e que flutuem durante imersão;
- 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;
- colocar os ovos lavados em recipiente contendo solução de álcool etílico a 70% durante 15 – 20 minutos;
- enxugar cada ovo com gaze;
- quebrar os ovos, colocar a clara e a gema em béquer esterilizado;
- bater o conteúdo, utilizando uma batedeira manual, até que seja obtido aspecto homogêneo;
- transferir para recipiente de vidro esterilizado com capacidade para 12 litros.

d) Preparo e distribuição do meio

- misturar a suspensão de ovos (c) com a base (a) e transferir para um recipiente de 12 L;
- misturar bem até que a suspensão adquira aspecto homogêneo;
- verificar o pH que deve ser de $7,1 \pm 0,3$;
- filtrar a mistura em gaze estéril disposta em recipiente de aço inoxidável, também estéril, com capacidade para aproximadamente 18 litros;
- colocar o recipiente com a suspensão sob placa de agitação para a homogeneização permanente;
- transferir parte da suspensão para garrafa adaptável a dispensador automático regulado para 15 mL;
- distribuir automaticamente volumes de 15 mL da suspensão por tubo 25 x 200 mm provido de rolha
- de gaze, tendo-se o cuidado de verter o meio somente em um lado do tubo e evitando a formação de bolhas.
- e) Coagulação do meio
- ligar o coagulador e aguardar até a estabilização da temperatura entre 81 e 88 °C;
- dispor os tubos em 4 bandejas inclinadas do coagulador e prendê-los com fita adesiva tomando-se a precaução de manter a posição do envase e de permitir a circulação do ar no interior do equipamento;
- depois de colocar as bandejas esperar a temperatura atingir 81 a 88 °C e coagular o meio durante 45 minutos;
- retirar os tubos das bandejas e colocá-los em caixas plásticas para armazenamento;
- repetir as etapas com todos os tubos envasados, mantendo-se o início da coagulação sempre entre 81 e 88 °C durante 45 minutos.

A.4 – Meio Sauton (diluído 1:4)

a) Composição

Sulfato de magnésio heptahidratado	0,125 g
Ácido cítrico monohidratado	0,55 g
Fosfato dipotássico.....	0,125 g
L-asparagina	1,0 g
Citrato férrico de amônio	0,0125 g
Glicerol 87%.....	15 mL
Água destilada	1000 mL

b) Preparo:

Inicialmente é preciso dissolver todos os componentes sob aquecimento brando. Em seguida, distribuir nos volumes especificados na requisição de preparo, em erlenmeyers providos de bucha de algodão e gaze previamente esterilizadas a 121 °C por 30 minutos. Logo depois, esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. O pH final deve ser: $7,0 \pm 0,2$.