

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

Karen Vasconcelos de Farias Faro

**ANÁLISE DE TRÊS PADRÕES DE REFERÊNCIA INTERNACIONAIS FRENTE AOS
PROCEDIMENTOS UTILIZADOS EM ENSAIOS DE VIABILIDADE E IDENTIDADE
DE VACINA BCG**

Rio de Janeiro

2022

Karen Vasconcelos de Farias Faro

ANÁLISE DE TRÊS PADRÕES DE REFERÊNCIA INTERNACIONAIS FRENTE AOS
PROCEDIMENTOS UTILIZADOS EM ENSAIOS DE VIABILIDADE E IDENTIDADE DE
VACINA BCG

Monografia apresentada ao Curso de Especialização Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária 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 Certificado de conclusão do curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância.

Orientadora: Doutora Talita Coelho de Souza

Rio de Janeiro

2022

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Faro, Karen Vasconcelos de Farias

Análise de três padrões de referência internacionais frente aos procedimentos utilizados em ensaios de viabilidade e identidade de vacina BCG. / Karen Vasconcelos de Farias Faro. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

66 f. : fig. ; tab.

Monografia (Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientador: Dr Talita Coelho de Souza.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

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

Analysis of three international reference standards against the procedures used in tests of viability and identity of BCG vaccine.

Karen Vasconcelos de Farias Faro

ANÁLISE DE TRÊS PADRÕES DE REFERÊNCIA INTERNACIONAIS FRENTE AOS
PROCEDIMENTOS UTILIZADOS EM ENSAIOS DE VIABILIDADE E IDENTIDADE DE
VACINA BCG

Monografia apresentada ao Curso de Especialização Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária 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 Certificado de conclusão do curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ

Dra. Renata Faria de Carvalho
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ

Dra. Bruna Peres Sabagh
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ

ORIENTADOR

Dra. Talita Coelho de Souza
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ

Dedico este trabalho a minha amada mãe que sempre esteve presente em toda a minha trajetória de erros e acertos, conquistas e derrotas, sempre torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva da vida.

À minha família e amigos por acreditarem em mim e me apoiarem.

À minha orientadora Dra. Talita Coelho de Souza por ter aceitado esta orientação, pelo auxílio nos experimentos e na produção deste material.

Ao meu colega de laboratório Antônio pelo acolhimento, por me ensinar desde o começo os procedimentos nos mínimos detalhes e ser o primeiro a me apresentar este novo universo que é a qualidade em saúde.

Aos meus colegas Eliana e Dener por me acompanharem no dia a dia laboratorial, me auxiliarem em experimentos e me transmitirem seus conhecimentos.

À minha antiga casa UFRJ que moldou minha base acadêmica e me proporcionou chegar a esta enorme instituição que é a FIOCRUZ, a qual tenho tanto orgulho.

À coordenação do curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária na pessoa da coordenadora Msc. Mararlene Ulberg Pereira.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde na pessoa do diretor Dr. Antônio Eugênio de Almeida por todos os trabalhos desenvolvidos de enorme relevância para a saúde pública deste país.

Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

A tuberculose compreende o grupo das dez doenças que mais matam em países de baixa e média renda. Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas em todo o planeta terão tuberculose anualmente. Para sua prevenção, o Sistema Único de Saúde (SUS) conta com a vacina Bacilo de Calmette e Guérin (BCG). Esta foi desenvolvida em 1921 pelo médico Albert Calmette e pela veterinária Camille Guérin após contínuas passagens da cepa *Mycobacterium bovis* “Lait Nocard”, responsável por causar mastite tuberculosa bovina. A cepa original do BCG foi distribuída ao redor do mundo para imunização, o que ao longo do tempo culminou no surgimento de subcepas fenotipicamente distintas. Utilizada com objetivo de prevenir principalmente formas graves da tuberculose, a vacina BCG faz parte do calendário do Programa Nacional de Imunizações (PNI) desde 1977. Nesse contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é essencial, pois é o órgão responsável por realizar o controle da qualidade das vacinas disponibilizadas pelo PNI, e conseqüentemente liberá-las para uso pela população brasileira. Em 2017, a vacina preparada com a subcepa Moreau-RJ utilizada no país foi substituída pela vacina preparada com a subcepa Russa BCG-I. Considerando o estabelecimento dos reagentes de referência da OMS de vacina BCG para subcepas NIBSC 10/272), Russa BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272), as quais são as subcepas predominantes na produção e distribuição de vacina BCG em todo o mundo, analisou-se estes padrões de referência frente aos procedimentos comumente utilizados no setor a fim de que o laboratório tenha essas informações. Foram realizados ensaios para avaliação da viabilidade por dosagem de trifosfato de adenosina (ATP) e pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio Lowenstein-Jensen, e para determinação da identidade por PCR multiplex e por coloração de Ziehl-Neelsen. Para a subcepa Moreau-RJ (NIBSC 10/272) obteve-se $5,34 \times 10^6$ UFC/ml e 17,91 ng/ml de ATP. Já para subcepa Russa (NIBSC 07/274) o valor encontrado foi de $1,78 \times 10^6$ UFC/ml e 3,15 ng/ml de ATP. O ensaio de viabilidade para determinação de UFC da subcepa Tokyo 172 (NIBSC 07/272) não pôde ser realizado por insuficiência de ampolas, mas obteve-se um valor de 63,94 ng/ml de ATP. Dentre as análises de viabilidade, apenas a dosagem de ATP da subcepa Moreau-RJ (NIBSC 10/272) apresentou resultado esperado conforme o certificado de análise do produtor. Já a identidade por PCR multiplex e por coloração de Ziehl-Neelsen foi satisfatória para os três padrões de referência. Com o uso dos procedimentos empregados na determinação da viabilidade e identidade do BCG em vacinas liofilizadas obteve-se desempenho satisfatório quanto a realização de análise de identidade, porém não atingiu os resultados esperados contidos no certificado de análise de cada um dos padrões de referência internacionais para contagem de UFC. Por outro lado, com relação a dosagem de ATP, método ainda não validado, atingiu-se o esperado apenas para o padrão de referência preparado com a subcepa Moreau-RJ. Todos os ensaios foram satisfatórios para o lote de vacina de referência de trabalho.

Palavras-chave: Vacina BCG. Controle da Qualidade. Identidade. ATP. UFC.

ABSTRACT

Tuberculosis comprehends the group of 10 diseases that most kill in low- and middle-income countries. About 10 million people across the world will get tuberculosis each year. For its prevention, the Unified Health System (SUS) counts on the Bacillus Calmette and Guérin (BCG) vaccine. This was developed in 1921 by the doctor Albert Calmette and veterinarian Camille Guérin after continuous passages of the *Mycobacterium bovis* strain “Lait Nocard”, responsible for causing bovine tuberculous mastitis. The original BCG strain was distributed around the world for immunization, which over time culminated in the emergence of phenotypically distinct substrains. Used mainly to prevent severe forms of tuberculosis, the BCG vaccine has been part of the National Immunization Program (PNI) calendar since 1977. In this context, the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) is essential, as it is the organ responsible for carrying out quality control of vaccines made available by the PNI, and consequently releasing them for use by the Brazilian population. In 2017, the vaccine prepared with the Moreau-RJ substrain used in the country was replaced by the vaccine prepared with the Russian BCG-I substrain. Considering the establishment of WHO BCG vaccine reference reagents for substrains NIBSC 10/272), Russian BCG-I (NIBSC 07/274) and Tokyo 172 (NIBSC 07/272), which are the predominant substrains in production and distribution of BCG vaccine worldwide, these reference standards were analyzed against the procedures commonly used in the sector so that the laboratory has this information. Assays were performed to determine viability by the adenosine triphosphate (ATP) content and by counting colony forming units (CFU), and to determine identity by multiplex PCR and Ziehl-Neelsen staining. For the viability assay by counting CFU and by ATP content of the Moreau-RJ substrain, was observed the presence of 5.34×10^6 CFU/ml and 17.91 ng/ml ATP, respectively. For the Russian substrain, the value found was 1.78×10^6 CFU/ml and 3.15 ng/ml of ATP. For the Tokyo substrain, the viability test by CFU could not be performed due to insufficient ampoules in this department, but the ATP content value was 63.94 ng/ml. Among the viability analyses, only the ATP dosage for the NIBSC 10/272 Moreau-RJ substrain showed the expected result according to the WHO package insert. The procedures used to determine the viability and identity of BCG in lyophilized vaccines, satisfactory performance was obtained regarding the performance of identity analysis, but it did not reach the expected results contained in the certificate of analysis of each of the international reference standards for CFU count. Otherwise, regarding ATP dosage, a method not yet validated, the expected was reached only for the reference standard prepared with the Moreau-RJ substrain. All assays were satisfactory for the working reference vaccine lot.

Keywords: BCG vaccine. Quality control. Identity. ATP. CFU.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Fluxograma geral do ensaio de Contagem de Unidades Formadoras de colônias.....	29
Figura 2 –Esquema de diluição 4 utilizado para o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 e para a subcepa Moreau-RJ NIBSC 10/272.	31
Figura 3 -Esquema de diluição 3 utilizado para para a subcepa Russian BCG-I NIBSC 07/274.....	31
Quadro 1 - Exemplificação das diluições e seu conteúdo no esquema de diluição 4 utilizado para o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 e para o reagente de referência NIBSC 10/272 (subcepa Moreau-RJ).	32
Quadro 2 - Exemplificação das diluições e seu conteúdo no esquema de diluição 3 utilizado para o reagente de referência NIBSC 07/274 (subcepa Russian BCG-D).....	33
Figura 4 -Esquema de diluição seriada para preparo da curva padrão de ATP.....	36
Figura 5 -Esquema de diluição seriada para preparo da curva padrão de ATP com adição de TE.....	36
Figura 6 -Perfil de bandas para diferentes subcepas BCG.....	40
Figura 7 -Baciloscopia do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003.....	42
Figura 8 -Baciloscopia de vacina de referência internacional subcepa Moreau-RJ NIBSC 10 /272.	43
Figura 9 -Baciloscopia de vacina de referência internacional subcepa Russian BCG-I NIBSC 10/274.....	44
Figura 10 - Baciloscopia de vacina de referência internacional subcepa Tokyo 172 NIBSC 07/272	45
Figura 11 -Padrão de bandas do lote de vacina referência de trabalho, e dos padrões de referência internacionais Moreau-RJ (NIBSC 10/272), Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272) após PCR multiplex para identidade de subcepas do BCG.....	46
Figura 12 -Gráfico de curva padrão de ATP.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no Ensaio de Identidade para Subcepas da Vacina BCG por PCR Multiplex (POP 65.3210.059), conforme descrito por Bedwell e colaboradores (2001).....38

Tabela 2 - Resultado esperado e obtido para o ensaio de contagem de UFC do lote de vacina referência de trabalho, e dos padrões de referência internacionais Moreau-RJ (NIBSC 10/272) e Russian BCG-I (NIBSC 07/274).....47

Tabela 3 - Resultado esperado e obtido para o ensaio de dosagem de ATP do lote de vacina referência de trabalho, e dos padrões de referência internacionais Moreau-RJ (NIBSC 10/272), Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272).....48

Tabela 4 - Interpretação dos resultados do lote de vacina referência de trabalho e de três padrões de referência internacionais para os ensaios de contagem de UFC, dosagem de ATP, identidade de BAAR e identidade de subcepas do BCG por PCR multiplex.....49

LISTA DE SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
DM	Departamento de Microbiologia
FAP	Fundação Atauilpho de Paiva
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon gama
ILTB	Infecção latente por tuberculose
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INPPAZ	Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis
LJ	Lowestein-Jensen
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunização
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PT	Prova Tuberculínica
TB	Tuberculose
TB MDR	Tuberculose multidroga resistente
TE	Tampão Tris com EDTA
TBE	Tampão Tris Borato com EDTA
TRM-TB	Teste rápido molecular para tuberculose
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UNICEF	United Nations International Children's Emergency Fund
UV	Ultravioleta
μ L	Microlitros
$^{\circ}$ C	Graus celsius

mL

Mililitros

ng

nanogramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	16
1.2 Tuberculose.....	16
1.3 Vacinação.....	22
1.3.1 Controle de qualidade de vacinas BCG.....	23
1.4 Justificativa.....	25
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 Materiais de referência.....	27
3.1.1 Lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003.....	27
3.1.2 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Moreau-RJ (NIBSC 10/272).....	27
3.1.3 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Russian BCG-I (NIBSC 07/274).....	28
3.1.4 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Tokyo 172 (NIBSC 07/272).....	28
3.2 Viabilidade da vacina BCG.....	28
3.2.1 Contagem de unidades viáveis do BCG.....	28
3.2.2 Dosagem de ATP.....	34
3.2.2.1 <i>Reconstituição das ampolas e incubação</i>	35
3.2.2.2 <i>Extração de ATP</i>	35
3.2.2.3 <i>Curva Padrão de ATP</i>	35
3.3 Identidade da vacina.....	37
3.3.1 PCR multiplex.....	38
3.3.1.1 <i>Extração de DNA</i>	39
3.3.1.2 <i>Reação de amplificação</i>	39
3.3.1.3 <i>Eletroforese</i>	39

3.3.2 Coloração de Ziehl-Neelsen.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Coloração de Ziehl-Neelsen Contagem de unidades viáveis.....	42
4.2 Identidade de subcepas do BCG por PCR multiplex.....	45
4.3 Contagem de unidades viáveis.....	46
4.4 Dosagem de ATP.....	47
5 DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis é um organismo procarionte aeróbio, de formato bacilar, imóvel e sem flagelos. Possui parede celular com alto grau hidrofóbico contendo ácidos micólicos e arabinogalactano em sua estrutura que configura uma parede álcool ácido resistente. Essa característica é fundamental para o diagnóstico microscópico de patologias causadas por esta bactéria (MADIGAN, 2021).

Estudos baseados na hipótese da existência da Pangeia há 200 milhões de anos, que culminou na formação dos continentes atuais, denominada deriva continental, sugerem que o gênero *Mycobacterium* surgiu há mais de 150 milhões de anos (HAYMAN, 1984), e a aproximadamente 3 milhões de anos um ancestral de *M. tuberculosis* parece ter infectado um homínido localizado na África Oriental (BARBERIS *et al.*, 2017).

A espécie *M. tuberculosis* foi descoberta em 1882 pelo médico, professor e patologista alemão Robert Koch por meio de sua observação em tecidos biológicos. Para conseguir este achado, Robert Koch utilizou o método analítico descrito pela primeira vez na literatura pelo seu colega, o professor Paul Ehrlich. Alguns pontos importantes no trabalho de Koch foram: a diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. leprae*, a demonstração que o bacilo em questão, era o agente causador dos tubérculos, nódulos formados por lesões teciduais comumente observados em pacientes com tuberculose, e o cultivo desse patógeno com a identificação de características próprias de sua colônia, como por exemplo, o aspecto agregado e gorduroso e o crescimento lento. Desde então o agente etiológico da tuberculose tem sido conhecido como bacilo de Koch (HERON, 1882; HERON, 1883; OMS, 2015; MADIGAN, 2021).

1.2 Tuberculose

A tuberculose é uma doença causada por bactérias do complexo *M. tuberculosis* cujo gênero é *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, subordem Corynebacteriaceae e ordem

Actinomycetales (MAGEE; WARD, 2015). É transmitida pelo ar, por meio de gotículas de saliva de um portador denominado bacilífero, isto é, um indivíduo que ao realizar um exame específico, a baciloscopia de escarro, é positivo para tuberculose. Enquanto este teste for positivo há risco de transmissão da doença, logo, do ponto de vista de controle epidemiológico da doença, o bacilífero, é o principal alvo de combate pois é ele quem alimenta a cadeia de transmissão. Uma vez liberados os aerossóis contaminados, e havendo sua inalação por outra pessoa, o bacilo de Koch encontra as vias respiratórias e conseqüentemente os pulmões são os órgãos mais afetados, mas a infecção pode alcançar outros sítios anatômicos como cérebro e ossos (BRASIL, 2019). Mesmo que o indivíduo esteja infectado com o patógeno, não necessariamente há desenvolvimento de manifestações clínicas e nesse caso há um quadro de infecção subclínica ou latente (PAI *et al.*, 2016; ESMAIL *et al.*, 2014). Na fase aguda da doença sintomas genéricos são observados: febre, cansaço, prostração, falta de apetite, tosse e perda ponderal. No período crônico infeccioso pode surgir hemoptise, que consiste em tosse com sangue (PAI *et al.*, 2016).

A tuberculose não apenas se apresenta na forma pulmonar, como também pode atingir outros sítios anatômicos, e, portanto, sintomas não clássicos são apresentados. Neste último caso configura-se um quadro de tuberculose extrapulmonar. Clinicamente, o indivíduo suspeito para tuberculose pulmonar é aquele com tosse persistente por ao menos 3 semanas, que deve ser submetido a um exame bacteriológico denominado baciloscopia (TB CARE I, 2015).

A tuberculose pulmonar pode ser subdividida em primária, pós primária podendo ser miliar ou não. As duas primeiras diferenciam-se de acordo com a produção de sintomas logo após o contato com o bacilo (primária) ou tempos depois (pós-primária). O subtipo miliar refere-se a um caso grave caracterizado pela disseminação de bacilos de Koch pela corrente sanguínea, que atingem outros órgãos e é mais comum em pacientes imunocomprometidos. De maneira geral, os sintomas apresentados em todos os tipos de tuberculose pulmonar são: emagrecimento repentino, tosse produtiva ou seca com ou sem sangue, sudorese noturna, febre vespertina e diminuição do apetite, este último primordialmente em crianças. A tuberculose extrapulmonar vai evidenciar sinais de acordo com o órgão atingido. Em indivíduos não portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), a tuberculose extrapulmonar mais comum é a pleural, já naqueles portadores do HIV, a mais comum é a ganglionar periférica. Inclusive, nesta última população, a tuberculose é a principal causa de morte (BRASIL, 2019; OMS, 2021).

O método escolhido para o diagnóstico da tuberculose varia de acordo com o quadro clínico do paciente. Os principais métodos utilizados são: exame microscópico direto ou a baciloscopia; teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB); cultura, identificação e teste de sensibilidade a antimicrobianos; diagnóstico por imagem; histopatológico e detecção de Adenosina deaminase (BRASIL, 2019; OMS, 2021).

O exame microscópico direto ou baciloscopia para tuberculose consiste na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) predominantemente por meio da coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) nos mais diversos materiais biológicos, sendo um dos mais comuns, o escarro, quando se suspeita de tuberculose pulmonar. A técnica de ZN está em uso a cerca de 120 anos (GAGNEUX, 2018). Além de método diagnóstico, a baciloscopia pode servir para controle da evolução do tratamento do paciente. O TRM-TB é um exame indicado para suspeita de tuberculose laríngea e/ou pulmonar. Este é um teste de amplificação de ácidos nucleicos, que além de detectar a presença de material genético de bactérias do complexo *M. tuberculosis*, também evidencia se o patógeno presente no material biológico é resistente a um dos principais fármacos utilizados no tratamento da doença, a rifampicina. A cultura é considerada padrão ouro no diagnóstico diferencial da tuberculose pois o meio utilizado, Lowenstein-Jensen (LJ), é altamente específico para este bacilo, sendo assim contaminações e erros diagnósticos são raros, no entanto o crescimento bacteriano neste meio é lento, o que ocasiona a demora na liberação do laudo laboratorial. A identificação tem o objetivo de determinar a espécie do microrganismo, para isso são utilizados meios bioquímicos e/ou técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR). O teste de sensibilidade a antimicrobianos objetiva investigar se a micobactéria é suscetível ou não a um ou mais antibióticos, o que auxilia no direcionamento terapêutico, todavia, de acordo com o método utilizado, o teste leva de 5 a 42 dias para conclusão. A adenosina deaminase é uma enzima intracelular presente no linfócito ativado. É um recurso importante para detecção de tuberculose extrapulmonar principalmente no líquido pleural, quando associado a parâmetros como presença de exsudato e linfocitose, em indivíduos adultos (BRASIL, 2019).

Um outro quadro possível associado a tuberculose consiste numa infecção latente ou subclínica chamada de infecção latente por tuberculose (ILTb), isto é, quando uma pessoa entra em contato com a micobactéria, se infecta, mas a doença não é instalada, sendo assim este sujeito permanece saudável por meses, anos, ou toda a vida, e não é um transmissor para a população

(PAI *et al.*, 2016; ESMAIL *et al.*, 2014; BRASIL, 2019). Nos indivíduos acometidos pela ILTB, os bacilos permanecem encapsulados e localizam-se em focos quiescentes e latentes. Neste caso, ao analisar-se sua imunidade contra a bactéria, há um resultado positivo. O teste preconizado neste caso é a prova tuberculínica (PT), a qual consiste na inoculação de proteínas da micobactéria por via intradérmica, que gera uma reação de hipersensibilidade cutânea que será lida após 48-96 horas. A leitura tem como base a medição milimétrica do diâmetro da área de reação, que é uma forma endurecida, tensa e mais elevada do que a pele hígida. Leituras maiores que 5 mm indicam reação positiva e abaixo de 5 mm, negativa. Um ponto fundamental neste teste é que pessoas que foram imunizadas com vacina bacilo de Calmette & Guérin (BCG) após o primeiro ano de vida e realizam a PT em menos de 10 anos após a vacinação, podem apresentar uma reação positiva, a qual é referente a vacinação e não a uma possível ILTB (BRASIL, 2019).

Os fármacos utilizados contra o bacilo de Koch atuam prejudicando seu metabolismo, sendo assim, sujeitos com ILTB, por possuírem bacilos em latência, não terão eliminação dos focos quiescentes pelo uso de medicamentos. No caso de pacientes com tuberculose ativa, o melhor tratamento vai depender da localização do foco infeccioso, que pode ser um ambiente com alta ou baixa concentração de O₂, e isto está diretamente relacionado com a quantidade de bacilos, que naturalmente podem ou não possuir resistência a um ou mais medicamentos (BRASIL, 2019).

O tratamento de primeira linha para tuberculose no Brasil consiste no uso de um ou mais fármacos associados: isoniazida e rifampicina, pirazinamida e etambutol. Quando a tuberculose não responde ao tratamento com a combinação de pelo menos rifampicina e isoniazida, configura-se um caso de tuberculose causado por bacilos multidroga resistente (TB MDR) (BRASIL, 2011, OMS, 2021). O sucesso terapêutico dependerá do nível de infecção do paciente, do sistema imunológico deste, do tratamento precoce, do uso da combinação de fármacos a fim de evitar seleção de resistência antimicrobiana e da capacidade de eliminação completa dos bacilos a fim de evitar recidivas. Ao longo do tratamento deve-se realizar exames para verificar a evolução ou regressão clínica, logo, em pacientes com tuberculose pulmonar a baciloscopia deve ser realizada e em casos de tuberculose extrapulmonar, exames de imagem devem ser solicitados (BRASIL, 2019).

Em 1927 implementou-se a imunização com a vacina BCG, cujo objetivo é prevenir as formas de tuberculose grave como a miliar e meníngea. A vacina BCG faz parte do calendário do

Programa Nacional de Imunizações (PNI) desde 1977, e deve ser administrada ao nascer no esquema de uma dose. O PNI objetiva alcançar uma cobertura vacinal de 90% das crianças abaixo de um ano de idade (BRASIL, 2014a; BARRETO *et al.*, 2006).

Uma das grandes dificuldades no tratamento da tuberculose está no surgimento de patógenos multirresistentes e pacientes infectados que apresentam comorbidades como HIV, diabetes, e outras doenças imunossupressoras ou ainda aqueles em tratamento para câncer (GAGNEUX, 2018). A multirresistência a drogas pode ser estimulada pela ausência ou erros no diagnóstico da tuberculose, e também pelo abandono do tratamento antes de seu fim (OMS, 2021).

Dados epidemiológicos demonstram que a tuberculose e as mortes decorrentes dela são mais prevalentes em países em desenvolvimento, refletindo que a falta de políticas públicas no combate à doença e na garantia do direito à nutrição e condições mínimas de vida estão diretamente relacionadas a permanência da doença como um problema latente de saúde pública, o que foi agravado ainda mais pela emergência global do novo coronavírus SARS-CoV-2. Com a situação pandêmica de COVID-19, muitos pacientes deixaram de receber acesso ao tratamento para tuberculose, o que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), representou uma queda de cerca de 50% no tratamento. Além disso, nesse período, o acesso a prevenção, diagnóstico e notificação de casos positivos diminuíram, embora o número de óbitos tenha aumentado (OMS, 2021).

No Brasil, um dos 30 países mais acometidos pela tuberculose, desde 2016 há uma tendência de crescimento na incidência anual desta doença, o que vai contra a tendência observada mundialmente de declínio lento (OMS, 2021). Todos esses dados demonstram que o Brasil ainda enfrenta muitos obstáculos a serem contornados a fim de combater a tuberculose em seu território.

Medidas têm sido tomadas a fim de acabar com a epidemia mundial de tuberculose. Durante a Assembleia Mundial de Saúde, em 2014, houve a adoção da estratégia global para fim da tuberculose, que contou com os países aliados da OMS e da ONU, sendo o Brasil um protagonista chave a fim de alcançar este objetivo, tendo em vista que este ocupa altas posições com relação a concentração de indivíduos com tuberculose e de indivíduos coinfectados com tuberculose e HIV. A meta do Brasil é de menos de 10 casos positivos de tuberculose a cada 100 mil habitantes até 2035 e no máximo 230 mortes por ano, e os meios para isto encontram-se além

de questões de saúde, e incluem o campo social e a inovação como instrumentos potenciais de mudança. Dessa forma, a estratégia global para o fim da tuberculose tem como pilares: o cuidado com o paciente, o cenário socioeconômico, a pesquisa e a inovação. Considerando o território brasileiro heterogêneo e de grandes proporções, o trabalho deve ser feito levando-se em consideração o contexto de cada local, pois cada município e região possuem particularidades diferentes (BRASIL, 2017; BRASIL, 2021). Em novembro de 2017 houve uma conferência ministerial internacional para discutir o futuro da epidemia de tuberculose no mundo, que culminou na Declaração de Moscou para o fim da tuberculose. Nesse contexto metas a nível mundial foram estabelecidas como por exemplo a diminuição na taxa de incidência de tuberculose no mundo em 80% até 2030, no entanto boa parte do progresso alcançado até 2019 foi dissipado devido a pandemia de COVID-19 e toda atenção que foi demandada por ela (OMS, 2021).

A tuberculose é considerada emergência de saúde pública há 25 anos, e é umas das doenças infecciosas que mais matam pessoas em países de baixa e média renda em todo o globo, (BARBERIS *et al.*, 2017; GAGNEUX, 2018; FURIN *et al.*, 2019; OMS, 2021). Com a pandemia de COVID-19, alguns retrocessos foram observados como a diminuição do número de novos casos detectados e da maior parte dos exames diagnósticos para tuberculose (BRASIL, 2021; OMS, 2021). Nos últimos 209 anos, mais de 1 bilhão de pessoas morreram por causa desta doença (PAULSON, 2013) e cerca de um quarto da população mundial está infectada com *M. tuberculosis*, sendo 9,9 milhões de pessoas infectadas pelo microrganismo só em 2019 (OMS, 2021). Esses dados são alarmantes, ainda mais quando se considera que a tuberculose é predominante em países pobres e carentes dos mais diversos recursos. De acordo com Comisión Económica para América Latina y el Caribe, comissão ligada a ONU, em 2020, a pobreza e a extrema pobreza alcançaram níveis não vistos nos últimos 12 e 20 anos, respectivamente, o que influencia ainda mais na situação epidêmica da tuberculose (CEPAL, 2021).

1.3 Vacinação

A vacina BCG foi desenvolvida em 1921 pelo médico Albert Calmette e pela veterinária Camille Guérin após contínuas passagens da cepa *Mycobacterium bovis* “Lait Nocard”,

responsável por causar mastite tuberculosa bovina (GRANGE *et al.*, 1983). A cepa original foi distribuída ao redor do mundo para imunização, o que ao longo do tempo culminou no surgimento de subcepas distintas. O grupo das principais subcepas utilizadas na produção vacinal compreende: Danish, Moreau, Russian, Tokyo e Bulgarian (CERNUSCHI *et al.*, 2018). O imunizante chegou ao Brasil em 1927, sendo sua subcepa denominada BCG Moreau - Rio de Janeiro, nome vinculado ao cientista uruguaio Julio Elvio Moreau, pioneiro em trazê-la à América do Sul (BARRETO *et al.*, 2006).

Até 2016, a subcepa utilizada para vacinação contra a tuberculose na população brasileira era a Moreau-RJ produzida pela Fundação Ataulpho de Paiva (FAP), contudo, devido a não conformidades verificadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) na fábrica, esta produção foi suspensa e o PNI atualmente realiza a importação de vacinas BCG do Serum Institute of India, cuja subcepa é a Russian (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b).

A vacina BCG é constituída por bacilos de Calmette e Guérin vivos, atenuados e liofilizados, que são produzidos a partir do sistema de lote-semente e podem ser obtidos até 8 subcultivos a partir da cepa original (FARMACOPEIA, 2019). Quando inoculada, induz resposta imunológica celular por meio da ativação de linfócitos T e diferenciação em Th1 e Th2. Os dois atuam na produção de citocinas, sendo o Th1 fundamental na imunidade contra patógenos intracelulares e produz principalmente Interferon gama (IFN- γ), o qual ativa macrófagos, mantendo-os mais preparados para ação contra possíveis patógenos intracelulares e também estimula a produção de anticorpos IgG por linfócitos B. Outra citocina liberada por meio da resposta Th1 é a Interleucina 2 (IL-2) que recruta mais células T. Já o Th2 produz as interleucinas IL-4 e IL-5, IL-6 e IL-10 (BRICKS, 2004).

Para ser imunizada com a vacina BCG, a criança deve ter no máximo 4 anos, 11 meses e 29 dias de idade e no mínimo 2 Kg de peso. No caso de crianças expostas ao HIV, somente poderão ser imunizadas caso tenham menos que 5 anos, não apresentem sintomas de tuberculose e de imunossupressão (BRASIL, 2019). Essa determinação decorre do fato de que a maior taxa de tuberculose infantil ocorre antes dos 5 anos e que crianças abaixo dos dois anos de idade que desenvolvem a doença tem alta taxa de mortalidade por apresentarem maior propensão a casos graves de TB (OMS, 2018).

A vacinação com BCG gera uma cicatriz clássica permanente. De 21 a 28 dias após a imunização, há a formação de um nódulo, que em torno de uma semana evolui para uma ferida

com pus. Posteriormente a ferida apresenta-se aberta sem pus, com tamanho em torno de 5 mm. Por fim, em até 12 semanas, observa-se a presença de uma ferida com crosta em processo de cicatrização, que corresponderá a cicatriz (BRASIL, 2019).

O PNI foi criado em 18 de setembro de 1973 e desde então alcançou muitos êxitos e reconhecimento mundial, com apoio da *United Nations International Children's Emergency Fund* (UNICEF), do Rotary Internacional e do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), além de participar da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). É papel do PNI definir diretrizes e ações para imunização de toda a população brasileira independente de classe social, sendo assim estabelece o Calendário Nacional de Vacinação que, em parceria com Sistema Único de Saúde (SUS), disponibiliza atualmente 20 vacinas, dentre elas a vacina BCG (BRASIL, 2020).

1.3.1 Controle de qualidade de vacinas BCG

Levando-se em consideração o direito a saúde estabelecido pelo art. 196 da Constituição da República Federativa do Brasil, de 5 de outubro de 1988, e com base na Lei nº 8.080 de 1990, que cria o SUS, cujo um de seus princípios é a integralidade, o Ministério da Saúde estabeleceu a Portaria Conjunta nº 92, de 9 de outubro de 2008, da Secretaria de Vigilância em Saúde, a qual articula a união entre as esferas federais e municipais a fim de tratar da farmacovigilância de vacinas, inclusive da BCG (BRASIL, 1988; BRASIL, 1990; BRASIL, 2008). Dessa maneira, a ANVISA, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e as Secretarias Estaduais de Saúde se unem para regulamentar, controlar e fiscalizar a qualidade das vacinas no território brasileiro. De acordo com o Art. 2º desta Portaria, a farmacovigilância de vacinas e outros imunobiológicos compreende-se como: “o processo de detecção, avaliação, compreensão, prevenção e comunicação de eventos adversos pós-imunização ou qualquer outro problema relacionado com a vacina ou vacinação” (BRASIL, 2008).

Um outro princípio do SUS é a universalização que significa estabelecer o acesso de todos à saúde. Nesse contexto, o PNI é protagonista a fim de tornar o acesso à vacinação universal, um objetivo possível. O PNI estabelece que toda vacina tramitada por meio de seu sistema deve passar por uma rigorosa análise de qualidade. Nesta circunstância, o INCQS/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) é essencial, pois é o órgão responsável por verificar a qualidade das vacinas

disponibilizadas pelo PNI, inclusive a vacina BCG, e conseqüentemente liberá-las ou não para uso pela população brasileira (BRASIL, 1990; BRASIL, 2003).

O controle da qualidade de lotes de vacinas BCG é realizado nos Setor de Vacinas localizado no Departamento de Microbiologia (DM) do INCQS/Fiocruz. O INCQS tem um Sistema de Gestão da Qualidade implementado de acordo com a normas ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, a qual define requisitos gerais para atuação em laboratórios de ensaio, calibração e amostragem, objetivando garantir a competência do laboratório e a validade de seus resultados (ABNT, 2017).

No Setor de Vacinas são realizadas análises laboratoriais e documentais para avaliação da segurança e eficácia dos lotes de vacina BCG. A metodologia realizada para os ensaios é definida na Farmacopeia Brasileira e em documentos normativos da OMS. No controle de qualidade é preconizado que sejam realizados ensaios de esterilidade, identidade, viabilidade e termoestabilidade, além de análise de rotulagem, embalagem e armazenamento. Um dos ensaios alternativos ao método de cultivo para análise da viabilidade da vacina BCG estabelecido na Farmacopeia Brasileira e internacionais e normas da OMS consiste na avaliação do metabolismo por meio da dosagem de trifosfato de adenosina (ATP) (FARMACOPEIA, 2019), no entanto, este método ainda não foi implementado no INCQS/Fiocruz.

Um dos instrumentos críticos para o cumprimento das diretrizes de qualidade contidos na RDC 512/2021 que dispõe sobre as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade (BRASIL, 2021c) e na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 (ABNT, 2017) é o uso de materiais de referência nacionais ou internacionais durante a execução dos ensaios laboratoriais de controle. No caso de um laboratório de controle de qualidade em vacinas, há o uso de vacinas de referência internacionais ou de lote de vacina de referência de trabalho previamente avaliado frente a uma vacina de referência internacional. Atualmente, o Setor de Vacinas faz uso do lote de referência de trabalho BRA/BCG/003, cuja subcepa é a Moreau-RJ. Este lote foi produzido pela FAP em 1996, e vem sendo utilizado como referência de trabalho no INCQS desde 1998. Foi estabelecido para este fim após passar por ensaios de esterilidade, vácuo, homogeneidade, hipersensibilidade tuberculínica, identidade de BAAR, viabilidade e termoestabilidade, com resultados satisfatórios frente ao lote da vacina de referência de trabalho anterior (BRA/BCG/002) (TONUS, 2008).

1.4 Justificativa

Considerando o estabelecimento dos reagentes de referência da OMS de vacina BCG para subcepas Moreau-RJ, Russian BCG-I e Tokyo 172, as quais são as subcepas predominantemente utilizadas na produção e distribuição de vacina BCG em todo o mundo (DAGG *et al.*, 2014; OMS, 2013b; OMS, 2013c; OMS, 2013d), somado ao fato de que a vacina atualmente distribuída no PNI é preparada com a subcepa Russian BCG-I e existe um produtor nacional cuja subcepa é Moreau-RJ, faz-se necessário analisar padrões de referência internacionais da Organização Mundial da Saúde frente aos procedimentos comumente utilizados no setor, a fim de que dados sejam obtidos e arquivados. Ademais, é importante adquirir essas informações primárias para caso futuramente o controle de qualidade da vacina BCG no INCQS venha a ocorrer frente ao padrão internacional de sua subcepa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o comportamento dos padrões internacionais 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Moreau-RJ (NIBSC 10/272), 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Tokyo-172 (NIBSC 07/272) frente aos procedimentos utilizados nos ensaios de identidade e viabilidade de vacina BCG realizados pelo Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS.

2.2 Objetivos específicos

a) realizar a análise de identidade de BCG dos padrões de referência internacionais NIBSC 10/272, NIBSC 07/274 e NIBSC 07/272, e do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003;

b) estimar o número de unidades viáveis de BCG dos padrões de referência internacionais NIBSC 10/272 e NIBSC 07/274, e do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003;

c) estimar a quantidade de ATP dos padrões de referência internacionais NIBSC 10/272, NIBSC 07/274 e NIBSC 07/272, e do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003;

d) avaliar os resultados obtidos pelo Setor para os padrões de referência internacionais NIBSC 10/272, NIBSC 07/274 e NIBSC 07/272 frente aos dados do certificado de análise emitido pelo produtor.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais de referência

Os materiais de referência BRA/BCG/003, NIBSC 10/272, NIBSC 07/274 e NIBSC 07/272 foram utilizados para avaliar as metodologias: dosagem de ATP, PCR Multiplex para determinação da subcepa vacinal e identidade de BAAR por coloração de Ziehl-Neelsen. Para o método de determinação de unidades viáveis do BCG, o material de referência NIBSC 07/272 não foi utilizado devido ao número insuficiente de ampolas.

3.1.1 Lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003

O Setor de Vacinas faz uso do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003, cuja subcepa é a Moreau-RJ. Este lote foi produzido pela FAP em 1996 e vem sendo utilizado como referência de trabalho no INCQS desde 1998. Todo o processo de caracterização foi feito pela FAP em parceria com o INCQS e o Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) (DUARTE, 2011). Conforme o protocolo de produção emitido pelo fabricante, a contagem de unidades viáveis de BCG do lote BRA/BCG/003 em meio Lowenstein-Jensen foi de $9,98 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC)/ml, com desvio padrão de $2,0 \times 10^6$ UFC/mL (TONUS, 2008).

3.1.2 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Moreau-RJ

A fim de definir o reagente de referência internacional, uma vacina candidata foi distribuída a 16 laboratórios de 13 países distintos, dentre estes, sete fabricantes de vacinas e nove laboratórios de controle de qualidade (DAGG *et al.*, 2012). Em 2012, um lote foi eleito pela OMS como material de referência, denominado NIBSC 10/272, para validar e monitorar a qualidade de vacinas com identidade genética semelhante. Este em questão, foi um lote de vacina BCG para subcepa Moreau-RJ produzido em 1998 pela FAP. A concentração de cada ampola do material é estimada em $6,51 \times 10^6 \pm 0,7$ UFC/ampola e $24,69 \pm 7,4$ ng de

ATP/ampola. Chegou-se a estes resultados por meio da média das médias obtidas em cada um dos laboratórios participantes do estudo (OMS, 2013a).

3.1.3 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Russian BCG-I

O reagente de referência da OMS de vacina BCG para subcepa Russian BCG-I foi chamado de NIBSC 07/274 é um reagente de referência que foi preparado em 2006 pelo Bul Bio-National Centre of Infectious and Parasitic Diseases Limited (BB-NCIPD Ltd.) localizado na Bulgária. Somente em 2009, este lote de vacina BCG foi estabelecido como referência internacional. Tem como finalidade servir como comparativo ideal para controle de qualidade e desenvolvimento tecnológico de vacinas BCG preparadas com a subcepa Russian BCG-I. Possui $3,4 \times 10^6 \pm 0,5$ UFC/ampola e $7.5 \pm 1,5$ ng de ATP/ampola (OMS, 2013b).

3.1.4 1º Reagente de Referência da OMS de vacina BCG subcepa Tokyo-172

O Japan BCG Laboratory localizado em Tóquio, no Japão produziu em 2006 a vacina de referência preparada com subcepa Tokyo 172. Esta foi estabelecida pela OMS em 2009 como reagente de referência internacional, sob número NIBSC 07/272. De acordo com os materiais de referência 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).

3.2 Viabilidade da vacina BCG

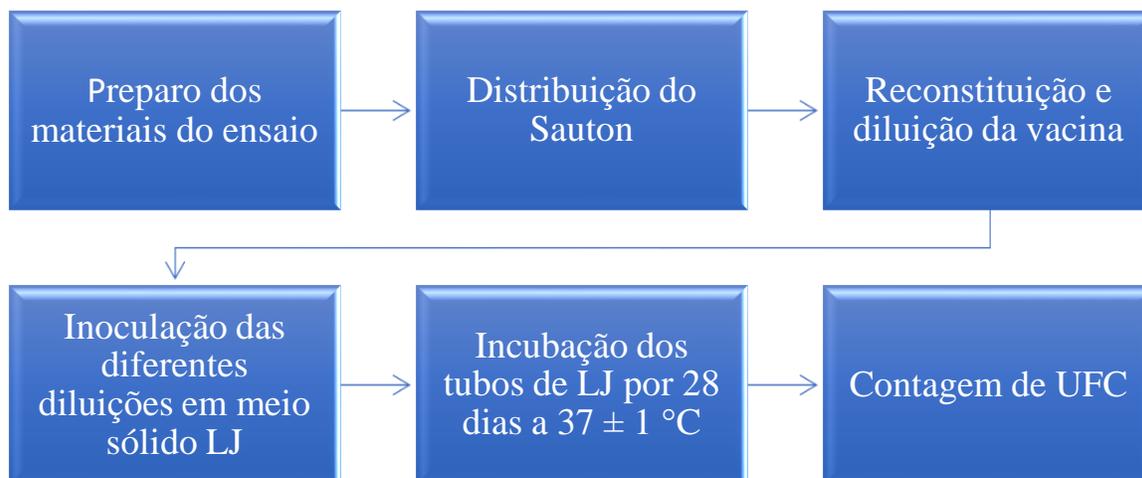
O ensaio de viabilidade objetiva a determinação do número de UFC ou unidades viáveis em amostra de vacina, dessa maneira, é possível inferir a capacidade da vacina de gerar ou não uma resposta imunológica desejada no indivíduo. Esta pode ser realizada por meio do método de contagem de UFC em meio de cultura apropriado, como o meio Lowenstein-Jensen, procedimento mais consolidado em todo o mundo, ou ainda pela dosagem de ATP, método ainda em processo de implementação no INCQS, mas já definido em Farmacopeias Brasileira e internacionais (FARMACOPEIA, 2019; HO *et al.*, 2008; NAFCHI *et al.*, 2019).

3.2.1 Contagem de unidades viáveis do BCG

O procedimento foi realizado de acordo com o POP INCQS 65.3210.013 (Ensaio de Contagem de Unidades Viáveis de BCG e Termoestabilidade da Vacina BCG). A contagem de unidades viáveis em meio sólido é o método oficial recomendado pela Farmacopeia Brasileira e pela OMS (FARMACOPEIA, 2019; OMS, 1977; OMS, 2013).

O procedimento pode ser dividido em 6 etapas: preparo do ensaio, distribuição do Sauton reconstituição e diluição da vacina, inoculação das diluições em meio Lowenstein-Jensen, incubação dos tubos de Lowenstein-Jensen e contagem de UFC, conforme a **Figura 1**. Um ponto crucial do processo é realizar as análises de vacinas sempre em paralelo a uma vacina de referência. A partir dos resultados da vacina de referência, pode-se validar ou não o ensaio, além de, ao longo do tempo, avaliar as tendências dos resultados obtidos pelo laboratório em gráfico de controle elaborado no software SPC-PC IV Explorer versão 5.79 (Quality America Inc, Tucson, Estados Unidos) conforme estabelecido no POP INCQS 65.3400.002 (Gráficos de Controle para Medidas Individuais e Amplitudes Móveis em Ensaios Biológicos), a fim de garantir a validade dos resultados.

Figura 1 - Fluxograma geral do Ensaio de Contagem de Unidades Viáveis de BCG e Termoestabilidade da Vacina BCG



LJ: Lowenstein-Jensen; UFC: Unidades Formadoras de colônias

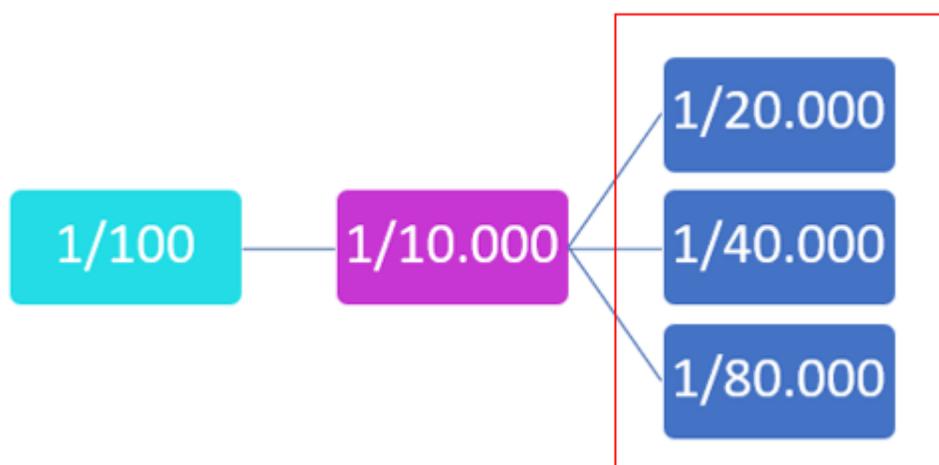
Fonte: A autora, 2022

O preparo do ensaio iniciou-se com a separação de todos os equipamentos, instrumentos e reagentes a serem utilizados. As ampolas de vacina BCG subcepa Russa BCG-I, subcepa Moreau-RJ e o lote de vacina de referência de trabalho BRA/BCG/003 foram mantidas a aproximadamente -20°C até o momento do uso.

Distribuiu-se o meio Sauton 1:4 em erlenmeyers estéreis e separou-se o diluente proveniente do Serum Institute of India, constituído por solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. A fim de determinar a esterilidade do meio Sauton 1:4 foram utilizados meio fluido tioglicolato e caldo caseína soja.

De acordo com a concentração prevista na bula de cada uma das vacinas, foi definido um esquema de diluição. Quanto mais concentrada, mais diluída a vacina deveria ser a fim de obter-se aproximadamente 40 UFC por tubo como número ótima de colônias, sendo desprezadas contagens superiores a 100 UFC. Para a vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 e o reagente de referência Moreau-RJ NIBSC 10/272 foi selecionado o esquema de diluição número 4 ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2 – Esquema de diluição 4 utilizado para o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 e para a subcepa Moreau-RJ NIBSC 10/272.

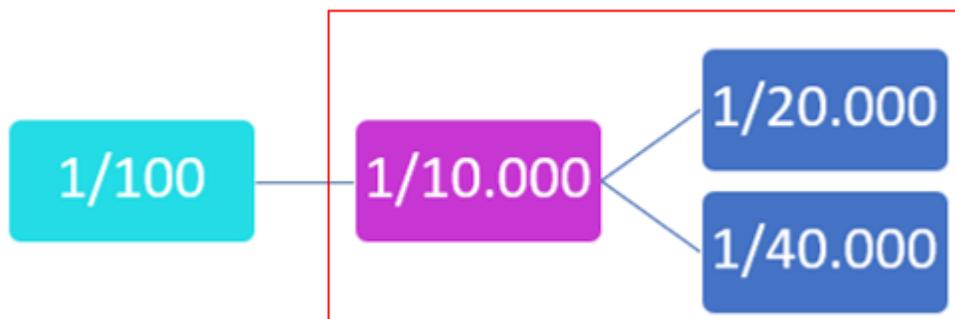


Fonte: A autora, 2022.

A figura 2 representa uma diluição seriada. As diluições destacadas pelo retângulo vermelho foram aquelas utilizadas para a inoculação em meio de cultura sólido. Portanto, no esquema de diluição número 4, as diluições 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000 preparadas em meio Sauton, foram utilizadas para inoculação em meio sólido Lowenstein-Jensen.

Para o reagente de referência Russian BCG-I (NIBSC 07/274) foi utilizado o esquema de diluição número 3 ilustrado na **Figura 3**.

Figura 3 – Esquema de diluição 3 utilizado para a subcepa Russian BCG-I NIBSC 07/274.



Fonte: A autora, 2022.

A figura 3 representa uma diluição seriada. As diluições destacadas pelo retângulo vermelho foram aquelas utilizadas para a inoculação em meio de cultura sólido. Portanto, no esquema de diluição número 3, as diluições 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000 preparadas em meio Sauton, foram utilizadas para inoculação em meio sólido Lowenstein-Jensen.

Para reconstituição da vacina liofilizada, utilizou-se 1 ml de diluente para os reagentes de referência NIBSC 10/272 (subcepa Moreau-RJ) e NIBSC 07/274 (subcepa Russian BCG-I). Cada uma destas suspensões foi transferida para um béquer de 10 ml. Para o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 o volume utilizado foi de 5 ml e este foi acomodado em erlenmeyer de 25 ml. Essa primeira suspensão corresponde à solução 1/1 e a partir dela foram preparadas diluições em erlenmeyers que foram homogeneizadas em mesa agitadora por cerca de 1 minuto antes de cada transferência para o erlenmeyer subsequente, conforme os **Quadros 1 e 2**.

Quadro 1 – Exemplificação das diluições e seu conteúdo no esquema de diluição 4 utilizado para o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 e para o reagente de referência NIBSC 10/272 (subcepa Moreau-RJ).

Diluição	Conteúdo
1/1	Vacina + diluente
1/100	1 ml (solução 1/1) + 99 ml Sauton
1/10.000	1 ml (solução 1/100) +99 ml Sauton
1/20.000	4 ml (solução 1/10.000) + 4 ml Sauton
1/40.000	2 ml (solução 1/10.000) + 6 ml Sauton
1/80.000	2 ml (solução 1/10.000) + 14 ml Sauton

Fonte: A autora, 2022.

O quadro 1 representa as diluições no esquema de diluição 4 e o conteúdo de cada uma das diluições. O destaque em vermelho demonstra as diluições utilizadas para a inoculação em meio de cultura sólido, como também representado na figura 2.

Quadro 2 – Exemplificação das diluições e seu conteúdo no esquema de diluição 3 utilizado para o reagente de referência NIBSC 07/274 (subcepa Russian BCG-I).

Diluição	Conteúdo
1/1	Vacina + diluente
1/100	1 ml (solução 1/1) + 99 ml Sauton
1/10.000	1 ml (solução 1/100) +99 ml Sauton
1/20.000	4 ml (solução 1/10.000) + 4 ml Sauton
1/40.000	2 ml (solução 1/10.000) + 6 ml Sauton

Fonte: A autora, 2022.

O quadro 2 representa as diluições no esquema de diluição 3 e o conteúdo de cada uma das diluições. O destaque em vermelho demonstra as diluições utilizadas para a inoculação em meio de cultura sólido, como também representado na figura 3.

A partir das diluições em meio Sauton, foram realizadas as inoculações em meio LJ. Foram utilizados 20 tubos de LJ (Difco, Sparks, EUA– Anexo A) selecionados aleatoriamente, sendo para o esquema de diluição 3, sendo 5 tubos inoculados com a diluição 1:10.000, 5 com a diluição 1:20.000 e 10 com a diluição 1:40.0000 (Quadro 2). Já para o esquema de diluição 4, 5 tubos com a diluição 1:20.000, 5 com a diluição 1:40.000 e 10 tubos com a diluição 1:80.000 (Quadro 1), os quais estão destacados em vermelho nos Quadros 1 e 2, e nas Figuras 2 e 3. A codificação de cada um dos tubos ocorreu conforme a sequência numérica descrita no POP INCQS 65.3210.013. A inoculação foi feita com 100 µL de cada conteúdo correspondente, sendo distribuída cuidadosamente por todo o meio de cultura. Cada um dos tubos foi disposto na horizontal, à temperatura ambiente e sem exposição à luz por cerca de 24 horas. Após esse período, cada um dos tubos foi vedado por rolha embebida previamente em parafina. Finalizada esta etapa, os tubos foram incubados por cerca de 28 dias, protegidos da luz, em estufa a 37 ± 1 °C não qualificada monitorada com termômetro calibrado, até o momento da contagem de colônias.

Por fim, a contagem de colônias foi feita com auxílio de lupa com luz direcionada e cada um dos resultados dos tubos foi registrado em formulário específico do POP INCQS 65.3210.013, e posteriormente, decodificados em uma planilha de cálculo desenvolvida internamente e denominada Pasta de Cálculo UFCBCGVIABV00 (PU.3210.138). Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio da análise do qui-quadrado de cada nível de diluição, análise do qui-quadrado combinado, verificação das diferenças entre os níveis de diluição por meio do teste t, média do número de colônias em cada nível de diluição e acumulado e cálculo de incerteza. Além disso, um critério fundamental utilizado para validade do ensaio foi que o resultado do lote de vacina referência de trabalho deveria estar dentro dos limites estabelecidos em gráfico de controle elaborado no software SPC-PC IV Explorer versão 5.79. Para o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 os limites do gráfico de controle foram $9,069 \times 10^6 \pm 7,158 \times 10^6$ UFC/mL.

A composição dos meios Sauton 1:4, 7H9, Tris- EDTA e LJ encontram-se no Anexo A e foram formulados pelo Setor de Meios de Cultura do Departamento de Microbiologia do INCQS.

3.2.2 Dosagem de ATP

A dosagem de ATP em vacina BCG é um método alternativo, que objetiva quantificar a presença de metabolismo celular nos bacilos contidos na preparação, sendo assim é possível inferir a quantidade de células viáveis correlacionando com a concentração de ATP. Para isto é utilizada técnica de bioluminescência na presença de luciferina, a qual consiste em uma classe de pigmentos que são capazes de produzir energia luminosa ao sofrer a ação da enzima luciferase (LUNDIN, 2000). A fim de determinar a concentração de ATP, é necessário produzir uma curva padrão de ATP para correlacionar um valor de absorbância com a concentração de ATP.

O protocolo utilizado foi o descrito no Estudo Colaborativo Internacional para Avaliar e Estabelecer o 1º Reagente de Referência da vacina BCG subcepa Moreau-RJ promovido pela OMS (DAGG *et al.*, 2012). O Kit utilizado no presente estudo foi diferente daquele descrito por Dagg e colaboradores (2012).

3.2.2.1 Reconstituição das ampolas e incubação

A reconstituição das ampolas de vacina foi feita com meio Middlebrook 7H9 enriquecido (Difco, Sparks, EUA) pré-aquecido a 37 ± 1 °C em banho d'água por 30 minutos. Posteriormente, o líófilo hidratado foi transferido para Erlenmeyer estéril e incubado por 22 – 26 horas em estufa a 37 ± 1 °C. O volume de meio Middlebrook 7H9 enriquecido utilizado para hidratação dos líófilos dos reagentes de referência NIBSC 10/272 (Moreau-RJ), NIBSC 07/274 (Russian BCG-I), NIBSC 07/272 (Tokyo 172) e do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 foi de 1 ml, 1 ml, 2 ml e 5 ml, respectivamente.

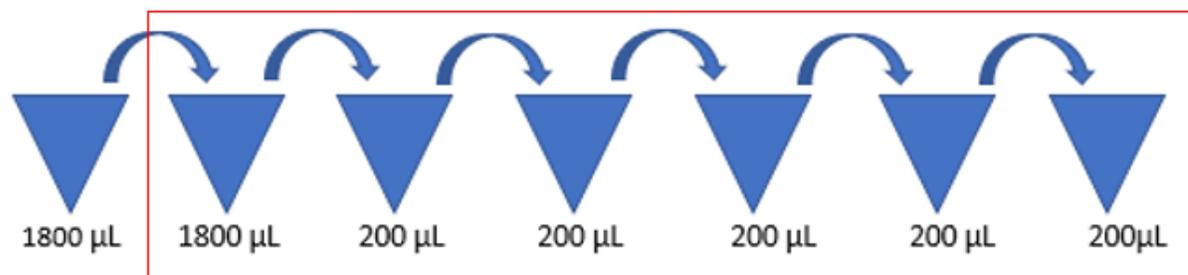
3.2.2.2 Extração de ATP

Para a extração de ATP das amostras reconstituídas, aqueceu-se em placa aquecedora (Loccus, Cotia, Brasil) a 96 – 98 °C, criotubos de 2 ml estéreis contendo 500 µL de tampão Tris (0,1 M) com 2 mM de EDTA (TE), por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de cada vacina ou material de referência reconstituído a cada um dos criotubos contendo TE, aquecendo-os por mais 6 minutos a 96 – 98 °C. Posteriormente os criotubos foram resfriados a temperatura ambiente (20 ± 5 °C) por 30 minutos.

3.2.2.3 Curva Padrão de ATP

A diluição do reagente padrão de ATP (1×10^{-5} M), proveniente do *Molecular Probes® ATP Determination Kit* número de catálogo A22066 (Invitrogen detection Technologies, Eugene, EUA), foi feita para preparo da curva padrão de ATP de maneira concomitante às vacinas de referência em análise. A curva consistiu em uma diluição seriada nas concentrações de 10 a 0,3125 pmol/100 μ L. Iniciou-se com uma “solução matriz” composta de 450 μ L de água purificada estéril e 50 μ L de ATP a 1/50. A partir dessa solução matriz foram adicionados 200 μ L dela em um tubo contendo 1800 μ L de água destilada. Como em uma diluição seriada, um volume foi retirado do tubo anterior e adicionado no posterior, conforme o esquema demonstrado na **Figura 4**.

Figura 4 – Esquema de diluição seriada para preparo da curva padrão de ATP

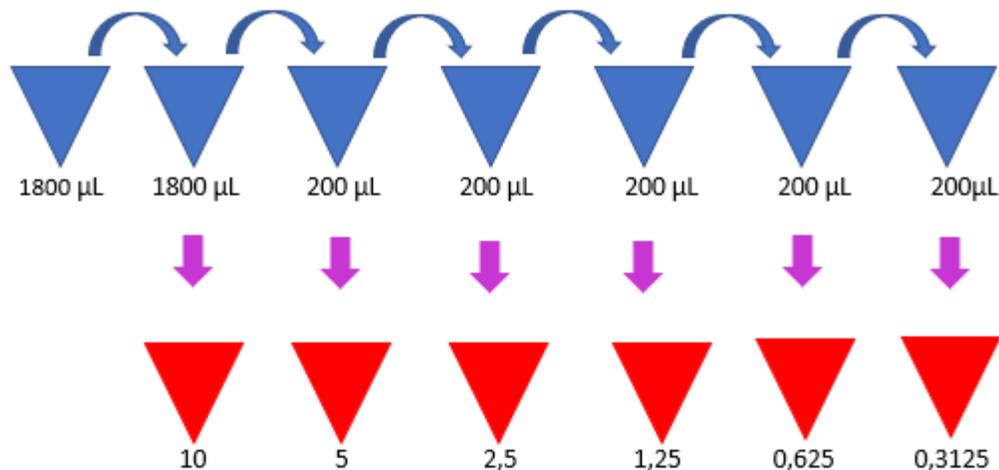


Fonte: A autora, 2022.

Cada uma das setas representa a retirada de 200 μ L do tubo anterior e adição no posterior imediato. O volume de água de cada tubo, representado pelo triângulo, está escrito abaixo do mesmo.

Foram retirados 100 μ L de cada um dos tubos (do segundo ao último tubo da diluição seriada, o qual está destacado em vermelho na figura 4 e transferidos para outros tubos contendo 500 μ L de TE previamente aquecidos a 96 – 98 °C em placa aquecedora (Loccus, Cotia, Brasil) por 15 minutos, conforme a **Figura 5**.

Figura 5 – Esquema de diluição seriada para preparo da curva padrão de ATP com adição de TE



Fonte: A autora, 2022.

Do segundo ao último tubo “azul” foram retirados 100 µL de cada e transferidos (seta roxa) para outro tubo contendo 500 µL de TE previamente aquecido (“tubo vermelho”). Abaixo de cada tubo “vermelho” consta sua respectiva concentração de ATP em pmol/100 µL: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125.

3.2.3.4 Quantificação de ATP

Para quantificação do ATP foram transferidos 50 µL de cada extrato de ATP, em triplicata, e das diluições da curva ATP padrão (10, 5, 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 pmol/100 µL), em duplicata, para uma placa de leitura de 96 poços branca, opaca e com fundo chato (OptiPlate-96, Waltham, EUA). Sequencialmente, foi adicionado a cada um dos poços, 50 µL (proporção final 1:1) de solução para detecção de ATP do kit *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay* (Promega, Madison, EUA). Para a leitura, a placa foi colocada em luminômetro CentroPRO LB 962 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha), 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 a cada poço (FRANÇA, 2022).

3.3 Identidade de vacina

A identidade da vacina BCG foi avaliada tanto por Coloração de Ziehl-Neelsen quanto por PCR multiplex para pesquisa de diferentes subcepas do BCG.

3.3.1 PCR multiplex

A PCR multiplex foi utilizada para identificar e diferenciar as subcepas vacinais. Com esta técnica foi possível amplificar regiões de diferentes genes ao mesmo tempo. Para isso utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores já descritos na literatura (BEDWELL *et al.*, 2001), e descritos na **Tabela 1**. O ensaio foi realizado conforme o POP INCQS 65.3210.059 (Ensaio de Identidade para Subcepa da Vacina BCG por PCR Multiplex).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no Ensaio de Identidade para Subcepas da Vacina BCG por PCR Multiplex (POP 65.3210.059), conforme descrito por Bedwell e colaboradores (2001).

Gene alvo	Nome do iniciador	Sequência oligonucleotídica (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)
RD1	ET1	AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC	196
	ET2	CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG	
	ET3	GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG	
RD2	RD2f	CCAGATTCAAATGTCCGACC	315
	RD2r	GTGTCATAGGTGATTGGCTT	
RD8	RD8f	ACTCCTAGCTTTGCTGTGCGCT	472
	RD8r	GTA CTGCGGGATTTGCAGGTTC	
RD 14	RD14f	CAGGGTTGAAGGAATGCGTGTC	252
	RD14r	CTGGTACACCTGGGGAATCTGG	
RD 16	RD16f	ATCGTTCACGGACAGCCGTAGT	379/401 ^a
	RD16r	CTCGATCCAAGGTCAACCACG	
<i>senX3-regX3</i>	C3	GCGCGAGAGCCCGAACTGC	199/276/353 ^a
	C5	GCGCAGCAGAAACGTCAGC	

pb: pares de base; RD: region of difference.

^a O tamanho do produto varia de acordo com a subcepa.

Fonte: Adaptado de Bedwell e colaboradores (2001).

3.3.1.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita pelo método de lise térmica. Os liófilos das vacinas de referência internacional foram reconstituídos com 1 ml de meio Middlebrook 7H9 enriquecido (Difco, Sparks, EUA) e a vacina de referência de trabalho BRA/BCG/003 com 5 ml do mesmo meio. Transferiu-se 500 µL das vacinas reconstituídas para tubos de ensaio estéreis de 13 x 100 mm com tampa frouxa, que foram fervidos por 35 minutos. Em seguida, transferiu-se os conteúdos para microtubos de 2 ml colocados em estante gelada mantendo-os a aproximadamente -20 °C por 30 minutos. Posteriormente, centrifugou-se os criotubos por 10 minutos a 13.000 g a 4 °C. Após a centrifugação, o volume do sobrenadante foi medido e transferido para outro microtubo, adicionando-se 0,6 vezes do volume medido de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA). Depois, os microtubos foram armazenados a cerca de -20°C por aproximadamente 24 horas. A partir disto, fez-se novamente uma centrifugação por cerca de 12 minutos a 13.000 g a 5 °C. Removeu-se o sobrenadante, mantendo o microtubo com o sedimento em termobloco a 56 °C por 10 minutos com a tampa do microtubo aberta para secagem rápida. Guardou-se o conteúdo no mesmo recipiente da etapa anterior em freezer a -20 °C até o momento do uso, quando este conteúdo foi reidratado com 100 µL de água purificada estéril.

3.3.1.2 Reação de amplificação

A mistura de amplificação foi realizada em reação de PCR com volume final de 45 µL, contendo água purificada (PROMEGA, Wisconsin, EUA), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (ABM, Richmond, Canada), os demais componentes da marca Invitrogen (Massachusetts, EUA) nas seguintes concentrações: tampão de Reação (1X), 200 µM dNTPs, 1,5 µM MgCl₂, 0,2 µM ET1, 0,4 µM ET2, 0,2 µM ET3, 0,4 µM RD2l, 0,4 µM RD2r, 0,4 µM RD81, 0,4 µM RD8r, 0,4 µM RD141, 0,4 µM RD14r, 0,4 µM RD161, 0,4 µM RD16r, 0,4 µM C3 e 0,4 µM C5, e 5 µL de extrato de DNA da amostra a ser analisada.

Para o controle da reação (branco) adicionou-se 5 µL de água estéril ao invés de extrato de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Ampliterm (). As condições de

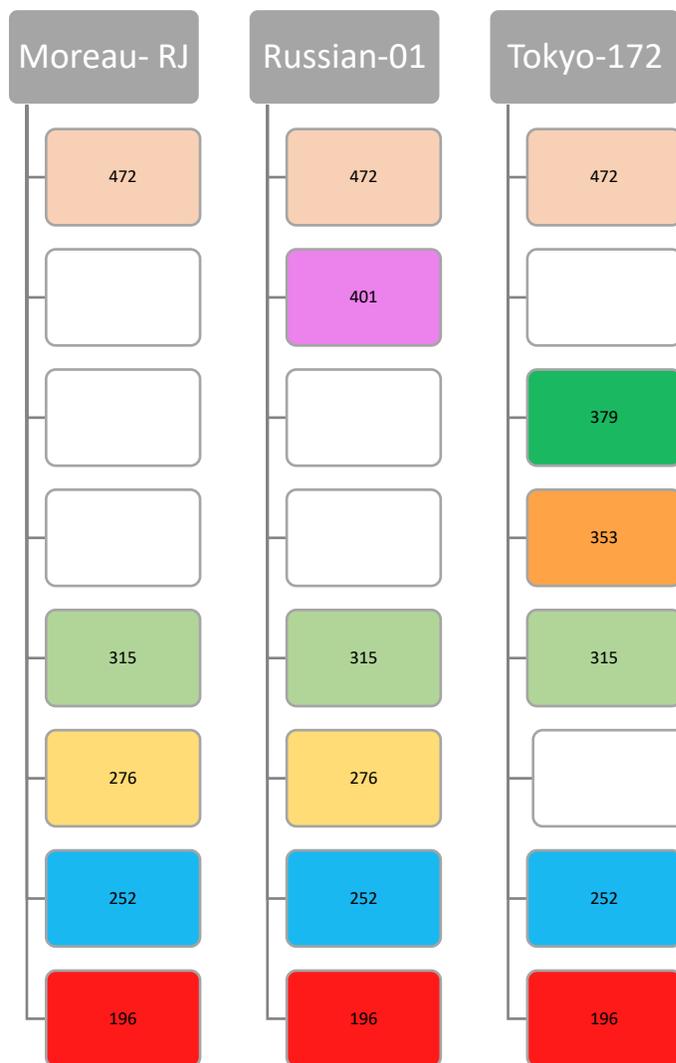
amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 94 °C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

3.3.1.3 Eletroforese

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 3% (SIGMA, Missouri, EUA) e tampão TBE (tris borato ETDA) 1X (USB, Cleveland, EUA). Misturou-se 15 µL do produto da PCR com 5 µL de loading buffer (Norgen, Thorold, Canada) e adicionou-se em cada poço do gel de agarose. Posteriormente, colocou-se em um dos poços 8 µL de marcador de tamanho de DNA “100 pb DNA ladder” (Norgen Biotek Corp, Canada). A corrida eletroforética foi realizada a 85 V – 95 V, até que as bandas migrassem ao menos dois terços da extensão do gel. Corou-se o gel com brometo de etídio 10 mg/ml (Merck, Darmstadt, Alemanha) e visualizou-se as bandas do gel de agarose sob luz ultravioleta (UV) em transluminador com registro da imagem.

O perfil de bandas esperado para cada uma das três subcepas vacinais (Moreau-RJ, Russia BCG-I e Tokyo 172) é descrito na **Figura 6**.

Figura 6 - Perfil de bandas para diferentes subcepas BCG.



Fonte: A autora, 2022.

A figura 6 demonstra a distribuição de bandas em cada uma das subcepas vacinais. Cada tamanho de pares de base é representado por uma cor, logo é possível visualizar melhor quais genes alvo repetem entre as três subcepas. Os blocos em branco representam a ausência do respectivo tamanho.

3.3.2 Coloração de Ziehl-Neelsen

Todo procedimento foi feito conforme o POP 65.3210.018 (Ensaio de Identidade de BAAR para Vacina BCG). Reconstituiu-se as ampolas de vacinas de referência com diluente

contendo solução de cloreto de sódio a 0,9 % e transferiu-se aproximadamente 0,2 mL de cada uma das vacinas reconstituídas para diferentes lâminas previamente desengorduradas e limpas. Esperou-se secar por cerca de 24 horas.

Após este período fixou-se o esfregaço em bico de Bunsen por meio de quatro passagens lentas no fogo. Em seguida, corou-se com fucsina fenicada, isto é, corante fucsina adicionado a ácido fénico. Primeiramente, adicionou-se o corante sobre toda a extensão da lâmina e passou-se o bico de Bunsen por baixo da lâmina até que fosse observado emissão de vapores. Em seguida, as lâminas foram lavadas abundantemente com água corrente e adicionou-se a solução álcool-ácido, para descoloração das estruturas não resistentes. Posteriormente lavou-se com água corrente e adicionou-se solução de azul de metileno por 30 segundos. As lâminas foram secas e o esfregaço foi visualizado em microscópio óptico (Olympus, Tokyo, Japão) sob objetiva de imersão. O BCG, assim como outras micobactérias, é um BAAR, devendo se apresentar em formato de bacilo corado em vermelho pela fucsina contra um fundo azul claro, às vezes imperceptível.

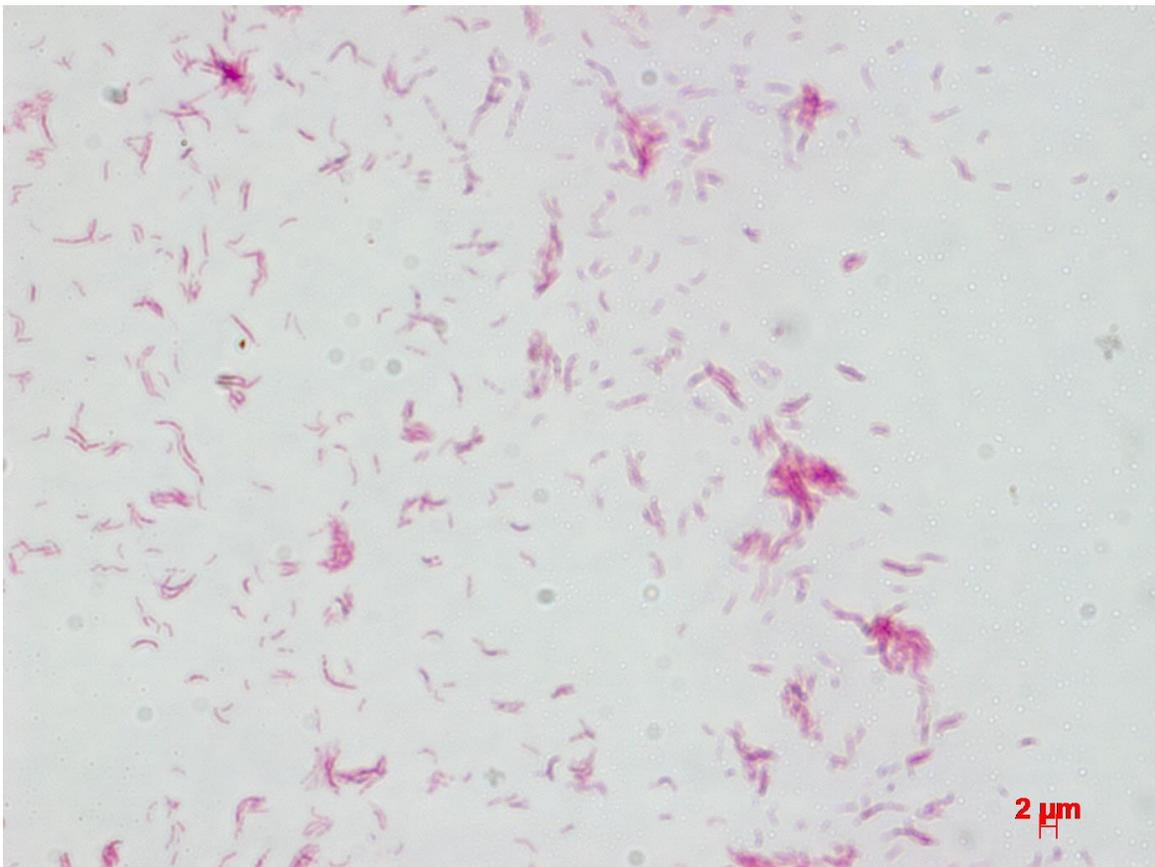
Todos os corantes foram produzidos no Setor de Meios de Cultura do Departamento de Microbiologia e suas respectivas composições encontram-se no anexo A.

4. RESULTADOS

4.1 Coloração de Ziehl Neelsen

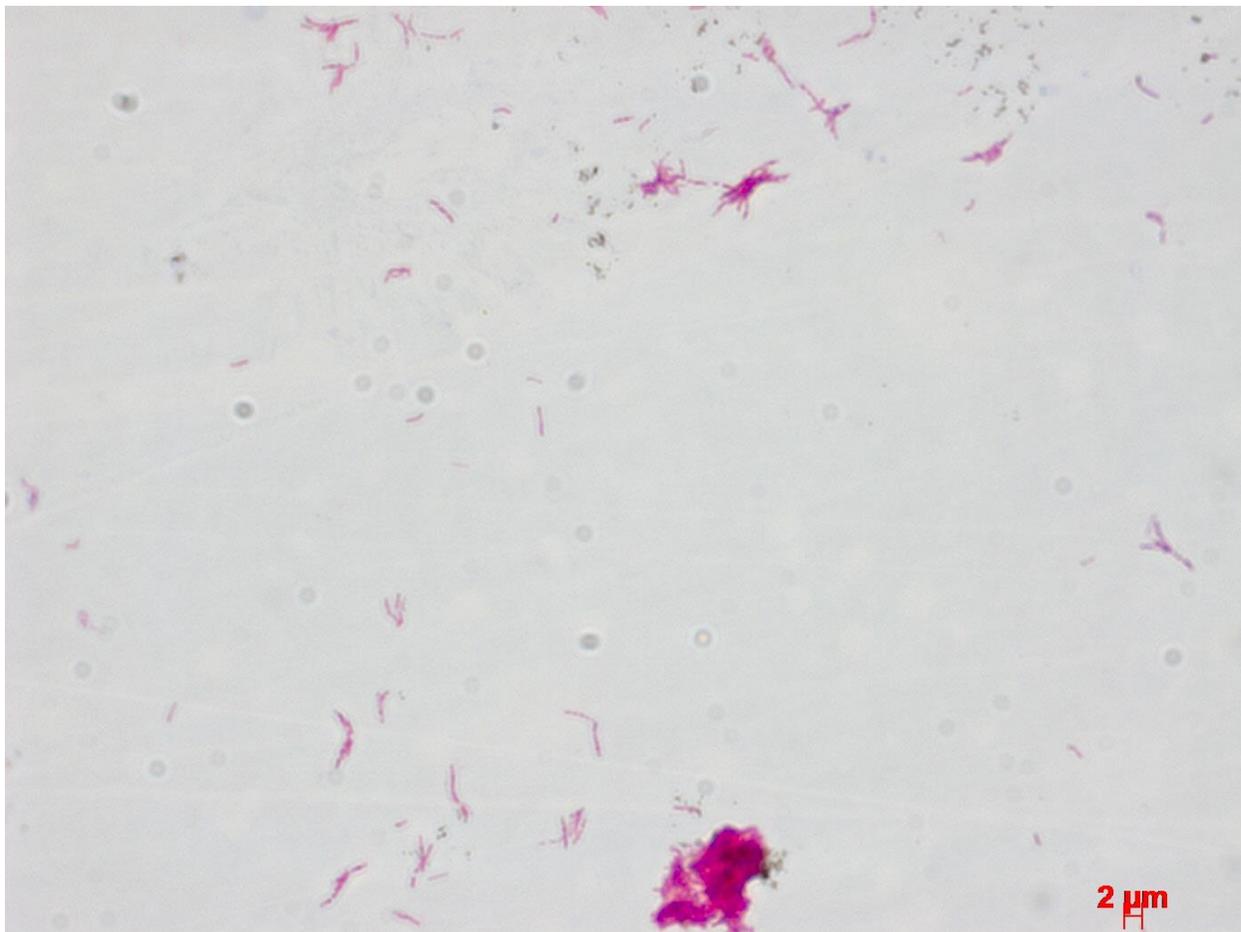
Para os quatro materiais de referência em análise foi observada a presença exclusiva de BAAR conforme demonstrado nas **Figuras 7, 8, 9 e 10**.

Figura 7 - Baciloscopia do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003



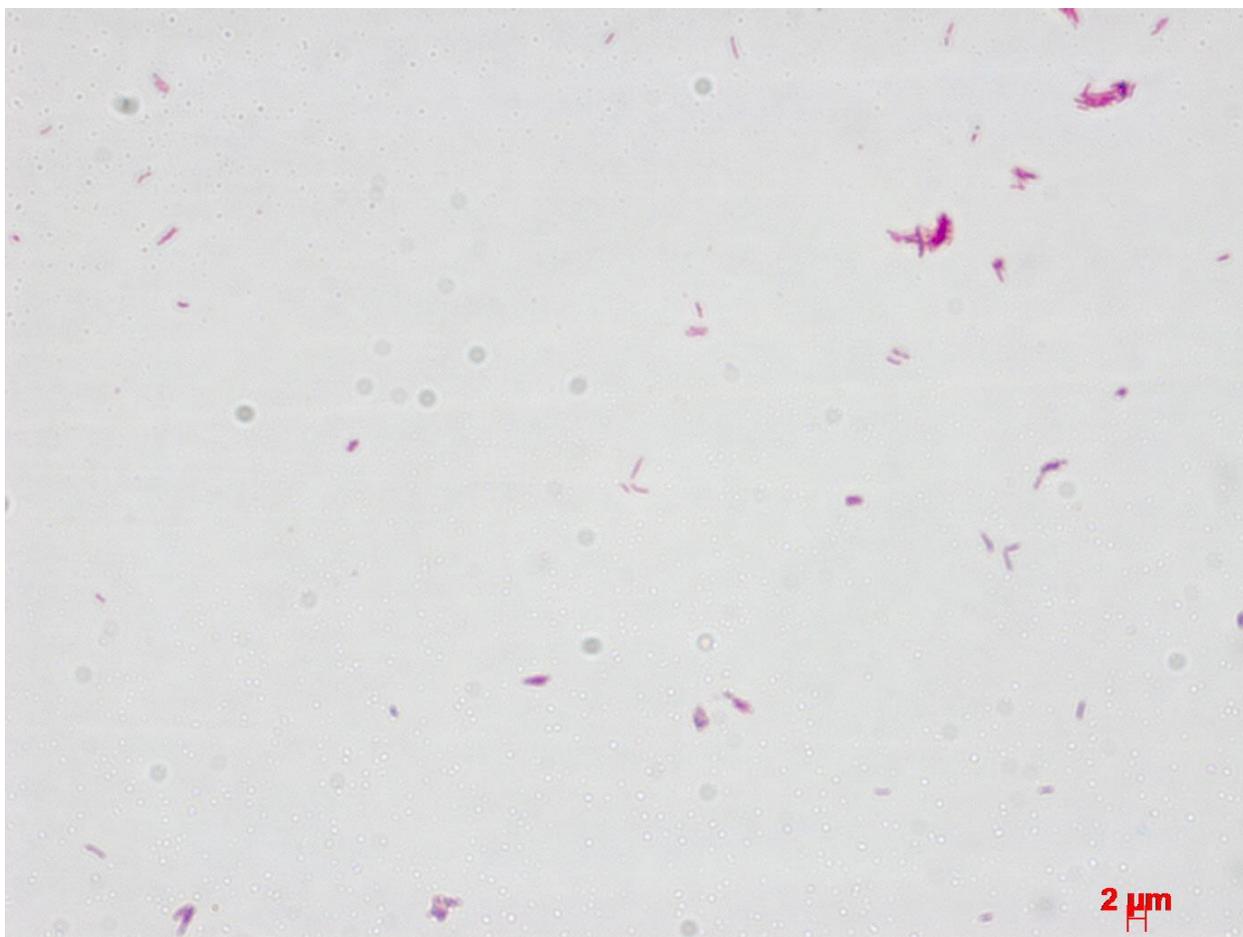
Fonte: A autora, 2022.

Figura 8 - Baciloscopia do reagente de referência para subcepa Moreau-RJ NIBSC 10/272.



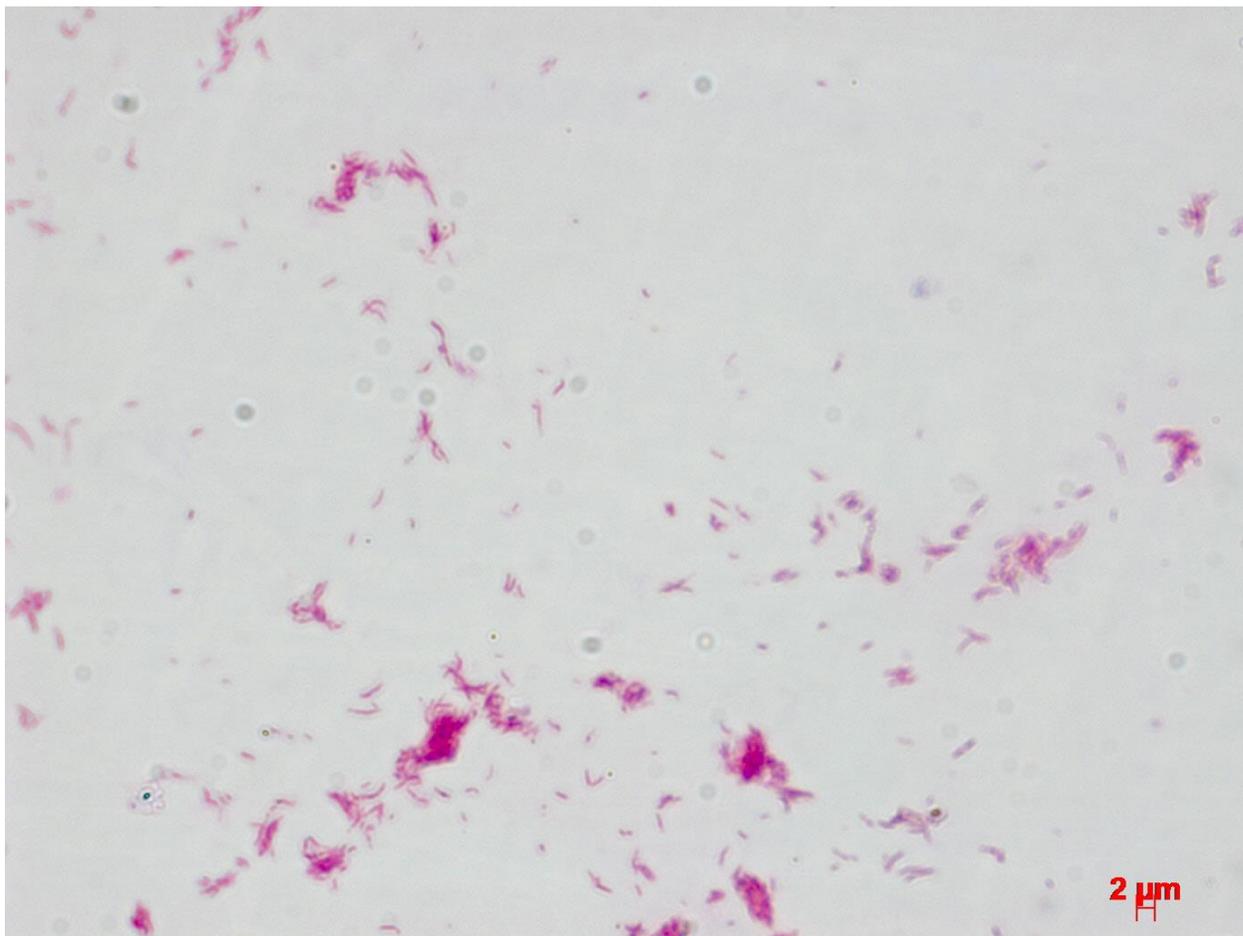
Fonte: A autora, 2022.

Figura 9 - Baciloscopia do reagente de referência para subcepa Russian BCG-I NIBSC 10/274.



Fonte: A autora, 2022.

Figura 10 - Baciloscopia do reagente de referência para subcepa Tokyo 172 NIBSC 07/272.



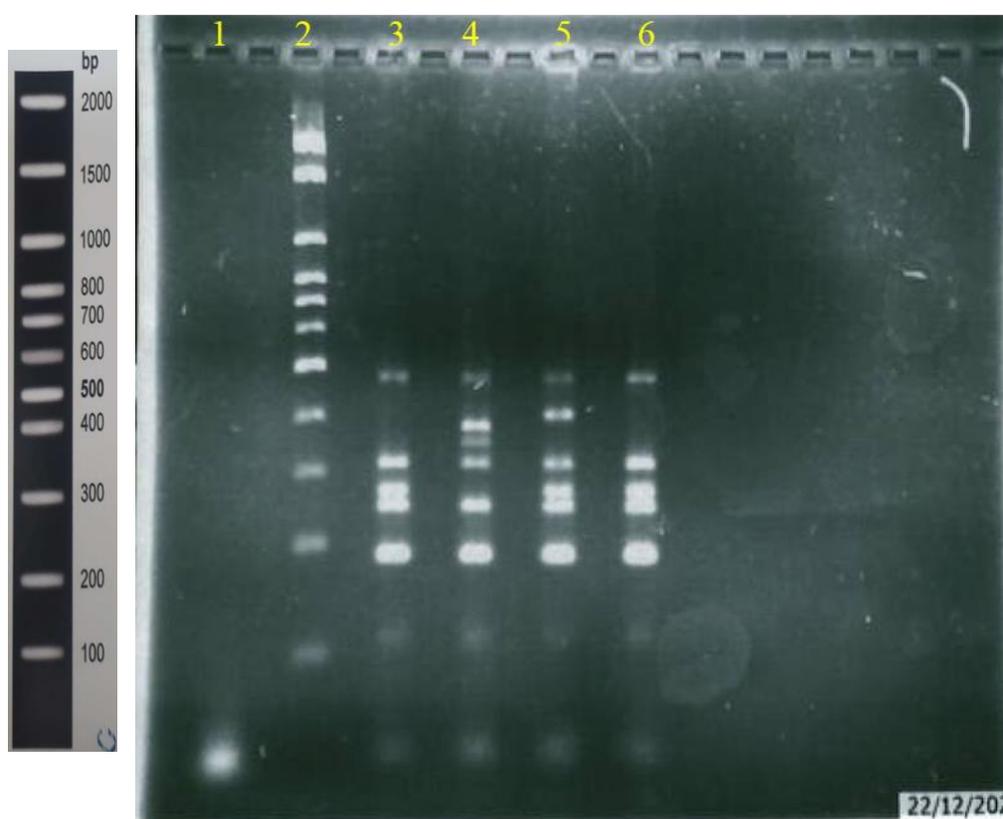
Fonte: A autora, 2022.

4.2 Identidade de subcepas do BCG por PCR multiplex

O padrão de bandas dos reagentes de referência para subcepas Moreau-RJ (NIBSC 10/272), Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272) foi compatível com o esperado para cada uma das subcepas em teste, conforme demonstrado na **Figura 11**. Para a subcepa Moreau foram amplificadas bandas com 196 pb, 252 pb, 276 pb, 315 pb, 472 pb. Para a subcepa Russian BCG-I foram amplificadas bandas com 196 pb, 252 pb, 276 pb, 315 pb, 401 pb e 472 pb. Para a subcepa Tokyo 172 foram amplificadas bandas com 196 pb, 252 pb, 315 pb, 353 pb, 379 pb e 472 pb. O padrão de bandas do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003

foi idêntico àquele observado para o reagente de referência para subcepa Moreau-RJ (NIBSC 10/272).

Figura 11 - Padrão de bandas do lote de vacina referência de trabalho, e dos reagentes de referência para subcepas Moreau-RJ (NIBSC 10/272), Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272) após PCR multiplex para identidade de subcepas do BCG



Fonte: A autora, 2022.

Linha 1: controle da reação de amplificação (branco); linha 2: padrão de peso molecular 100pb; linha 3: BRA/BCG/003; linha 4: Tokyo 172 (NIBSC 07/272); linha 5: Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e linha 6: Moreau-RJ (NIBSC 10/272).

4.3 Contagem de unidades viáveis

Os resultados do ensaio de contagem de UFC do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003, e dos reagentes de referência para subcepas Moreau-RJ (NIBSC 10/272) e Russian BCG-I (NIBSC 07/274) estão sumarizados na tabela 2. Os valores foram obtidos em um único ensaio considerado válido com base na análise do lote de referência de trabalho BRA/BCG/003 em gráfico de controle.

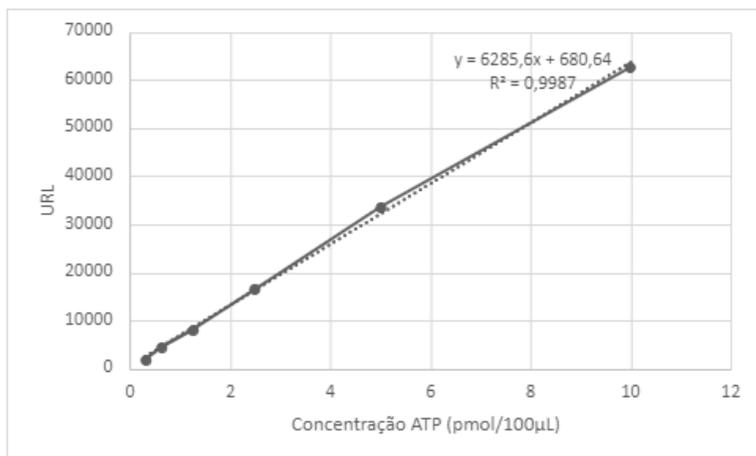
Tabela 2 – Resultado esperado e obtido para o ensaio de contagem de UFC do lote de vacina referência de trabalho, e dos reagentes de referência para subcepas Moreau-RJ (NIBSC 10/272) e Russian BCG-I (NIBSC 07/274)

Reagente de referência	Resultado esperado	Resultado obtido
Moreau-RJ (NIBSC 10/272)	5,8 a 7,2 x 10 ⁶ UFC/ampola	5,34 x 10 ⁶ UFC/ ampola
Russian BCG-I (NIBSC 07/274)	2,9 a 3,9 x 10 ⁶ UFC/ampola	1,78 x 10 ⁶ de UFC/ampola
BRA/BCG/003	9,069 x 10 ⁶ ± 7,158 x 10 ⁶ UFC/ mL	6,66 x 10 ⁶ de UFC/mL e 8 x 10 ⁶ de UFC/mL

UFC: unidade formadora de colônia

4.4 Dosagem de ATP

A curva padrão obtida no ensaio de dosagem de ATP apresentou valor de quadrado do coeficiente de correlação (R²) igual a 0,9987. Para ser considerada satisfatória, este valor precisa ser maior que 0,9, e o mais próximo possível de “um”. Sendo assim, foi considerada válida conforme a **Figura 12** a seguir.

Figura 12 - Gráfico de curva padrão de ATP

Fonte: A autora, 2022

Os resultados do ensaio de dosagem de ATP do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003, e dos reagentes de referência para subcepas Moreau-RJ (NIBSC 10/272), Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272) estão sumarizados na **Tabela 3**. Os valores foram obtidos em um único ensaio.

Tabela 3 - Resultado esperado e obtido para o ensaio de dosagem de ATP do lote de vacina referência de trabalho, e dos reagentes de referência para subcepas Moreau-RJ (NIBSC 10/272), Russian BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272)

Reagente de referência	Resultado esperado	Resultado obtido
Moreau-RJ (NIBSC 10/272)	17,3 a 32,1 ng/ampola	17,91 ng/ml
Russian BCG-I (NIBSC 07/274)	6,0 a 9,0 ng/ampola	3,15 ng/ml
Tokyo 172 (NIBSC 07/272)	190,1 a 245,1 ng/ampola	63,94 ng/ml
BRA/BCG/003	Indeterminado *	29,39 ng/ml

Fonte: A autora, 2022.

* A dosagem de ATP para BRA/BCG/003 é indeterminada pois esta foi estabelecida como vacina de referência antes do estabelecimento do método.

A interpretação dos resultados para os ensaios de contagem de UFC, dosagem de ATP, identidade de BAAR e identidade de subcepas do BCG por PCR multiplex de cada um dos três reagentes de referência internacional e do lote de vacina referência de trabalho está resumida na **Tabela 4** abaixo.

Tabela 4 - Interpretação dos resultados do lote de vacina referência de trabalho e de três reagentes de referência internacionais para os ensaios de contagem de UFC, dosagem de ATP, identidade de BAAR e identidade de subcepas do BCG por PCR multiplex

Ensaio	BRA/BCG/003	TOKYO 172	RUSSIAN BCG-I	MOREAU-RJ
Contagem de UFC	S	NT	I	I
Dosagem de ATP	S	I	I	S
Identidade de BAAR	S	S	S	S
Identidade de subcepas do BCG por PCR multiplex	S	S	S	S

Fonte: A autora, 2022

ATP: trifosfato de adenosina; BAAR: bacilo álcool ácido resistente; I: resultado insatisfatório; NT: não testado; PCR: reação em cadeia da polimerase; S: resultado satisfatório; UFC: unidade formadora de colônia.

5 DISCUSSÃO

As vacinas são importantes instrumentos profiláticos contra o desenvolvimento de doenças. Quando inoculadas no indivíduo, induzem imunidade específica ativa. Podem ser constituídas por microrganismos inativados, microrganismos atenuados, substâncias por eles produzidas ou frações antigênicas (FARMACOPEIA, 2020). Tendo em vista a importância dos imunobiológicos para a saúde coletiva, é de suma relevância realizar o controle de qualidade dos imunobiológicos. Sendo assim, o presente estudo avaliou o comportamento de reagentes de referência internacionais de vacina BCG para subcepas Moreau-RJ (NIBSC 10/272), Russa BCG-I (NIBSC 07/274) e Tokyo 172 (NIBSC 07/272) frente aos procedimentos utilizados nos ensaios de identidade e viabilidade de vacina BCG realizados pelo Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS.

Os resultados dos ensaios de contagem de unidades viáveis para os reagentes de referência internacionais não foram correspondentes aos valores contidos na bula do produtor, contudo o resultado obtido para o lote de vacina de referência de trabalho BRA/BCG/003 foi correspondente ao esperado, o que tornaram os dois ensaios válidos. Considerando o contexto observado, deve-se cogitar os motivos pelos quais isto ocorreu, a fim de que modificações posteriores sejam feitas e resultados compatíveis sejam observados no futuro. Em primeiro lugar, deve-se considerar a reconstituição da ampola dos reagentes de referência internacionais. Diante do cenário de baixo número de ampolas disponíveis, apenas uma ampola foi utilizada, sendo assim, o mesmo volume de 1 ml reconstituído foi transferido para o meio Sauton para o preparo das diluições. Logo, hipotetiza-se que durante este procedimento pode ter havido perdas de material, o que justificaria os baixos valores de UFC para a vacina BCG subcepa Moreau-RJ (NIBSC 10/272) e para a vacina BCG subcepa Russa BCG-I (NIBSC 07/274), o que não ocorreu para o lote de vacina de referência de trabalho BRA/BCG/003, na qual uma única ampola foi reconstituída com 5 ml, e destes retirou-se apenas 1 ml para diluição em meio Sauton conforme o POP INCQS 65.3210.013. Outra possibilidade pode ter sido o uso de estufa não qualificada, embora as temperaturas tenham sido monitoradas com termômetro calibrado. De acordo com a RDC 430/2020, a qualificação térmica é definida como “verificação documentada de que o equipamento ou a área de temperatura controlada garantem homogeneidade térmica em seu

interior”. Rotineiramente, a incubação é realizada em quarto-estufa qualificado com temperaturas monitoradas por termômetro calibrado, porém no período em que os ensaios foram realizados, este equipamento apresentou problemas e não foi possível realizar a incubação neste, sendo necessário empregar outro aparelho não comumente utilizado para o ensaio e não qualificado para tal. De acordo com o gráfico de controle (Média \pm 3 desvios padrões), os limites de controle para o lote de vacina de trabalho BRA/BCG/003 são de $1,910 \times 10^6$ a $16,227 \times 10^6$ UFC/mL, correspondendo a uma faixa muito ampla. Logo, é possível que a não qualificação não tenha sido tão crítica para o lote de vacina de referência de trabalho, o que não se pode dizer das vacinas de referência internacionais NIBSC 10/272 e NIBSC 07/274, que apresentam intervalos de amplitude mais restrita: $5,8$ a $7,2 \times 10^6$ UFC/ampola e $2,9$ a $3,9 \times 10^6$ UFC/ampola, respectivamente (OMS,2013a; OMS,2013b). De acordo com o DOQ-CGRE-028, documento publicado pelo Inmetro que orienta quanto a calibração de câmaras térmicas, é enfatizado que é comum descobrir-se que somente um volume menor dentro da estufa, chamado de área de trabalho, possui as características informadas de acordo com as especificações do fabricante, portanto muitas carecem de uniformidade térmica (Inmetro, 2013), e isso intensifica a importância da qualificação do equipamento. Associado às possibilidades inferidas anteriormente, deve-se destacar que no presente estudo só foi possível realizar um único ensaio para cada reagente de referência internacional, o que contribui para um desfecho pouco robusto. Como é destacado na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, no item “7.7 Garantia da validade dos resultados”, um dos meios para a garantia da validade de resultados são os ensaios ou calibrações replicadas, utilizando-se os mesmos métodos, o que não pôde ser feito devido ao baixo número de amostras disponíveis.

O ensaio de dosagem de ATP é um método alternativo para avaliação da viabilidade da vacina e é descrito na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2020), porém ainda não foi validado no INCQS. De acordo com a RDC 166/2017, a validação compreende-se como a comprovação de que o método analisado, nas condições em que é praticado, possui as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida (BRASIL, 2017b). Sendo assim, o método utilizado no presente trabalho ainda está em estudo no Setor. Dentre as análises de dosagem de ATP dos reagentes de referência internacionais, somente NIBSC 10/272, subcepa Moreau-RJ, apresentou valor conforme o certificado de análise do produtor. Deve-se considerar, no entanto, que o resultado foi obtido em um único ensaio. No

trabalho de França (2022), objetivou-se avaliar a técnica de dosagem de ATP por bioluminescência, e estimou-se a quantidade de ATP em ampolas de reagentes de referência internacionais para as subcepas Moreau-RJ, Tokyo-172 e Rússia-BCG-I. Da mesma forma como ocorrido neste estudo, apenas para a subcepa Moreau-RJ obteve-se o valor compatível com o certificado de análise do produtor de 24,4 ng/ampola de ATP. Já para o reagente de referência Rússia-BCG-I o valor encontrado foi de 4,2 ng/ampola e para Tokyo foi de 69,72 ng/ampola de ATP (FRANÇA, 2022).

A PCR multiplex é um ensaio bem estabelecido e robusto para obtenção da identidade e diferenciação entre subcepas vacinais diversas de BCG (MARKEY *et al.*, 2010). No presente estudo, a PCR multiplex comprovou o perfil de bandas esperado para cada uma das subcepas vacinais conforme descrito pela primeira vez na literatura por Bedwell e colaboradores (BEDWELL, 2001). Na corrida eletroforética foi observada a ausência de bandas no controle da reação de amplificação, uma boa dispersão de bandas do padrão de peso molecular de maneira definida e clara, e separação de bandas de cada uma das amostras. As bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular e o perfil de bandas esperadas. Como o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 e a vacina de referência internacional Moreau-RJ pertencem a mesma subcepa, apresentaram o mesmo perfil de bandas.

A coloração de Zielh-Neelsen obtida nas lâminas de cada uma das subcepas vacinais apresentou presença de BAAR, bacilos alongados corados em vermelho claro pela fucsina compatível para o complexo *Mycobacterium* (MADIGAN,2021), que comparados ao lote de vacina referência de trabalho, confirmou para análise de identidade, portanto o resultado obtido foi satisfatório para esta metodologia.

6 CONCLUSÃO

A análise de identidade do BCG dos reagentes de referência internacionais NIBSC 10/272, NIBSC 07/274 e NIBSC 07/272, e do lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 foi compatível com o esperado.

Os valores estimados do número de unidades viáveis do BCG dos reagentes de referência internacionais NIBSC 10/272 e NIBSC 07/274 não foram compatíveis com suas respectivas bulas do produtor. Já o lote de vacina referência de trabalho BRA/BCG/003 foi satisfatório.

Os valores estimados de ATP foram compatíveis para o reagente de referência internacional NIBSC 10/272 (subcepa Moreau-RJ) e para a vacina referência de trabalho BRA/BCG/00.

Frente aos dados do certificado de análise emitido pelo produtor o laboratório foi capaz de obter resultados compatíveis apenas para viabilidade apenas na dosagem de ATP para o padrão de referência internacional NIBSC 10/272. Para identidade por PCR e coloração de Ziehl-Neelsen, foi compatível para todos reagentes de referência internacionais pesquisados.

Conclui-se, portanto, que a identidade de vacina BCG foi compatível com o esperado. Com relação aos procedimentos de viabilidade, estes foram considerados inconclusivos sendo necessários testes adicionais.

REFERÊNCIAS

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Brasil. Dezembro, 2017.
- BARBERIS, I; BRAGAZZI, N. L; GALLUZZO, L; MARTINI, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **J Prev Med Hyg**, Italy, v. 58, n. 1, p. E9-E12, mar. 2017.
- BARRETO ML; PEREIRA SM; FERREIRA AA. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 45-54, 2006.
- BEDWELL, J; KAIRO, S.K; BEHR, MA; BYGRAVES, J.A. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. **Vaccine**, United Kingdom, v 19, n. 15 and 16, p 2146-51, fev. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Imunizações 30 anos**. Brasília, 2003. p 208.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011. p 284.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação**. Brasília, 2014a. p 176.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica**. Brasília, Ministério da Saúde, 2014b. p 56.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública**. Brasília, 2017a. p 52.
- BRASIL. Resolução da diretoria colegiada. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário oficial da União**: edição 141, seção 1, Brasília, DF, p. 87, 25 julho 2017b. Disponível em:< https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412> Acesso em: 11 junho. 2022.
- BRASIL. Ministério da saúde. Coordenação-geral do programa nacional de imunizações – CGPNI. **NOTA INFORMATIVA Nº 18/2018-CGPNI/DEVIT/SVS/MS**. Brasília, 5 fev. 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fabricação de vacinas BCG e Imuno BCG é suspensa. **Anvisa**, 12 dez.2018b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/56eporto-f56-de-vacinas-bcg-e-imuno-bcg-e-suspensa>. Acesso em: 29 maio. 2022.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Protocolo de vigilância da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* no Brasil**. Brasília, 2018c. p 32.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, 2019. p 364.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública : estratégias para 2021-2025**. Brasília, 2021a. p 68.

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. 2021b. Disponível em: <https://www.gov.br/56epor/pt-br/assuntos/noticias/vacina-bcg-completa-44-anos-de-imunizacao-da-populacao-brasileira-contra-a-tuberculose-3>. Acesso em: 15 maio. 2022.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada. RDC nº 430, de 8 de outubro de 2020. **Diário oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 146, 31 maio. 2021c. Disponível em:<
<https://www.in.gov.br/na/web/dou/-/56eporto-f-rdc-n-512-de-27-de-maio-de-2021-322975673>>
Acesso em: 15 maio. 2022.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada. RDC nº 512, de 27 de maio de 2021. **Diário oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 146, 31 maio. 2021d. Disponível em:<
<https://www.in.gov.br/na/web/dou/-/56eporto-f-rdc-n-512-de-27-de-maio-de-2021-322975673>>
Acesso em: 15 de maio. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Calendário Nacional de Vacinação. **Brasil**, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/56epor/pt-br/assuntos/56epor-de-a-a-z/c/56eporto-f56-nacional-de-vacinacao>. Acesso em: 29 maio. 2022.

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

CEPAL. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), **Panorama Social de América Latina, 2020** (LC/PUB.2021/2-P/Na.1), Santiago, 2021.

CERNUSCHI, T.; MALVOLTI, S.; NICKELS, E.; FRIEDE, M. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine: A global assessment of demand and supply balance. **Vaccine**, United Kingdom, vol. 36, n. 4, p. 498–506, 2018.

DA COSTA, RR; SILVA, MR; GONÇALVES, IC. Laboratory diagnosis of tuberculosis: literature review. **Na Med Minas Gerais**, vol. 28, n. 2, p. 197- 206, 2018.

DAGG. B; HOCKLEY. J; RIGSBY. P, HO. MM. The establishment of sub-strain specific WHO Reference Reagents for BCG vaccine. **Vaccine**, United Kingdom, vol. 32, n. 48, p. 6390–6395, 2014.

DUARTE, Eliana Pereira. **Aprimoramento da técnica de redução do sal de tetrazol XTT aplicada ao controle da viabilidade da vacina BCG produzida no Brasil**. 2011. 33 f. (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

INCQS (Brasil). **POP 65.3210.018**: ensaio de Identidade de BAAR para Vacina BCG. Rev. 14. Rio de Janeiro: INCQS, 2021. 12 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS (Brasil). **POP 65.3210.059**: ensaio de Identidade para Subcepa da Vacina BCG por PCR Multiplex. Rev. 1. Rio de Janeiro: INCQS, 2014. 16 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS (Brasil). **POP 65.3210.071**: ensaio de Esterilidade no Sistema Isolador. Rev. 00. Rio de Janeiro: INCQS, 2019. 28 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS (Brasil). **POP 65.3210.013**: ensaio de Contagem de Unidades Viáveis de BCG e Termoestabilidade da Vacina BCG. Rev. 17. Rio de Janeiro: INCQS, 2020. 40 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

ESMAIL. H; BARRY. CE 3rd; YOUNG DB; WILKINSON RJ. The ongoing challenge of latent tuberculosis. **Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci**, vol. 368, n. 1645, 14 p, 2014.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. Ed. Brasília: ANVISA, 2020. 2 v.

FATIMA. S; KUMARI. A; DAS. G; & DWIVEDI. V. P. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. **Life Sciences**, Índia, vol. 252, 10 p, 2020.

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**. 2022. 52 f. (Residência em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

FURIN J; COX H; PAI M. Tuberculosis. **The Lancet**, United States, vol. 393, p.1642-1656, 2019.

GAGNEUX S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiol**, Switzerland, vol.16, p. 202-213, 2018.

GRANGE JM, GIBSON J, OSBORN TW, COLLINS CH, YATES MD. What is BCG? Tubercle. **Longman**, London, vol. 64, p. 129-39, 1983.

HAYMAN J. Mycobacterium ulcerans: an infection from Jurassic time? **The Lancet**, United States, vol. 324, n. 8410, p.1015-1016, 1984.

HERON GA. Koch's Researches on Tuberculosis. **Glasgow Med J**, London, vol.19, n.2, p. 94-104,1883.

HERON GA. Erlich's Method for the detection of tubercle- bacillus in sputum. British medical association. **Br Med J**, United kingdom, p.721-736,1882.

HO; MEI M. *et al.* Report of na international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine. **Vaccine**, United Kingdom, v. 26, p.4754 - 4757, 2008.

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**, United Kingdom, v. 29, n.3, p. 512–518, 2011.

MARKEY, K; HO, M. M; CHOUDHURY, B; SEKI, M; Ju, L; CASTELLO- BRANCO, L. R. R., CORBEL, M. J. Report of an international collaborative study to evaluate the suitability of multiplex PCR as an identity assay for different sub-strains of BCG vaccine. **Vaccine**, United Kingdom, v. 28, n.43, p. 6964–6969, 2010.

KOCH, ANASTASIA; MIZRAHI, VALERIE. *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, South Africa, vol. 26, n. 6, p. 555-556, 2018.

MADIGAN, M.T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 16 ed. United Kingdom: Pearson Education, 2021.

MAGEE, J. G; WARD, A. C. Mycobacterium. *In*: Professor William B. Whitman John Wiley & Sons, Inc. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 2 ed. United States, p. 1–84, 2015.

NAFCHI, M. Z. *et al.* A Modified ATP Assay for Test the Potency of BCG Vaccine. **Archives of Pharmacy Practice**, Iran, vol. 10, p.20-23, 2019.

OMS. **International collaborative study to evaluate and establish the 1st WHO Reference Reagent of BCG vaccine of Moreau-RJ sub-strain**. WHO/BS, 2012.2200. Geneva, out, 2012. p.33.

OMS. . **In Vitro Assays of BCG Products**. WHO / TB / Technical guide/ 77.9, Geneva, 1977.

OMS. WHO Reference Reagent. **The 1st WHO Reference Reagent for BCG vaccine of Moreau-RJ.** NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG. NIBSC code: 10/272, 2013a.

OMS. WHO Reference Reagent. **The 1st WHO Reference Reagent for BCG vaccine of Russian BCG-I.** NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG. NIBSC code: 07/274, 2013b.

OMS. WHO Reference Reagent. **The 1st WHO Reference Reagent for BCG vaccine of Tokyo 172.** NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG. NIBSC code: 07/272, 2013c.

OMS. WHO Reference Reagent. **The 1st WHO Reference Reagent for BCG vaccine of Danish 1331.** NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG. NIBSC code: 07,270, 2013d.

OMS. **Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization,** WHO/VSQ/97.04, Vaccine Supply and Quality Unit, 1997.

OMS. **Global tuberculosis report,** Geneva, 2021.

OMS. **Global Tuberculosis Report,** Geneva, 2015.

OMS. **Weekly epidemiological record: BCG vaccines: WHO position paper – February 2018,** Geneva, v. 93, n.8, p. 73-96, fev. 2018.

PAULSON, T. Epidemiology: World Tuberculosis Report. A mortal foe. *Nature*, United Kingdom, vol. 502, S2–S3, 2013.

PAI M; BEHR MA; DOWDY D; DHEDA K; DIVANGAHI M; BOEHME CC; GINSBERG A; SWAMINATHAN S; SPIGELMAN M; GETAHUN H; MENZIES D; RAVIGLIONE M; Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*, Canada, vol.2, p. 1-23, 2016

SHAW JA, KOEGELENBERG CFN. Pleural Tuberculosis. *Clin Chest Med*, South Africa, vol. 42, n.4, 2021

TB CARE I. **International standards for tuberculosis care,** Edition 3. The Lancet infectious diseases, United States, 12 jul. 2015.

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*, Russia, vol. 130, p. 48-53, 2016.

TONUS, M. E. M. M. **Avaliação da técnica de redução do sal de Tetrazol XTT para a determinação da viabilidade do BCG Moreau-RJ em amostras de vacina.** 2008. 80 f. (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

ZHANG W, ZHANG Y, ZHENG H, PAN Y, LIU H, DU P, WAN L, LIU J, ZHU B, ZHAO G, CHEN C & WAN K. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. **Plos one**, China, vol.8, n.8,

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 assepticamente, 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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 MI

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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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: $7,0 \pm 0,2$.

A.5 – Solução de Fucsina Fenicada

A.5.1 – Solução A

Fucsina básica-----	10 g
Álcool etílico 90-95% -----	100 mL

Dissolver 10 g de fucsina básica em 100 mL de álcool etílico 90-95%.

A.5.2 - Solução B

Fenol cristalizado-----	100 g
Água purificada -----	10 mL

Dissolver 100 g de fenol cristalizado em 10 mL de água purificada, aquecendo em banho-maria, até a completa dissolução, e deixar esfriar.

A.5.3 – Solução final

Misturar 100 mL da solução A com 55 mL da solução B e completar o volume com água purificada até 1000 mL. Deixar repousar por 24 horas e filtrar em papel de filtro nº 44 tipo Whatman ou algodão, estocar em frasco âmbar. Validade: 01 ano.

A.6 – Solução de álcool-ácido

Ácido clorídrico concentrado P.A.-----30 mL
 Álcool etílico 90-95% -----970 mL

Adicionar 30 mL de ácido clorídrico concentrado P.A. em 970 mL de álcool etílico 90-95%. Deixar o ácido escorrer pelas paredes do frasco com álcool e agitar suavemente. Validade: 01 ano.

A.7 – Solução de azul de metileno

Azul de metileno-----1 g
 Álcool etílico \geq 95% -----100 mL

Dissolver 1 g de azul de metileno em 100 mL de álcool etílico. Completar o volume para 1000 mL com água purificada. Deixar repousar durante 24 horas e filtrar em papel de filtro nº 44 tipo Whatman ou algodão. Validade: 1 ano

A.8 – Fluido Tioglicolato

Caseína de digestão pancreática -----15 g
 Extrato de levedura (solúvel em água) -----5 g
 Dextrose -----5,5 g
 L-cistina-----0,5 g
 Cloreto de Sódio -----2,5 g
 Tioglicolato de sódio (ou ácido glicólico) -----0,5 g (0,3 ml)
 Rezasurina sódica a 1 % (p/v) recentemente preparada -----0,001 g
 Ágar granulado(umidade não superior a 15 %) -----0,75 g

Água purificada-----1000 ml

Misturar a L-cistina, cloreto de sódio, dextrose, extrato de levedura e caseína de digestão pancreática com 1000 ml de água purificada e aquecer até a dissolução total. Dissolver o tioglicolato ou ácido glicólico nessa solução e ajustar o PH com hidróxido de sódio M de modo que, após a esterilização, o PH da solução seja de $7,1 \pm 0,2$. Se houver necessidade de filtração, aquecer a solução novamente, sem deixar alcançar a ebulição e filtrar, ainda quente, em papel de filtro. Adicionar a solução de resazurina sódica, misturar e distribuir em frascos adequados. O meio deve apresentar uma coloração rósea na superfície que não exceda um terço da altura de sua massa líquida.

Distribuir porções de 100 ml em tubos de ensaio e autoclavar a 121°C por 15 minutos utilizando processo validado. Se não for utilizar imediatamente, estocar entre 2°C e 25°C , conforme orientação do fabricante.

A.9 – Caldo caseína soja

Caseína de digestão pancreática -----17 g

Farinha de soja de digestão papaínico -----3 g

Cloreto de Sódio -----5 g

Fosfato de potássio dibásico -----2,5 g

Dextrose -----2,5 g

Água purificada-----1000 ml

PH após a esterilização: $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Dissolver todos os componentes em água purificada, aquecendo brandamente. Resfriar à temperatura ambiente e ajustar o PH com hidróxido de sódio M de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de $7,3 \pm 0,2$. Se necessário, filtrar para a clarificação do meio.

Distribuir porções de 100 ml em tubos de ensaio e autoclavar a 121°C por 15 minutos utilizando processo validado. Se não for utilizar imediatamente, estocar entre 2°C e 25°C , conforme orientação do fabricante.