

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**APLICAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS DE CONTROLE DE
QUALIDADE NA FABRICAÇÃO DA VACINA BCG MOREAU RDJ DO
PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES**

WELLINGTON SEGUINS DA SILVA

RIO DE JANEIRO
2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / CICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Wellington Seguins

Aplicação de Novos Métodos de Controle de Qualidade na Fabricação da Vacina BCG Moreau RDJ do Programa Nacional de Imunizações/
Wellington Seguins da Silva. – Rio de Janeiro, 2013.
xviii,91 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2013.

Bibliografia: f. 68-79

1. Tuberculose. 2. Vacina BCG Moreau RDJ. 3. Controle de Qualidade.
4. Novos Métodos. 5. PCR multiplex. 6. Bioluminescência. I. Título.

CDD 615.372



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

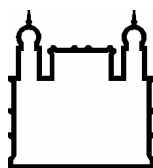
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

WELLINGTON SEGUINS DA SILVA

Aplicação de Novos Métodos de Controle de Qualidade na Fabricação da Vacina BCG Moreau RDJ do Programa Nacional de Imunizações

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de
Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

WELLINGTON SEGUINS DA SILVA

**APLICAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS DE CONTROLE DE
QUALIDADE NA FABRICAÇÃO DA VACINA BCG MOREAU RDJ DO
PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES**

Orientadores: Dr. Luiz Roberto Ribeiro Castello Branco
Dr. José Antônio Pinto Sá Ferreira

Dissertação aprovada em 14 de março de 2013.

Examinadores:

Dr^a. Rosa Teixeira de Pinho
Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ
Presidenta da Banca

Dr^a. Ellen Jessouroun
Bio-Manguinhos/ Fiocruz

Dr. Helio dos Santos Dutra
Instituto de Ciências Biomédicas/ UFRJ

Rio de Janeiro
2013

Trabalho realizado no Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, no Laboratório de Imunologia Clínica e na Fundação Ataulpho de Paiva, sob a orientação do Dr. Luiz Roberto Ribeiro Castello Branco e do Dr. José Antônio Pinto Sá Ferreira.

Aos meus pais Maria e Antonio, pela educação e amor.

A minha esposa Aline, pelo amor, companheirismo e respeito.

As minhas irmãs Elaine, Gecilene e Penha por serem fundamentais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pelo dom da vida, saúde e apoio espiritual em inúmeros momentos de minha caminhada.

A FIOCRUZ e à Direção de Bio-Manguinhos, pela oportunidade e pelas condições propiciadas á realização de uma pós-graduação profissional.

Aos meus orientadores, Dr. Luiz Roberto Ribeiro Castello Branco e Dr. José Antônio Pinto Sá Ferreira, pelo privilégio de aprender com eles e por exercerem completamente o significado da palavra orientação.

Ao Dr. Akira Homma pela criação desse maravilhoso curso.

Aos Professores e à coordenação acadêmica (Dra. Sheila Farage e a Zaíra Prado) do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

Aos meus grandes amigos Renata Maia e Carlos Jesus pelo imenso apoio e amizade.

Ao Laboratório de Imunologia Clínica e a Fundação Ataulpho de Paiva por permitirem a realização deste trabalho.

Ao Dr. Germano Gerhardt pela oportunidade de trabalhar na FAP.

Aos meus companheiros Anna Vieira, Dênis Millan e Vanessa Silveira pela enorme amizade.

Aos companheiros do LIC Thereza Wady, Leila Abboud, Anna Neuraüter, Paulo Stephens, Perielá Vasconcellos, Ingrid Medeiros, Eliane Nascimento, Germano Pontes, Andressa Magalhães, João Gallo, Leonardo Amorim, Anna Moraes, Jéssica Lima, Taíze Quiroga e Paulo Zuquim pelo ambiente maravilhoso que é trabalhar a cada dia com eles.

Aos companheiros da FAP Samira Collen, Thais Silva, Márcia Medeiros, Irene Narciso e Diego Machado.

Aos amigos do MPTI 2013 por tudo que passamos e muitas vezes superamos juntos.

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - A Tuberculose.....	1
1.1.1 - O agente etiológico.....	1
1.1.2 - Transmissão da doença.....	3
1.1.3 - Fisiopatologia.....	4
1.1.4 - Resposta imune contra a TB.....	5
1.1.5 - Manifestações clínicas.....	7
1.1.6 - Diagnóstico da doença.....	9
1.1.7 - Epidemiologia.....	11
1.2 - A Vacina BCG.....	15
1.3 - Controle de Qualidade.....	18
1.3.1 - Ensaio de Identidade por PCR Multiplex (PCRm).....	19
1.3.2 - Ensaio de Bioluminescência.....	21
1.3.3 - Ensaio para a Determinação da Viabilidade.....	22
2 - OBJETIVOS	25
2.1 - Objetivo Geral.....	25
2.2 - Objetivo Específico.....	25

3 - MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 - Amostras de Vacina.....	26
3.2 - Vacina de Referência.....	26
3.3 - Protocolos de extração de DNA da vacina BCG.....	26
3.4 - Quantificação de DNA da vacina BCG.....	27
3.5 - Volume de DNA utilizado para a amplificação.....	27
3.6 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	28
3.6.1 - PCR multiplex (PCRm).....	28
3.6.2 - Programação para a amplificação de DNA pela PCR.....	29
3.6.3 - Análises do produto amplificado - Eletrofosere em gel de agarose.....	30
3.7 - Ensaio de viabilidade.....	30
3.7.1 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	30
3.7.1.1 - Meios de cultura utilizados.....	31
3.7.1.2 - Desenho do ensaio.....	31
3.7.2 - Ensaio de Bioluminescência.....	32
3.7.2.1 - Preparo das amostras.....	32
3.7.2.2 - Preparo da reação de Bioluminescência.....	33
3.8 - Análise estatística.....	34
4 - RESULTADOS	35
4.1 - Padronização da extração e quantificação de DNA da vacina BCG.....	35
4.2 - Amplificação dos alvos genéticos por PCR multiplex.....	36
4.2.1 - Eletroforese em gel de agarose a 3%.....	37
4.2.2 - Avaliação da extração e quantificação de DNA da vacina BCG.....	38
4.3 - Ensaio de Bioluminescência.....	40
4.3.1 - Curva Padrão.....	40
4.3.2 - Avaliação das amostras pelo ensaio de bioluminescência.....	41

4.4 - Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da vacina BCG.....	51
4.5 - Relação da concentração de ATP (URL) por UFC equivalente.....	58
5 - DISCUSSÃO.....	60
6 - CONCLUSÕES.....	67
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8 - ANEXO A.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APCs – Células apresentadoras de antígenos
- ATP – Adenosina 5' - trifosfato
- BAAR - Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
- BCG - Bacilo de Calmette e Guérin
- BPF - Boas Práticas de Fabricação
- BRABCG003 – Vacina de referência de trabalho lote 003
- CD - *Cluster of differentiation* (grupamento de diferenciação)
- CO₂ - Dióxido de carbono
- CQ – Controle de qualidade
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DTT – Ditioneitol
- ELISPOT - *enzyme-linked immunosorbent spot*
- EPI – Programa de Imunização Estendida
- FAP - Fundação Atauípho de Paiva
- TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
- FB - Farmacopeia Brasileira
- FE - Farmacopéia Européia
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- HIV – *Human Immunodeficiency Vírus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- IFN- γ - Interferon gama
- IL - Interleucina
- iNOS - Óxido nítrico sintetase indutível
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz
- kDa - Kilodaltons – unidade de massa molecular
- LAM - Lipoarabinomana
- LJ - Lowenstein-Jensen
- M. Bovis* - *Mycobacterium bovis*
- M. tuberculosis* - *Mycobacterium tuberculosis*
- mg – Miligramas

mPCR – *Multiplex PCR*

µm – Micrometro

Mg⁺⁺ - Magnésio divalente

M. bovis – *Mycobacterium bovis*

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

mL – Mililitro

MS - Ministério da Saúde

NK - Natural Killers

NIBSC - *National Institute for Biological Standards and Control* (Instituto Nacional de Padrões e Controle Biológicos)

nm - Nanômetro

NO - Óxido nítrico

O₂ - Oxigênio

°C - Grau Celsius (medida de temperatura)

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - Pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PCRm - *Polymerase Chain Reaction multiplex*

PDIMs – Phitiocerol dimycocerosates

PPD - *Purified protein derivative* (derivado de proteína purificado)

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

PGLs – Glicolípídeos fenólicos

PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (Eletroforeses em Gel de Campo Pulsado)

R² - Coeficiente de determinação

RD – Regiões de Diferenças

RDJ – Rio de Janeiro

rpm – Rotação por minuto

RR - Reagentes de Referência

SSI - *Statens Serum Institut*

TB – Tuberculose

TBL - Tuberculose Latente

TB-MDR - *Multidrug-resistant tuberculosis* (tuberculose multi-resistente aos Medicamentos)

TB-TDR - Totally drug-resistant *tuberculosis* (tuberculose totalmente resistente aos medicamentos)

TB-XDR – *Extensively drug-resistant tuberculosis* (tuberculose extensivamente resistente aos medicamentos)

Th - Células T helper (célula T-auxiliar)

TST - *Tuberculin Skin Test* (teste tuberculínico)

Treg - Células T regulatórias

UFC - Unidades formadoras de colônias

URL – Unidade Relativa de Luz

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

ZN - Ziehl-Neelsen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Microscopia eletrônica do <i>M. tuberculosis</i>	1
Figura 1.2 - Esquema da organização e composição da parede celular do <i>M. tuberculosis</i>	2
Figura 1.3 - Esquema de transmissão da tuberculose.....	3
Figura 1.4 - Fisiopatologia da tuberculose.....	5
Figura 1.5 – Estimativa da incidência de TB no mundo por cada 100.000 pessoas no ano de 2011.....	12
Figura 1.6 – Estimativa por região (1990-2015) da taxa de mortalidade por TB.....	13
Figura 1.7 - Estimativa da mortalidade por TB no mundo por cada 100.000 pessoas no ano de 2011.....	13
Figura 1.8 - Genealogia da vacina BCG.....	17
Figura 1.9 - Esquema da formação de luz pela reação entre ATP e o complexo enzimático luciferina/luciferase	24
Figura 3.1 - Esquema do ensaio de dosagem de DNA utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA)	27
Figura 3.2 - Esquema da organização das amostras (lotes) para identificação e posterior leitura	33
Figura 4.1. Padrão de amplificação das amostras por PCR multiplex (A e B).....	38
Figura 4.2. Amplificação das amostras por PCR multiplex dos 10 lotes de ampolas da vacina BCG.....	40
Figura 4.3 - Ensaio de padronização da reta de regressão em relação à concentração de ATP (pmol/100µL) e a Unidade Relativa de Luz (URL) para o lote RHO/2010 da vacina BCG....	41
Figura 4.4 - Diagrama de dispersão (pmol/100uL x UFC).....	59
Figura 8.1 - Procedimento de diluição das amostras de vacina em meio Sauton 1/4.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Taxa de incidência por TB por 100 mil habitantes.....	14
Tabela 1.2 - Taxa de mortalidade por TB por 100 mil habitantes.....	15
Tabela 3.1 - Metodologia de extração de DNA das ampolas de BCG.....	27
Tabela 3.2 - Alvos genéticos e Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR multiplex.....	29
Tabela 3.3 - Programa utilizado para PCR.....	30
Tabela 3.4 - Procedimento para o preparo das diluições.....	31
Tabela 4.1 - Dosagem de DNA utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA) para verificar as concentrações de DNA extraído em diferentes metodologias de extração.....	35
Tabela 4.2 - Alvos genéticos e fragmentos (pb) esperados da reação de PCRm com a subcepa BCG Moreau RDJ.....	36
Tabela 4.3 - Dosagem de DNA utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA) para verificar as concentrações de DNA extraído pelo Kit comercial.....	39
Tabela 4.4 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 110042).....	42
Tabela 4.5 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109008).....	43
Tabela 4.6 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 108006).....	44
Tabela 4.7 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109014).....	45
Tabela 4.8 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109009).....	46
Tabela 4.9 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 110039).....	47
Tabela 4.10 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109003).....	48
Tabela 4.11 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 111050).....	49
Tabela 4.12 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 108004).....	50
Tabela 4.13 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109007).....	51
Tabela 4.14 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:RHO/2010) pelo método de UFC/mL.....	52
Tabela 4.15 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:108003) pelo método de UFC/mL.....	53

Tabela 4.16 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:108004) pelo método de UFC/mL.....	53
Tabela 4.17 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:108006) pelo método de UFC/mL.....	54
Tabela 4.18 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109007) pelo método de UFC/mL.....	54
Tabela 4.19 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109008) pelo método de UFC/mL.....	55
Tabela 4.20 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109009) pelo método de UFC/mL.....	55
Tabela 4.21 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109014) pelo método de UFC/mL.....	56
Tabela 4.22 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109039) pelo método de UFC/mL.....	56
Tabela 4.23 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:111050) pelo método de UFC/mL.....	57
Tabela 4.24 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:110042) pelo método de UFC/.....	57
Tabela 4.25 - Relação da concentração (pmol/100µL e ng/ampola) por UFC equivalente.....	58
Tabela 8.1 - Relação da quantidade de insumos adicionados ao LJ	81
Tabela 8.2 - Reagentes necessários para o preparo do meio Sauton 1/4.....	83
Tabela 8.3 - Reconstituição das amostras.....	85
Tabela 8.4 - Distribuição do χ^2 com valores críticos para até n=12.....	87

RESUMO

O agente etiológico da tuberculose é o *M. tuberculosis*, um patógeno intracelular, sendo uma das principais causadoras de mortes no mundo por um único agente infeccioso. A vacina BCG é constituída por uma cepa viva atenuada do *M. bovis*, amplamente utilizada para a prevenção da tuberculose (TB) e como agente imunoterápico contra o câncer superficial de bexiga. A Farmacopeia Brasileira e a OMS recomendam a técnica de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para a determinação da viabilidade, termoestabilidade e ensaios de potência da vacina BCG. Essa técnica é lenta, apresentando baixa reprodutibilidade e alta variabilidade nos resultados dos testes.

A OMS tem realizado desde 1999, revisões dos requerimentos de qualidade da vacina BCG em uso visando a atualização das metodologias e padrões usados no controle. Dentre esses métodos encontra-se o ensaio de bioluminescência, ATP modificado, que pode ser utilizado para determinar o número de organismos viáveis nas vacinas liofilizadas e congeladas, incluindo novas cepas recombinantes. Outra recomendação para o controle de qualidade da vacina BCG baseia-se na confirmação da identidade do produto, nas características genéticas e morfológicas, na observação dos bacilos corados pelo método de Ziehl-Neelsen e na determinação das características das colônias crescidas em meio sólido. Estes métodos não permitem discriminar as diversas subcepas de BCG, assim como diferenciá-las de outros membros do complexo *M. tuberculosis*. O uso de técnicas empregando ácidos nucleicos foi introduzido como método alternativo de controle de qualidade para as subcepas de BCG na fabricação da vacina por ser específico, rápido, reprodutível, robusto e de baixo custo. O objeto do presente estudo, a atualização do controle de qualidade da vacina BCG Moreau RDJ, por meio da identificação genômica por PCR multiplex (PCRm) e avaliação da viabilidade por bioluminescência, de acordo com as novas normas preconizadas pela OMS possibilitou a avaliação de 10 lotes para determinar a relação de ATP pelo UFC. Nossos resultados indicaram que a quantidade de ATP produzido estava diretamente relacionada a quantidade de bacilos viáveis na cultura, mostrando uma correlação forte e positiva ($r = 0,872961$). A avaliação da identidade da vacina BCG Moreau RDJ foi realizada após uma padronização da extração do DNA genômico e amplificação por PCRm de cinco alvos genéticos e os resultados mostraram que a técnica é reprodutível e capaz de amplificar os fragmentos esperados RD2(315 pb), RD8(472 pb), *senX3-regX3*(276 pb), RD15(252 pb) e RD1(196 pb) em 9 dos 10 lotes testados, com a manutenção da identidade nos diferentes lotes. O presente trabalho faz parte de um estudo multicêntrico internacional coordenado pela OMS em andamento desde 2004, que visa à uniformização de novas metodologias de Controle de Qualidade cuja normatização deverá ocorrer após a análise dos resultados por comitês da OMS e, conseqüentemente, a melhoria das vacinas BCGs e de outras contra a TB, em desenvolvimento, que tenham como matriz micobactérias.

ABSTRACT

The causative agent of tuberculosis is *M. tuberculosis*, an intracellular pathogen, is a major cause of death worldwide by a single infectious agent. The BCG vaccine comprises a live attenuated strain of *M. bovis*, widely used for the prevention of tuberculosis (TB) and immunotherapeutic agent against superficial bladder cancer. The Brazilian Pharmacopoeia and WHO recommend the technique of counting colony forming units (CFU) to determine the feasibility and thermostability assays BCG vaccine potency. This technique is slow, displays low reproducibility and high variability in test results. Since 1999 WHO has held meetings to review the quality requirements of the BCG vaccine in use in order to update existing methodologies and standards employed as standard methods. Among these new methods the bioluminescence assay (modified ATP) has been tested to determine the number of viable organisms in vaccines frozen and lyophilized, including new recombinant strains. Another recommendation for the quality control of BCG vaccine is based on the confirmation of product identity, genetic characteristics and morphological observation of bacilli stained by the Ziehl-Neelsen and in determining the characteristics of colonies grown on solid media. These methods do not allow discriminating amongst the different BCG substrains, and differentiate them from other members of the *M. tuberculosis* complex. Using techniques employing nucleic acid was introduced as an alternative method for the quality control of substrains in manufacturing of BCG vaccine for being specific, rapid, repeatable, robust and low cost. The object of this study, updating the quality control of BCG Moreau RDJ, by identifying genomic multiplex PCR (mPCR) and assessment of viability by bioluminescence, according to the new standards proposed by WHO allowed the evaluation of 10 lots to determine the relationship of ATP by the UFC. Our results indicated that the amount of ATP produced was directly related to the amount of viable bacilli in culture, showing a strong and positive correlation ($r = 0.872961$). The assessment of the identity of BCG Moreau RDJ was performed after a standardized genomic DNA extraction and amplification mPCR five genetic targets and the results showed that the technique is reproducible and able to amplify the expected fragments RD2 (315 bp), RD8 (472 bp) *senX3-regX3* (276 bp), RD15 (252 bp) and RD1 (196 bp) in 9 of the 10 lots tested, with retention of identity in different batches. This work is part of an international multicenter study coordinated by WHO in progress since 2004, which aims to standardize new methods of Quality Control whose normalization should take place after the analysis of the results by the WHO committees and, consequently, improved BCG vaccines and other against TB in development that have the matrix mycobacteria.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A Tuberculose

1.1.1 - O agente etiológico

A tuberculose (TB) tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), uma bactéria pertencente à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*, descoberto por Robert Koch (Prêmio Nobel em 1905) em 1882, sendo uma das principais causadoras de mortes no mundo por um único agente infeccioso. (Ducati et al. 2006; Ottenhoff 2009; Kaufmann et al. 2010). Morfologicamente, as micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, apresentam-se na forma de bacilos retos ou curvos, com 0,2 a 0,7 μm de largura por 1,0 a 10,0 μm de comprimento (Figura 1.1). São parasitos intracelulares facultativos, aeróbios, imóveis e não formadores de esporos. Os representantes deste gênero apresentam como propriedade tintorial característica a álcool-ácido resistência, podendo formar complexos com os derivados de trifenilmetano, resistindo à ação do álcool-ácido. (Nolte et al. 1995; Parish & Stoker 1998; Porth 2002).



Figura 1.1 - Microscopia eletrônica do *M. tuberculosis*.

Fonte: <<http://wellcometrust.wordpress.com/2011/03/24/world-tb-day-2011/>>

Os mecanismos imunopatológicos da infecção por *M. tuberculosis* estão diretamente relacionados com a composição da parede celular do bacilo. A composição da parede celular é bastante complexa, apresentando alta concentração lipídica, aproximadamente 20 a 40% do peso seco do bacilo, que é responsável pela resistência das micobactérias ao sistema imunológico do indivíduo infectado e a ação dos desinfetantes ácidos e básicos. Esta característica torna a sua parede hidrofóbica e impermeável aos corantes aquosos, quando submetidos ao aquecimento (Nicod 2007).

A parede das micobactérias é formada pela membrana citoplasmática, seguida de uma camada intermediária de peptidoglicanos, como o ácido glucilil-murâmico, ligados ao polissacarídeo arabinogalactano e estes ao ácido micólico que corresponde à porção externa da parede celular bacteriana, denominada complexo micolilarabinogalactano (Figura 1.2). Este complexo impermeabiliza a superfície da micobactéria tornando-a resistente aos compostos hidrofílicos e a dessecação, além de dificultar a captação de nutrientes e por consequência, o seu crescimento. As micobactérias consideradas de crescimento rápido requerem menos de 7 dias para produzir colônias visíveis enquanto, as de crescimento lento, produzem colônias visíveis após 7 dias de inoculação em meios de cultura sólidos (Nolte et al. 1995; Lee et al. 2005).

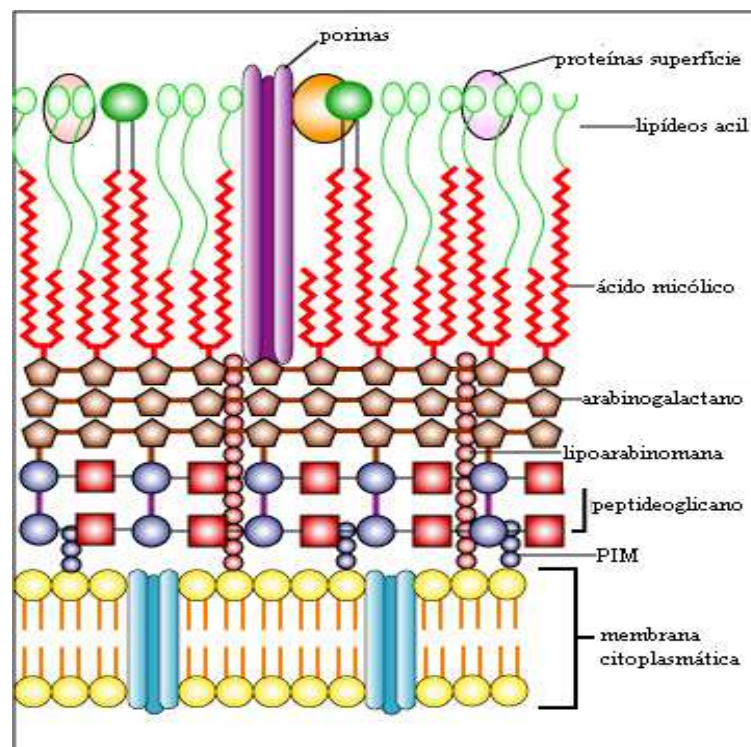


Figura 1.2 - Esquema da organização e composição da parede celular do *M. tuberculosis*. Figura adaptada. Fonte: < <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/u1fig11.html> >

O ácido micólico, o principal grupo de lipídeos livres, é responsável pela característica de álcool-ácido resistência. Os glicolipídeos ou mucosídeos do complexo micolilarabinogalactano, como a lipoarabinomana (LAM), são responsáveis pela toxicidade e estímulo à resposta inflamatória granulomatosa, além da resistência a fagocitose e aos antibióticos. Já o fator corda ou dimicolato de trealose (componente lipídico tóxico) e os sulfolipídeos de trealose são responsáveis pelo crescimento das colônias virulentas e redução da função microbicida pela inibição da fusão do fagossoma-lisossoma (Pollock & Neill 2002).

1.1.2 - Transmissão da doença

O bacilo da TB é transmitido na maioria dos casos pela via respiratória a partir de pacientes bacilíferos que liberam pequenas gotículas (aerossóis) pela tosse, espirros e fala. O número de bacilos nas gotículas, sua virulência, exposição à luz ultravioleta (UV) e o grau de ventilação do ambiente são fatores que influenciam diretamente a sua transmissão de indivíduo a indivíduo (Center for Diseases Control and Prevention 2008).

As gotículas contendo bacilos, após a expectoração, podem permanecer no ar por alguns minutos ou até mesmo horas sendo aspiradas por indivíduos saudáveis (Figura 1.3). Após percorrer as vias aéreas podem alcançar as porções terminais da árvore respiratória chegando aos alvéolos (Sant'Anna 1988; Frieden et al. 2003). O bacilo, pode migrar para outros órgãos causando tuberculose extrapulmonar e patologias no sistema linfático, pleura, ossos/articulações e meninges (American Thoracic Society and Centers for Disease Control and Prevention 2000).

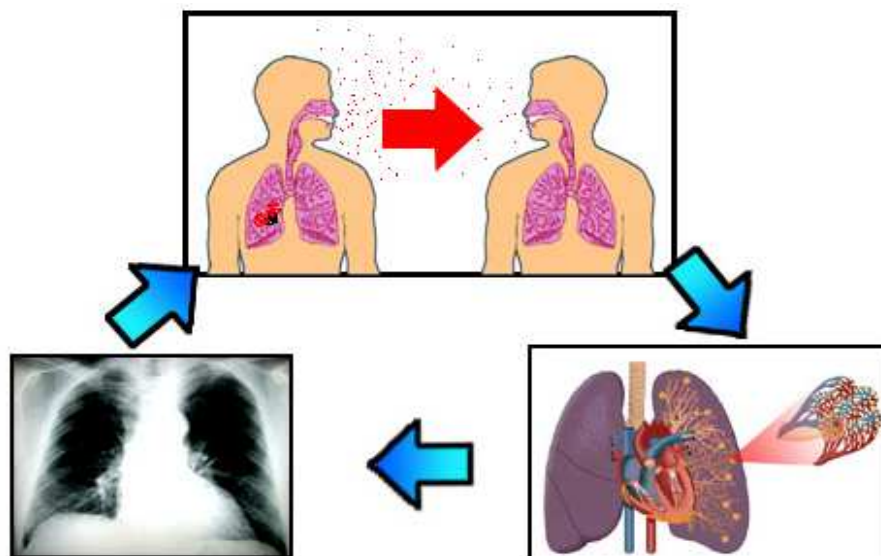


Figura 1.3 - Esquema de transmissão da tuberculose. Figura adaptada.
Fonte: <<http://linssky.com/2011/07/tuberculosis-transmission-and-symptoms/>>

1.1.3 - Fisiopatologia

O muco produzido pelas células caliciformes aprisiona os bacilos presentes nas vias respiratórias superiores. O papel do muco na captação de substâncias e organismos estranhos, além do movimento ciliar é fundamental para a eliminação do bacilo da TB e propicia ao indivíduo um sistema de defesa físico inicial que previne a infecção na maioria dos indivíduos expostos ao bacilo (Frieden et al. 2003; Jensen et al. 2005).

As bactérias que rompem o sistema mucociliar e chegam aos alvéolos são rapidamente cercadas e envolvidas pelos macrófagos, células efetoras do sistema imune inato mais abundantes nesses espaços, responsáveis pelo primeiro combate visando impedir a infecção e destruir o bacilo, com vários mecanismos e receptores envolvidos na absorção das micobactérias (van Crevel et al. 2002; Korf 2006).

O *M. tuberculosis* entra nos macrófagos alveolares por endocitose mediada por receptores como os da manose que se ligam à LAM e às proteínas do complemento facilitando a opsonização pelas células fagocíticas (Pieters & Garfield 2002). No interior dessas células, o bacilo multiplica-se no fagossomo bloqueando a fusão com o lisossomo por meio de mecanismos como a inibição dos sinais de cálcio e o bloqueio do recrutamento das proteínas, que mediam a formação do fagolisossoma (Glickman & Jacobs 2003). Nos macrófagos as micobactérias se multiplicam lentamente, com divisão celular a cada 25 a 32 horas (American Thoracic Society and Centers for Disease Control and Prevention 2000).

Apesar da infecção inicial poder ser controlada ou progredir, ocorre neste processo infeccioso uma intensa produção de enzimas proteolíticas e citocinas por macrófagos, na tentativa de degradar as bactérias (Nicod 2007). A produção de mediadores químicos atrai linfócitos T para o local da infecção. Os macrófagos e as células apresentadoras de antígenos (APCs) expõem antígenos micobacterianos para os linfócitos T. Este processo inicial do sistema imune permanece por 2 a 12 semanas, os microrganismos continuam crescendo até atingir um número suficiente para ativar a resposta imune mediada por células e a formação de granulomas em torno do bacilo (Rosenkrands et al. 2002; Dheda et al. 2005).

Os granulomas, formados pelo acúmulo de linfócitos T ativados e macrófagos (Figura 1.4), possibilitam a formação de um micro ambiente que limita a multiplicação e disseminação das bactérias (Nicod 2007). No processo ocorre intensa morte de macrófagos com produção de necrose sólida no centro da lesão. Os bacilos são capazes de se adaptar ao meio através de mudanças na expressão fenotípica, como a produção de proteínas regulatórias possibilitando a sua sobrevivência neste novo micro ambiente (Li et al. 2002).

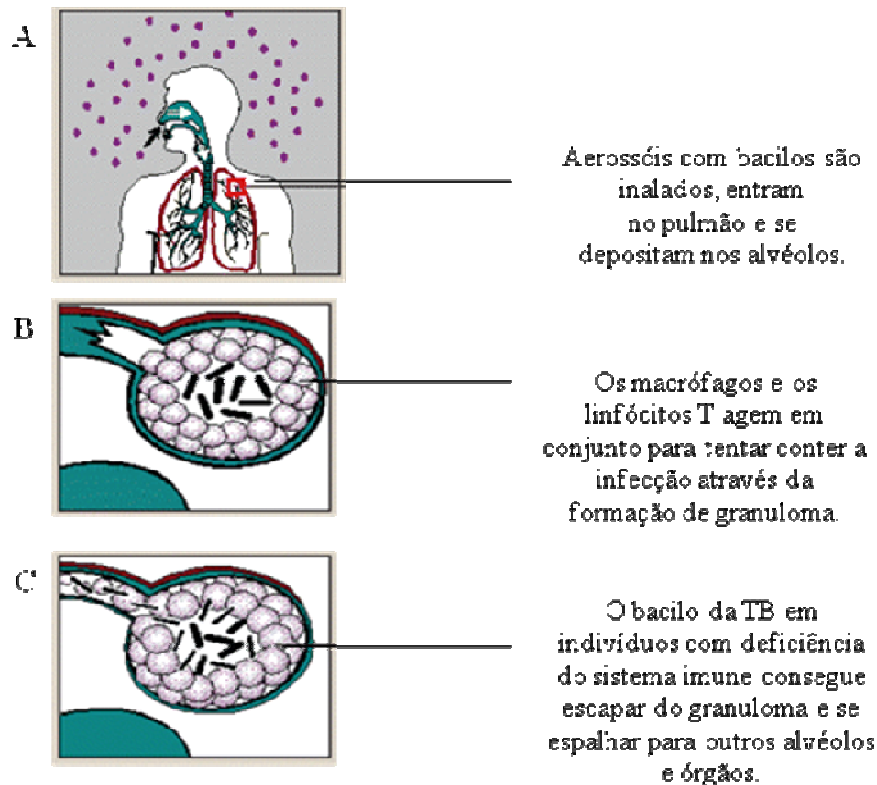


Figura 1.4 - Fisiopatologia da tuberculose: a inalação de bacilos (A), a contenção em um granuloma (B) e a ruptura do granuloma com deficiência do sistema imune (C). Figura adaptada de Knechel (2009).

1.1.4 - Resposta imune contra a TB

Existem inúmeras evidências tanto em seres humanos quanto em camundongos que a proteção contra a TB depende essencialmente da resposta de células T helper 1 (Th1) tipo T CD4+, sendo de fundamental importância para o controle da infecção, a produção de citocinas do tipo interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Além disso, as células Th1 tipo T CD8+ contribuem para a proteção, no primeiro momento pela produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) e pela produção de perforina e granulicina, que destroem diretamente os bacilos e macrófagos infectados (Pinheiro et al. 2008; Hoft 2008).

Os principais mecanismos envolvidos na eliminação dos bacilos intracelulares nos macrófagos compreendem a liberação de várias moléculas tais como os reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio, com destaque para a produção de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A produção desses reativos depende da atividade das enzimas superóxido-dismutase e óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), estimuladas na presença de IFN- γ , especialmente em sinergia com o TNF- α , um mecanismo essencial para o controle da infecção (Ducati et al. 2006).

Outro caminho para o controle da TB é a apoptose de células hospedeiras. No fenômeno da apoptose que conta com a participação de células CD4⁺ e CD8⁺, a fagocitose realiza-se com a participação do IFN- γ . No citoplasma da célula formam-se múltiplos vacúolos dilatados que englobam os fagolisossomas, com diminuição do pH, intensa produção de radicais livres e íons superóxidos, criando uma condição difícil para sobrevivência do bacilo. O macrófago tem o seu metabolismo interrompido, o DNA fragmentado pelas condições desfavoráveis do citoplasma e morre juntamente com o agente infeccioso. (Dietrich et al. 2009).

Descobertas recentes têm mostrado uma potencial contribuição da interleucina (IL)-17 produzidas pelas células T helper 17 (Th17) para controlar a infecção. Essas células atraem e ativam monócitos no sítio de multiplicação do *M. tuberculosis*. Em granulomas sólidos ocorre o desenvolvimento de células fagocíticas mononucleares de diversos estágios de maturação e células T de fenótipos diferenciados. Nesses granulomas, os bacilos estão controlados, mas não erradicados e isto se traduz na convivência equilibrada do hospedeiro e do patógeno. A TB pode se desenvolver novamente pelo enfraquecimento da resposta imune do hospedeiro, fazendo com que o granuloma sólido torne-se caseoso, com a reativação da doença. O bacilo inicia o processo de multiplicação, podendo migrar para outros órgãos e ser transmitido pelo hospedeiro para outros indivíduos saudáveis (Martín 2005; Cooper 2009).

Estudos realizados em animais mostraram que células T antígeno-específicas se desenvolvem durante a infecção pelo *M. tuberculosis* e produzem inúmeras citocinas. As células T polifuncionais são indicativas de proteção e também foram identificadas em pacientes que participaram de ensaios de revacinação (Beveridge et al. 2007).

Em indivíduos adultos que receberam o reforço pelo BCG foi observada a presença de células T polifuncionais com amplo potencial proliferativo. Estudos com animais sugerem que as células T antígeno-específicas são capazes de limitar o granuloma em estágios iniciais da infecção, mas são moduladas por células T regulatórias (Treg) durante a progressão da lesão. A imunidade sofre a ação de citocinas regulatórias, incluindo IL-10 e IL-27 e moléculas regulatórias, como lipoxinas e DAP-12, secretadas pelo patógeno para sua sobrevivência contra as defesas do hospedeiro. A IL-27 é responsável pela proteção do pulmão e sobrevivência dos indivíduos infectados em longo prazo (Parida & Kaufmann 2010).

A citocina IL-12p70 é necessária para melhorar a resposta das células T produtoras de IFN- γ e reduzir a multiplicação do *M. tuberculosis*. A IL-23 induz respostas pulmonares ao IFN- γ na ausência da IL-12, enquanto a principal função da IL-17 é auxiliar a resposta imune

no pulmão. As citocinas IL-23 e IL-17 não são essenciais para o controle precoce da TB nos pulmões, mas ambas as citocinas parecem contribuir para melhorar a proteção induzida pela vacinação. A IL-17 é uma potente citocina pró-inflamatória, induzida durante a TB, responsável por auxiliar a expressão de quimiocinas e o recrutamento de células do sistema imune do parênquima pulmonar. Apesar das células Th1 e Th17 serem estimuladas pela infecção primária do *M. tuberculosis*, a resposta protetora é altamente modificada na ausência de Th1, mas não na ausência de Th17 (Lyakh et al. 2008; Okamoto et al. 2010).

Pesquisas em camundongos apresentaram fortes indícios de que o IFN- γ não se correlaciona diretamente com a proteção induzida pelo BCG. A vacina induz um padrão complexo de expressão de citocinas e fenótipos celulares. Além disso, entre os padrões fenotípicos de células T CD4+, as células de memória eram produtoras de IL-2 e as células efetoras eram produtoras de IFN- γ (Macintyre 2007).

Estudos recentes sobre o papel da imunidade inata geraram mais entendimento sobre peptídeos antimicrobianos e neutrófilos na TB. No aparecimento da TB pulmonar, desequilíbrios em subpopulações de células Natural Killer (NK) foram observadas, indicando o seu envolvimento durante o curso da doença (Hunter et al. 2006).

1.1.5 - Manifestações clínicas

Os sintomas clássicos da TB pulmonar são tosse persistente, febre vespertina, emagrecimento e sudorese noturna. Ela pode se apresentar sob a forma primária, pós-primária (ou secundária) ou miliar (Brasil 2011).

Os casos de TB pulmonar primária ocorrem com maior frequência em crianças, de maneira insidiosa, com o paciente mostrando-se irritado, com febre baixa, sudorese noturna, inapetência e o exame físico podendo ser inexpressivo (Sant'Anna et al. 2009; Brasil 2011).

A TB pulmonar pós-primária ocorre, na maioria dos casos, em adolescentes e adultos jovens e as características principais dessa doença são tosse (seca ou produtiva), expectoração (purulenta ou mucóide), febre vespertina, sudorese noturna, anorexia e ausculta pulmonar com diminuição do murmúrio vesicular, sopro anfórico ou normal (Kristiski & Melo 2007; Brasil 2011)

A TB miliar é determinada a partir das características radiológicas pulmonares. É uma forma grave da doença que acomete indivíduos imunossuprimidos e é mais comum em crianças e adultos jovens. Os sintomas característicos são febre, astenia e emagrecimento. O

exame físico pode mostrar hepatomegalia, alterações do sistema nervoso central e alterações cutâneas do tipo eritemato-máculo-papulo-vesiculosas (Pedrozo et al. 2009; Brasil 2011).

Na TB extrapulmonar os sinais e sintomas são diferenciados de acordo com órgãos ou sistemas acometidos. As principais formas são TB pleural, empiema pleural tuberculoso, TB ganglionar periférica, TB meningoencefálica, TB pericárdica e TB óssea (Brasil 2011).

A forma pleural é mais frequente em indivíduos positivos para a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Apresenta-se com maior incidência em jovens e caracteriza-se pela ocorrência de dor torácica; astenia, emagrecimento e anorexia em 70% dos pacientes; febre com tosse seca em 60% dos indivíduos e, em alguns casos, pneumonia bacteriana aguda e dispnéia (Burril et al. 2007).

O empiema pleural caracteriza-se por ruptura de uma cavidade tuberculosa para o espaço pleural com ocorrência de pneumotórax secundário à fistula broncopleural pela cavidade tuberculosa (Brasil 2011).

Os casos de TB ganglionar periférica apresentam-se com maior frequência em crianças e pacientes HIV positivos, sendo mais comum em indivíduos abaixo de 40 anos. As características clínicas são aumento subagudo, indolor e assimétrico das cadeias ganglionares cervical anterior e posterior, além da supraclavicular (Conde & Muzy de Souza 2009).

A TB meningoencefálica pode se apresentar na forma subaguda ou crônica, com sinais e sintomas com duração superior a 4 semanas. Na primeira, o paciente apresenta irritabilidade, cefaléia holocraniana, sonolência, anorexia, alterações de comportamento, vômitos e dor abdominal associados à febre, fotofobia e rigidez de nuca por tempo superior a duas semanas. Algumas vezes, os pacientes com esta doença podem apresentar sinais focais relacionados a síndromes isquêmicas locais ou ao envolvimento de pares cranianos (II, III, IV, VI e VII) e com ocorrência casos hipertensão intracraniana (edema de papila). Na forma crônica, o paciente pode permanecer várias semanas com cefaleia e com o comprometimento dos pares cranianos suspeita-se de meningite crônica (Pai & Menzies 2009; Brasil 2011).

Os principais sintomas da TB pericárdica são dor torácica, tosse seca e dispnéia. Em alguns casos os pacientes podem apresentar febre, emagrecimento, astenia, tonteira, edema de membros inferiores, congestão hepática e ascite (Daley et al. 2009).

A TB óssea apresenta-se na maioria dos casos em crianças ou em pessoas entre as 4ª e 5ª décadas. Atinge mais a coluna vertebral e as articulações coxofemoral e do joelho, embora possa ocorrer em outros locais. O quadro clínico característico constitui-se de dor lombar, dor à palpação e sudorese noturna comprometendo mais frequentemente a coluna torácica baixa e a lombar (Scheinmann et al. 1997).

1.1.6 - Diagnóstico da doença

Os métodos utilizados atualmente para o diagnóstico da TB são a baciloscopia, a cultura microbiológica, a radiografia de tórax e o teste intradérmico com o derivado protéico purificado (*purified protein derivative*, PPD, em inglês) ou teste tuberculínico (TST). Esses métodos não têm apresentado o sucesso esperado para reduzir a incidência da TB de forma significativa (Frieden et al. 2003).

A baciloscopia é o método de diagnóstico e controle mais usado durante o tratamento da TB pulmonar, sendo a técnica fenotípica de coloração específica Ziehl-Neelsen (ZN) a mais empregada para a pesquisa de bacilos no escarro. Apesar de ser simples e de baixo custo, o método de ZN apresenta como principal desvantagem o fato de ser negativo em 30 a 50% dos casos de pessoas infectadas, em parte devido à necessidade da presença de pelo menos 5.000 bacilos/mL de escarro (CDC 2012; Haldar 2011).

A cultura microbiológica é utilizada em casos pulmonares suspeitos e negativos à baciloscopia. A vantagem desse método está na capacidade de detectar e isolar a micobactéria, podendo identificar a espécie ou complexo isolado, além de determinar a sensibilidade aos quimioterápicos para TB (Ceyhan et al. 2012). Os principais meios de cultura utilizados são o de Löwenstein-Jensen (meio sólido à base de ovo) e o Middlebrook (sólido ou líquido, à base de agar). Essa metodologia apresenta um longo período de realização devido às características de crescimento lento das micobactérias, sendo necessário de 3 a 6 semanas para a detecção do bacilo em meio sólido e o teste nem sempre apresentar 100% de positividade. Os sistemas automatizados para detecção de micobactérias como o BACTEC 460 TB®, BACTEC 9000® e o MGIT® utilizam meios enriquecidos que promovem a aceleração do crescimento bacteriano, mas podem também indicar resultados falso-positivos devido à contaminação por outras bactérias (Golden 2005; Teixeira 2007).

A radiografia do tórax é uma importante ferramenta para auxiliar o diagnóstico da TB em pacientes que são sintomáticos e negativos à baciloscopia, em familiares de pacientes bacilíferos e em suspeitos de TB extrapulmonar. O método se baseia na presença de opacidades radiológicas características. Na TB pulmonar primária observa-se opacidade mais homogênea e aumento no volume dos linfonodos regionais e na TB pulmonar secundária observa-se opacidade heterogênea com a presença de cavidades e nódulos (Thrupp et al. 2004). A tomografia computadorizada do torax apresenta alta resolução e maior sensibilidade quando comparada a radiografia de tórax, mas apresenta alto custo estando disponível apenas em centros de referência (Teixeira 2007; Baharoon 2008).

O TST ou PPD apresenta alta positividade em indivíduos com a doença e tem sido utilizado na triagem como auxiliar no diagnóstico da TB permitindo a identificação da infecção, inclusive na forma latente, não sendo suficiente para o diagnóstico da doença. O PPD não possui alta sensibilidade ou especificidade e em média, 10 a 25% dos pacientes com TB ativa não reagem ao teste, o qual apresenta sensibilidade reduzida em pacientes imunocomprometidos, pessoas recentemente infectadas e crianças jovens. Por conter diversos antígenos compartilhados entre diferentes espécies de micobactérias (ambientais, complexo *M. tuberculosis* e *M. bovis*/BCG) o PPD apresenta baixa especificidade não definindo com segurança as pessoas vacinadas das expostas a micobactérias ambientais ou infectadas com o complexo *M. tuberculosis* (Fine 1994; Andersen 2000).

Até recentemente, a detecção da tuberculose latente (TBL) por *M. tuberculosis* era realizada com o teste de PPD, mas devido a baixa sensibilidade e especificidade clínica, novos métodos de avaliação tem sido usados (Sester 2004). Uma alternativa são os métodos imunológicos disponíveis comercialmente baseados na liberação de interferon γ (IGRAs) em que o IFN- γ , indicador antimicobacteriano de células T efectoras, pode ser analisado por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) como o ensaio QuantiFERON-TB (Cellestis Limited, St. Kilda, Austrália) ou por ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot), como o ensaio T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, Reino Unido). Esses ensaios *in vitro* detectam no soro de pacientes qualquer liberação de IFN- γ na estimulação de células T sensibilizadas a antígenos *M. tuberculosis*, como o ESAT-6 e o CFP-10 (Pai 2004).

Para detectar a TB ativa novos testes moleculares estão sendo desenvolvidos como o *e-nose* ou nariz eletrônico, capaz de detectar componentes voláteis no soro. Estes componentes são possivelmente liberados a partir do pulmão para a circulação por micobactérias presentes em uma infecção ativa, porém apesar da facilidade de execução e baixo custo, este método não tem mostrado ser capaz de discriminar entre infecções causadas por micobactérias patogênicas e não patogênicas. O efeito da vacinação pelo BCG sobre a sensibilidade desse método de diagnóstico é incerto (Fend et al. 2005; Pai & Menzies 2009).

O método de amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos (TAAN) é baseado na detecção de sequências específicas de DNA do complexo *M. tuberculosis* em espécimes clínicos, com resultados em 24 a 48 horas. Esses ensaios apresentam uma resposta rápida, exigindo laboratório, pessoal técnico especializado, não apresentando praticidade nos casos de TB extrapulmonar ou pediátrica, nos quais é necessário haver um procedimento invasivo para obtenção de amostra para análise (Sperhake 2004; Malbruny 2011; Brasil 2011).

1.1.7 - Epidemiologia

A TB é uma doença grave de evolução crônica que tem atormentado a humanidade nos últimos milênios. Há evidências dessa doença em fragmentos ósseos da coluna vertebral em múmias do antigo Egito, a 5.000 a.C., que apresentavam deformidades características da tuberculose (Rosemberg 1999). A ideia de que essa doença esteve amplamente distribuída pelo mundo vem de cadáveres encontrados, com deformidades ósseas, em varias regiões da Itália, Dinamarca e países do Oriente Médio, no período Neolítico (Smith 2003).

A TB é um dos principais problemas de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (Colditz et al. 1995; Kaufmann 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2007 e 2009), uma pessoa morre de TB a cada 18 segundos, quase 2 milhões por ano e a cada 4 segundos uma pessoa desenvolve a TB ativa, totalizando cerca de 10 milhões de novos casos a cada ano. Estima-se em dois bilhões o número de pessoas infectadas por *M. tuberculosis* no mundo e que 10% dessas desenvolvem a doença.

Na lista das infecções letais a TB permanece no topo, perdendo apenas para a aids. É a principal causa de morte entre indivíduos infectados pelo HIV o que contribuiu para o ressurgimento dessa doença na África. Há aproximadamente 15 milhões de indivíduos co-infectados HIV/*M. tuberculosis* no mundo. A ligação perigosa entre o HIV/aids e a TB é mais complicada pelo aumento da incidência de tuberculose multi-resistente (TB-MDR) e extensivamente resistente aos medicamentos (TB-XDR), e a ocorrência mais recente de cepas totalmente resistente a drogas (TB-TDR), que praticamente não tem tratamento, tornando o sucesso terapêutico praticamente impossível (WHO 2008; Shenoj & Friedland 2009; Kaufmann 2010; Gandhi et al. 2010).

O tratamento para a TB-MDR, definida como a resistência à rifampicina e isoniazida, com ou sem resistência a outras drogas é duradouro, menos eficaz, caro e pouco tolerado pelos pacientes. A TB-XDR é resistente a pelo menos, rifampicina e isoniazida, além de outras quinolonas e pelo menos um agente de segunda linha injetável (capreomicina, ampicacina e canamicina). Aproximadamente, 50 milhões de pessoas já estão infectadas com cepas TB-MDR, com mais de 110.000 mortes por ano. (Gary & Wilkinson 2007; Donald & Van Helden 2009; Zignol et al. 2006; WHO 2012).

Em 2011 ocorreram 8,7 milhões de novos casos de TB (Figura 1.5), a maioria no Sudeste Asiático (59%) e em Regiões Africanas (26%) com pequenas proporções na Região Oriental do Mediterrâneo (7,7%), Europa (4,3%) e Américas (3%). Do total destes novos

casos cerca de 1,0-1,2 milhões (12-14%) eram HIV positivos com 79% na África e 13% no Sudeste Asiático (WHO 2012).

Os cinco países com o maior número de casos em 2011 foram Índia (1,6-2,4 milhões), China (0,9-1,1 milhões), África do Sul (0,4-0,6 milhões), Indonésia (0,4-0,5 milhões) e Paquistão (0,3-0,5 milhões) (WHO 2012).

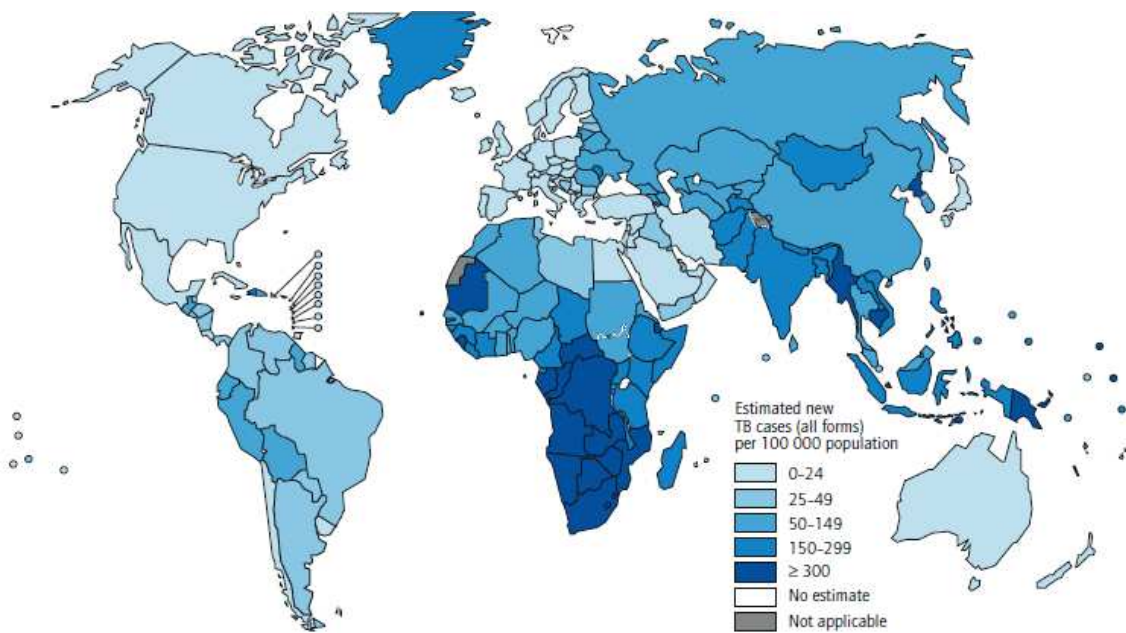


Figura 1.5 – Estimativa da incidência de TB no mundo por cada 100.000 pessoas no ano de 2011 (WHO 2012).

A estimativa do número de mortes em decorrência da TB para o ano de 2011 foi de 990.000, o equivalente a 14 mortes por 100.000 habitantes, com um adicional de 0,43 milhões de mortes associadas a co-infecção pelo HIV e 0,5 milhão entre mulheres. As taxas de mortalidade, excluindo as mortes de pessoas HIV positivas, caíram 41% desde 1990 (Figura 1.6) em todo o mundo, estando em declínio em todas as regiões. A Figura 1.7 mostra a mortalidade de TB no mundo (WHO 2012).

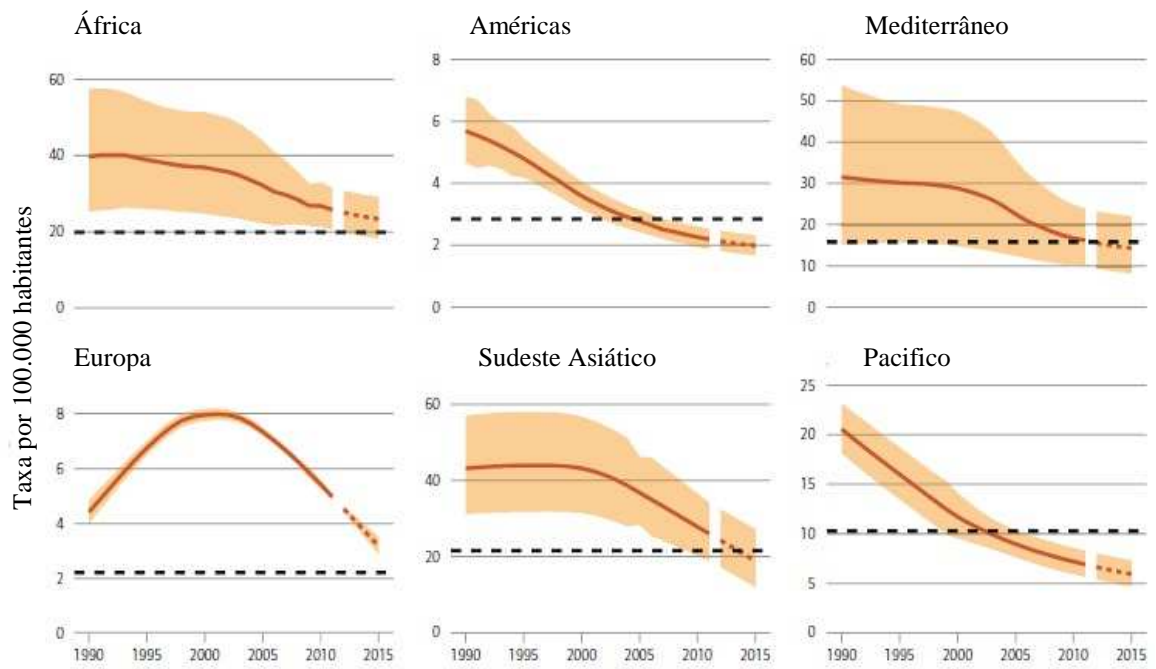


Figura 1.6 - Estimativa por região (1990-2015) da taxa de mortalidade por TB. Figura adaptada (WHO 2012).

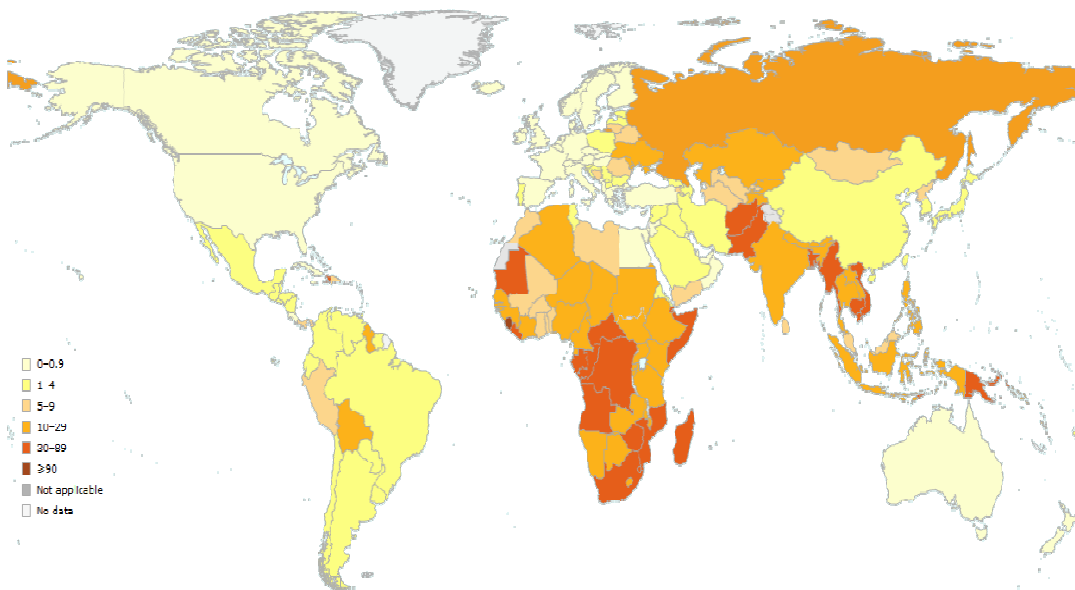


Figura 1.7 – Estimativa da mortalidade por TB no mundo por cada 100.000 pessoas no ano de 2011 (WHO 2012).

No Brasil de acordo com o Ministério da Saúde (MS) houve uma redução de 3,54% nos casos de TB que em 2010 atingiram 71.790 e em 2011 alcançaram 69.245, tendo sido registrados 36 casos da doença por 100 mil habitantes, contra 42,8 casos em 2001 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Taxa de incidência por TB por 100 mil habitantes.

Região	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa
Norte	51,2	51	50	50,6	47,2	45,9	45,3	46,3	47,6	45,5	45,2
Nordeste	46	44,1	46,1	45,9	45,4	40,7	38,8	38,6	38,4	36,9	35,9
Sudeste	44,4	48,7	47,3	45,5	42,7	41,3	40,6	42,1	40,7	40,6	37,6
Sul	32,2	34,6	35,4	34,1	32,4	30,4	31,6	32,7	33	33,2	33
Centro-Oeste	28,7	26,3	27,1	24,7	25,3	24	23	23,3	22	22,6	22
Brasil	42,8	44,4	44,4	43,4	41,5	38,7	37,9	38,8	38,2	37,6	36

Fonte: Sinan, InfoPen e IBGE (consulta realizada em 11/6/2012). Dados sujeitos a alteração.

O número de óbitos decorrentes da doença, também apresentou redução com uma queda de 23,4% na taxa de mortalidade após uma década (Tabela 1.2). O país registrou 3,1 óbitos para cada grupo de 100 mil habitantes em 2001, passando para 2,4 em 2010. Apesar dos avanços no país, a TB representa a quarta causa de óbitos por doenças infecciosas e a primeira entre pacientes com aids (Boletim Epidemiológico 2012).

No Rio de Janeiro, a taxa de incidência da TB em 2011 teve uma redução de 18,9% variando de 70,3 para 57,6 por 100 mil habitantes em relação a 2010. O Sudeste foi a região que apresentou a maior redução da taxa de incidência no mesmo período passando de 40,6 para 37,6 por 100 mil habitantes. A região Nordeste apresentou redução de 36,9 para 35,9 por 100 mil habitantes em relação a 2010, enquanto a região Norte manteve a mesma taxa no período (45,2 por 100 mil habitantes) e as regiões Sul e Centro-Oeste apresentaram pequenas reduções, de 0,2 e 0,6, respectivamente (Boletim Epidemiológico 2012; Rojahn 2012).

Tabela 1.2 – Taxa de mortalidade por TB por 100 mil habitantes.

Região	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa	taxa
Norte	2,9	2,3	2,5	2,4	2,3	2,3	2,3	2,4	2,4	2,2
Nordeste	3,1	3,2	3	3	3,1	3,1	3,1	3,1	3	2,8
Sudeste	3,7	3,4	3,2	3,1	2,7	2,7	2,6	2,7	2,6	2,6
Sul	2,3	2,2	2,1	2	1,8	1,7	1,7	1,8	1,7	1,6
Centro-Oeste	2	1,9	1,8	1,9	1,8	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6
Brasil	3,1	3	2,8	2,8	2,6	2,6	2,5	2,6	2,5	2,4

Fonte: Sinan, InfoPen e IBGE (consulta realizada em 12/6/2012). Dados sujeitos a alteração.

1.2 - A Vacina BCG

O bacilo utilizado nos dias atuais para a produção da vacina BCG foi obtido por Nocard, a partir do isolamento de uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), do leite de uma novilha com mastite tuberculosa. Entre 1908 e 1921 na tentativa de obter suspensões homogêneas e não grumosas, Albert Léon Charles Calmette obteve casualmente um fenômeno de mutação, repicando as culturas em batatas impregnadas em bile de boi (Succi 1985; Doherty & Andersen 2005). Após 231 passagens Albert Léon Charles Calmette e Jean-Marie Camille Guérin observaram que as culturas ainda se mantinham grumosas com a mesma morfologia e propriedades físicas, sendo essas amostras posteriormente nomeadas de bacilos de Calmette-Guérin (BCG), apresentando atenuação progressiva da virulência em animais de laboratório (Sakula 1983).

A cepa atenuada do *M. bovis*, BCG, foi desenvolvida há quase 100 anos e permanece como a única vacina disponível contra a TB. A BCG é a primeira vacina administrada em recém-nascidos nos países em desenvolvimento (Trunz *et al.*, 2006) e teve seu uso inicial em humanos no ano de 1921, quando uma criança recebeu na França, por via oral três doses de 2 mg (6 mg no total; aproximadamente $2,4 \times 10^8$ UFC). Após a administração da vacina não foram observados efeitos adversos e a criança não desenvolveu TB, apesar de sua mãe ter morrido de TB após o parto. Depois do sucesso dessa vacinação outros recém-nascidos foram vacinados e não foi observado o desenvolvimento da TB na infância indicando que uma vacina segura e eficaz contra a TB estava disponível (Liu *et al.* 2009).

A partir de 1924, o Instituto Pasteur começou a distribuir culturas de BCG para laboratórios ao redor do mundo. A manutenção das culturas de BCG variou extremamente entre os países beneficiados, uma vez que a BCG é uma vacina viva a qual necessita ser repicada em meio de cultura fresco em poucas semanas. Apesar dos esforços para a padronização de produção e preparação da vacina, como não existiam normas de agências reguladoras locais ou internacionais, diferentes condições de passagens foram utilizadas em diversos laboratórios gerando dezenas de subcepas filhas (Ducati et al. 2006).

A cepa BCG disponível sofreu duas fases de atenuação. A fase inicial (1908 a 1921) por Calmette e Guérin que é caracterizada pela deleção do locus gênico RD1 que apresenta nove regiões de leitura (Rv3871 a Rv3879c), responsáveis pela produção e secreção de proteínas, como por exemplo, o CFP-10 e o ESAT-6, mediadores de virulência do *M. bovis* e do complexo *M. tuberculosis*. A segunda fase que começou após 1924 com amplo uso e distribuição da vacina BCG foi responsável pela deleção de outros genes (Behr 2002).

A distribuição da primeira subcepa filha documentada foi o BCG Russo obtido em 1924. Depois do BCG Russo as seguintes cepas foram obtidas: Moreau (1925), Japão (1925), Sueca (1926) e Park (1926 fornecida a Phipps em 1928), Dinamarquesa (1931), Tice (1934), Frappier (1937), Birkhaug (1946), Connaught (1948 obtida a partir da Frappier), Praga (1947 obtida a partir da Dinamarquesa), Glaxo (1954 obtida a partir da Dinamarquesa) e Pasteur (liofilizado, 1961, após 1173 passagens seriadas) (Behr & Small 1999; Mostowy et al. 2003).

A subcepa BCG Moreau chegou ao Brasil, em 1925, trazida pelo médico uruguaio, Julio Elvio Moreau. Essa amostra foi entregue ao pesquisador Arlindo de Assis, no Rio de Janeiro e foi chamada de BCG Moreau. Ainda hoje, a razão pela qual a amostra não foi levada para o Uruguai permanece desconhecida (Benévolo-de-Andrade et al. 2005).

Somente em 1950, a OMS estabeleceu as primeiras recomendações para a produção e controle da vacina BCG. Assim, em 1961, a subcepa Pasteur foi liofilizada e o primeiro lote semente estabelecido. Após várias décadas e centenas de passagens foi decidido pela OMS, em 1966, o estabelecimento de lotes sementes de todas as subcepas utilizadas para a produção da vacina em todos os laboratórios produtores do mundo, com o objetivo de evitar futuras modificações das cepas (Ducati et al. 2006; Behr 2002).

Recentemente, as subcepas de BCG foram subdivididas em dois grupos principais, as subcepas iniciais e tardias. As subcepas iniciais apresentam como representantes os BCGs Tóquio, Moreau, Russo e Sueco, os quais são secretores de grandes quantidades da proteína MPB70, possuem duas cópias da sequência de inserção IS6110 e contêm os genes *mpb64* e metoximicolato. As subcepas tardias apresentam como representantes o BCG Pasteur,

Copenhague, Glaxo e Tice que, por sua vez, secretam pouco MPB70, possuem uma única cópia da inserção IS6110 e não apresentam os genes *mpb64* e metoximicolato (Palomino et al. 2007; Harboe & Nagai 1984).

O BCG Moreau RDJ (subcepa produzida no Rio de Janeiro), apresenta uma deleção de 975 pb que elimina a região final do gene *fadD26* e o início do gene *ppsA*. (Leung *et al.*, 2008). Estes genes são constituintes do lócus responsável pela biossíntese do phthiocerol dimycocerosates (PDIMs) e dos glicolipídeos fenólicos (PGLs), que são lipídeos constituintes da parede celular e contribuem para a virulência do *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Cox et al. 1999; Reed et al. 2004; Hotter et al. 2005).

Análises genômicas comparativas entre o BCG e o *M. bovis*, bem como entre as diversas cepas, revelaram que o BCG perdeu mais de 100 genes em relação ao *M. bovis*. Provavelmente, essa diversidade gênica das cepas de BCG levou à diferença fenotípica e imunológica que pode ser uma das explicações para as variações na eficácia dos BCG (Palomino et al. 2007). Deste modo, como mostra a Figura 1.8, outras deleções, inserções e mutações podem ser observadas nas subcepas BCG, em diferentes tempos (Liu et al. 2009).

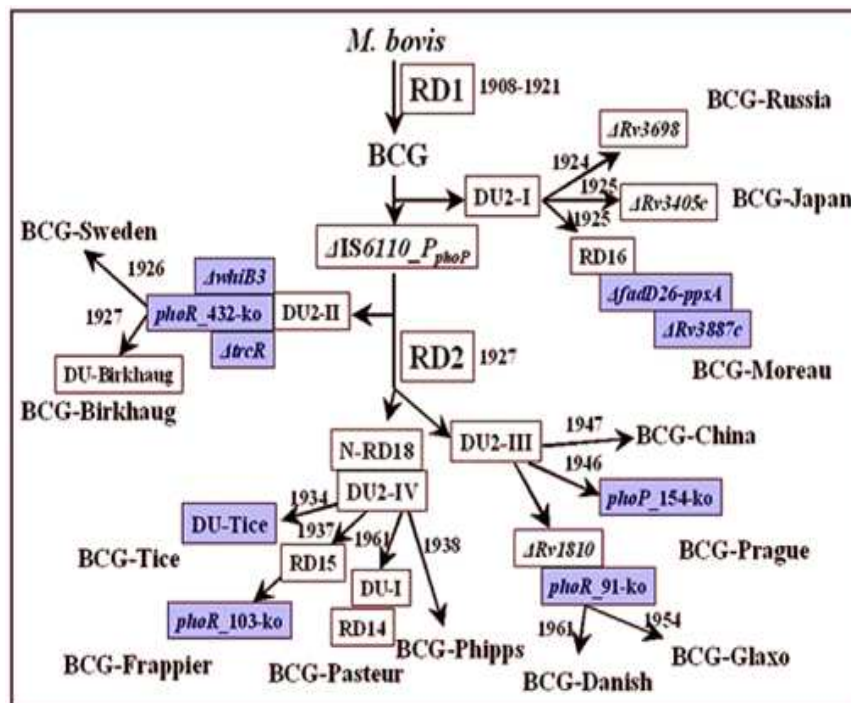


Figura 1.8 - Genealogia da vacina BCG (Liu et al. 2009).

Os estudos realizados para compreender a diversidade genética das subcepas do BCG são fundamentais para a monitoração da identidade e estabilidade genética durante a produção da vacina. Os trabalhos realizados para avaliar o nível proteômico da BCG também têm contribuído para a caracterização fenotípica de seus produtos durante a produção da vacina (Rodriguez-Alvarez et al. 2009).

Desde 1974, a vacinação pela BCG tem sido incluída no Programa de Imunização Estendida (EPI) da OMS, com mais de 3 bilhões de doses administradas mundialmente e 100 milhões de recém nascidos imunizados com o BCG a cada ano (Guerrero et al. 2010).

A vacinação pela BCG confere proteção contra as formas mais severas da doença na infância, como a TB miliar e a meningite sendo eficaz na redução da incidência em áreas endêmicas. Estudo de metanálise tem demonstrado efeito protetor maior que 80% com diminuição ao longo do tempo, resultando em eficácia altamente variável que parece insuficiente para o controle da TB pulmonar em adultos (Skeiky et al. 2010).

A Fundação Ataulpho de Paiva (FAP) produz comercialmente na cidade do Rio de Janeiro o BCG brasileiro, considerado um dos mais imunogênicos e com menor incidência de efeitos adversos, sendo também a fabricante exclusiva e proprietária de todos os lotes sementes do BCG Moreau RDJ. Além disto, foi lançado no mercado em 2005 o Imuno BCG, que é utilizado como tratamento de escolha para o câncer superficial de bexiga.

1.3 - Controle de Qualidade

O Controle de Qualidade (CQ) pode ser definido como um conjunto sistemático de análises destinadas a avaliar se um produto cumpre as especificações estabelecidas, visando comprovar a qualidade ao longo do processo fabril até a obtenção do produto final. Desta forma, o CQ estabelece as especificações, padroniza e valida os métodos analíticos, com base em padrões de referência, retém e armazena amostras de lotes aprovados e liberados para possíveis rastreamentos (Brum 2009).

Apesar do método tradicional de produção do BCG ser extremamente simples, aspectos importantes devem ser cuidadosamente analisados e controlados para que se obtenha o produto final de acordo com as especificações de qualidade preconizadas pela OMS (Machado-Tonus 2005).

Os critérios mínimos necessários para a produção e controle de qualidade da vacina BCG liofilizada estão reunidos em uma Série de Requerimentos Técnicos da OMS. O documento apresenta as avaliações imprescindíveis durante o processo de produção e no produto final, com o objetivo de garantir a sua eficácia e segurança. As avaliações presentes no requerimento incluem a quantidade de bacilos viáveis, termoestabilidade, sensibilidade tuberculínica, extensão de reações cutâneas em animais, pesquisa de micobactéria virulenta, identidade de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e esterilidade bacteriana e fúngica (WHO 1987).

1.3.1 - Ensaio de Identidade por PCR Multiplex (PCRm)

Os métodos atuais recomendados pela Farmacopéia Européia (FE) e a OMS para confirmar a identidade da vacina BCG, isto é, as características genéticas e morfológicas, envolvem a observação dos bacilos corados pelo método de ZN e pela determinação das características das colônias crescidas em meio sólido (Donikian et al. 1987; European Pharmacopoeia Commission 2008). O método de ZN é um procedimento barato, que se baseia na coloração a quente com fucsina fenicada, seguida de descoloramento com álcool-ácido, fazendo com que somente as micobactérias mantenham a coloração vermelha, por serem ácido-resistentes. A determinação das características das colônias de BCG é realizada em meio sólido, onde em aproximadamente 4 a 5 semanas é observada a homogeneidade das colônias (Zimmer et al. 1999).

Os métodos de coloração e cultura em meio sólido, não conseguem discriminar as diversas subcepas de BCG, assim como diferenciá-las de outros membros do complexo *M. tuberculosis*. O uso de técnicas empregando ácidos nucleicos foi introduzido como método alternativo de controle de qualidade para as subcepas de BCG na fabricação da vacina. Entretanto, para o uso como um teste de rotina, esse método deve ser barato, específico, rápido, reprodutível, usar a menor quantidade de equipamentos e ser robusto.

O método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) proposto por Kary Mullis em 1987. O PCR tem sido aplicado como uma alternativa para os testes de controle de qualidade e algumas metodologias tem sido desenvolvidas para a identificação das cepas de micobactérias, dentre elas a PCR multiplex (PCRm), desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo em uma mesma amostra (Del Portillo et al. 1996; Talbot et al. 1997).

Na tentativa de buscar novos candidatos as cepas BCG Referência (RR), a OMS em estudos colaborativos internacionais tem utilizado o PCRm como teste de identidade desenvolvido pela primeira vez, no Reino Unido, pelo Instituto Nacional de Padrões e Controle Biológicos (*National Institute for Biological Standards and Control* - NIBSC). O estudo avaliou a adequação do PCRm como um possível ensaio de rotina para determinar a identidade de diferentes subcepas da vacina BCG (Markey et al. 2010; Bedwell et al. 2001).

Segundo Talbot et al. (1997), o uso da PCR baseada na deleção de regiões, como a região de diferença 1 (RD1), região gênica presente apenas em micobactérias virulentas, mostrou-se eficiente na caracterização destas micobactérias na vacina BCG.

Uma outra PCR avaliou as regiões intergênicas, como o *senX3-regX3*. Este duplo componente gênico está relacionado com as micobactérias e tem sido usado para diferenciar a cepa BCG em três grupos de acordo com o tamanho do fragmento (Magdalena et al. 1998).

O sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* possibilitou, após análise comparativa por microarranjo com a vacina BCG, a identificação de 16 regiões (RD1 a RD16) que variam entre as subcepas do BCG (Cole et al. 1998). A identidade da vacina BCG está intimamente relacionada com a presença ou ausência dessas regiões gênicas. A perda da RD1 ocorreu em todas as cepas de BCG durante a atenuação inicial (1921 a 1928). As regiões RD2 e RD14 foram perdidas no Instituto Pasteur, de 1927 a 1931 e entre 1938 e 1961, respectivamente. Outras perdas como a da RD8 ocorreram em Montreal entre 1937 e 1948 e da RD16, no Brasil, após 1925 (Bedwell et al. 2001).

No trabalho realizado por Bedwell et al. (2001), foi estudada a perda das regiões gênicas RD1, RD2, RD8, RD14, RD16 e o sistema *senX3-regX3* para a construção de um PCRm com o objetivo de produzir um novo teste de controle de qualidade para diferenciar as subcepas de BCG e o complexo *M. tuberculosis*. Os resultados obtidos mostraram que todas as subcepas apresentaram como produto da amplificação, após o uso dos oligonucleotídeos ET1, ET2 e ET3, um fragmento de 196 pares de base (pb), indicando a deleção da região RD1. Ao contrário, as cepas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* apresentam 146 pb como produto da amplificação, indicando a presença da região RD1. A região RD2, produto de 315 pb, foi observada nas subcepas Moreau, Russo, Japão e Birkhaug. A região RD8, com produto de 472 pb, esteve presente nas subcepas Moreau, Russo, Japão, Tice, Glaxo, Pasteur e Birkhaug. Um fragmento de 252 pb, correspondente à região RD14, foi observado nas subcepas Moreau, Russo, Japão, Connaught, Tice, Glaxo e Birkhaug. A região RD16, com produto de 401 pb, estava presente em todas as subcepas avaliadas, exceto na Japão com um produto de 379 pb. As regiões *senX3-regX3* apresentaram três diferentes produtos com as subcepas avaliadas:

Japão, Glaxo e Birkhaug apresentaram um produto de 353 pb, Russo, Moreau, Tice e Pasteur um produto de 276 pb, enquanto a Connaught apresentou um produto de 199 pb. Com os resultados obtidos foi mostrado que a PCRm é um método importante para a avaliação da identidade da vacina, capaz de diferenciar as várias subcepas de BCG e identificar os diferentes membros do complexo *M. tuberculosis*, bem como, atende aos critérios exigidos pela OMS, apresentando especificidade, rapidez, reprodutibilidade e portabilidade.

1.3.2 - Ensaio para a Determinação de Viabilidade

Em 1965, a OMS realizou o Primeiro Encontro Internacional sobre Reagentes de Referência (RR) para a vacina BCG, porém esses RR não se encontram mais disponíveis para a distribuição. A ausência desses materiais foi devido à perda de estoques da vacina BCG liofilizada e a diminuição de sua viabilidade ao longo dos anos. Com base em pareceres de peritos internacionais obtidos em três reuniões de consulta da OMS sobre a vacina BCG, existe uma demanda para a substituição dos primeiros RR da OMS para melhorar a qualidade da vacina BCG (Corbel et al. 2004; Ho et al. 2005; Knezevic & Corbel 2006).

As três subcepas de BCG escolhidas pela OMS foram Dinamarquesa 1331, BCG-I Russo e Tóquio 172-1. Esta escolha foi baseada na ampla administração mundial destas vacinas e certificação dos seus produtores em relação às Boas Práticas de Fabricação (BPF). A subcepa Moreau que também apresenta os critérios exigidos pela OMS não foi incluída neste estudo inicial.

Um estudo de colaboração internacional utilizando ensaios distintos de viabilidade foi realizado para avaliar a qualidade desses três candidatos a RR. O objetivo desse estudo foi determinar a viabilidade das três subcepas da vacina BCG, por meio dos ensaios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e adenosina trifosfato (ATP), além da adequação destas subcepas como candidatas a RR para a utilização em ensaios de viabilidade (Ho et al. 2011).

A vacina BCG Moreau RDJ é obtida pela técnica clássica de cultura de BCG na superfície de meio líquido Sauton. Após incubação a 37°C é feita a coleta dos véus, pesagem da massa bacilar, adição do diluente (glutamato de sódio a 2%) e homogeneização. A suspensão final é liberada para o envase e posterior liofilização. A porcentagem de unidades viáveis ou partículas bacterianas cultiváveis é determinada, com uma queda considerável no número de BCG viáveis devido à etapa de liofilização (Bloom & Fine 1994).

A Farmacopeia Brasileira (FB) e a OMS recomendam oficialmente a técnica de contagem de UFC em meio sólido para a determinação da viabilidade e termoestabilidade da vacina BCG. A técnica indicada pela OMS consiste no preparo de diluições da vacina em meio de cultura líquido, inoculação de volumes destas diluições na superfície de meio sólido de sensibilidade comprovada, como Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa, seguida de incubação a 37°C +/- 1°C por quatro a cinco semanas e posterior contagem das unidades de colônias formadas. A FB recomenda apenas a utilização do meio sólido de LJ. O resultado obtido é expresso em UFC por mililitro (UFC/mL) do produto reconstituído conforme orientação do fabricante (WHO 1977; Brasil 2010; Jensen et al. 2008).

A viabilidade da vacina BCG é essencial para a estimulação de respostas imunológicas protetoras nos indivíduos vacinados, portanto a avaliação do controle de qualidade dos bacilos viáveis é fundamental para a sua eficácia. A utilização de RR é importante para que os fabricantes da vacina BCG e os laboratórios de controle de qualidade possam monitorar a consistência dos ensaios de qualidade do produto. Além disso, a vacina BCG é frequentemente utilizada como referência para comparação em ensaios laboratoriais durante o desenvolvimento de novas vacinas contra a tuberculose (McShane 2002; Ho et al. 2008).

O ensaio de UFC é amplamente utilizado como método de quantificação para as vacinas vivas e tem sido utilizado como um substituto dos ensaios de potência da vacina BCG (WHO 1987). A técnica de UFC é lenta, tem baixa reprodutibilidade e alta variabilidade nos resultados dos testes, principais razões para os fabricantes e laboratórios de controle de qualidade buscarem novas alternativas (Jensen et al. 2008).

A OMS tem realizado, desde 1999, revisões dos requerimentos de qualidade da vacina BCG em vigor visando à atualização de metodologias e padrões empregados no controle, conforme abordado em recentes encontros com especialistas da vacina BCG. Essas reuniões de colaboração internacional têm buscado métodos alternativos que ofereçam maior precisão para avaliar a viabilidade e termoestabilidade da vacina BCG. Dentre esses métodos encontra-se o ensaio de bioluminescência (ATP modificado), que tem sido estudado para a determinação da viabilidade dos bacilos contidos na vacina. (WHO 2005; WHO 2010; Knezevic & Corbel 2006).

1.3.3 - Ensaio de Bioluminescência

A bioluminescência, um tipo especial de quimioluminescência, é um processo bioquímico, com atividade biológica, catalisada por enzimas, resultante de oxidações

altamente exergônicas nas quais a energia é liberada por todas as células vivas preferencialmente sob a forma de luz fria e visível. Esse fenômeno ocorre entre as bactérias, algas, fungos, celenterados, artrópodes, moluscos, anelídeos, equinodermas e peixes (Herring 1987; Lee 1989; Lundin 2000).

A reação de bioluminescência envolve a oxidação de compostos conhecidos por luciferinas, catalisadas por enzimas denominadas luciferases, oxigenases especiais potencializadas para a emissão de luz (Wilson & Hastings 1998). Com a oxigenação das luciferinas, são formados intermediários peroxídicos altamente instáveis e ricos em energia, cuja clivagem térmica gera produtos carbonílicos, um dos quais no estado *singlete* (espécie eletronicamente excitada da molécula de oxigênio molecular) que se desativa emitindo fluorescência (Wilson 1996).

Os rendimentos quânticos (número de fótons emitidos por molécula de luciferina oxidada) são elevados devido aos sítios ativos das luciferases que catalisam a oxidação das luciferinas e fornecem microambientes altamente protetores para o produto excitado, evitando que este se desative por outros processos não radiativos. (Timmins et al. 2000).

A primeira purificação de luciferina e luciferase de vagalumes ocorreu no ano de 1950 e a partir desse momento inúmeras aplicações envolvendo a quantificação de ATP para fins clínicos e analíticos surgiram. Dentre elas a monitorização de biomassa (Schram et al. 1989), avaliação da contaminação microbiológica de águas, fluídos biológicos, alimentos e bebidas (Lundin et al. 2000), avaliação da viabilidade celular, ensaio de atividades enzimáticas com o consumo ou formação de ATP, além de ensaios de citotoxicidade (Comhaire et al. 1989).

A luciferase catalisa a oxidação da luciferina ativada por Mg^{+}/ATP com duas funções: a primeira atuando como adenil-transferase, modificando a luciferina a partir de ATP e liberando pirofosfato (Figura 1.9), sendo semelhante à reação de ativação de ácidos graxos e outros ácidos carboxílicos aromáticos catalizado pelas acil-CoA-sintetases (De Luca & McElroy 1974; Baker et al. 1992), com as quais compartilham elevado grau de homologia (Wood 1995). Em seguida, a luciferase atuando como oxigenase removendo o próton do carbono alfa, a carbonila, tornando-o suscetível ao ataque por oxigênio molecular, com a produção do intermediário dioxetanônico, cuja clivagem produz dióxido de carbono e oxiluciferina excitada. (Wannalund et al. 1978; Barrichello & Allil 1997).

Devido a essas características o *Statens Serum Institut* (SSI), na Dinamarca, desenvolveu um ensaio de ATP modificado como um método alternativo e rápido para avaliar a viabilidade da vacina BCG liofilizada. Este ensaio de ATP modificado, inclui uma etapa de incubação da vacina BCG reconstituída em meio de cultura durante a noite (Jensen et al.

2008). O método para quantificar o ATP presente na vacina BCG é baseado na reação da luciferase com o ATP que resulta na produção de bioluminescência (Lundin 2000). A intensidade da emissão de luz, medida segundo unidades relativas de luz (URL), é diretamente proporcional à quantidade de ATP presente na amostra que pode ser estimada pelo uso de padrões de ATP para a calibração.

Um estudo colaborativo iniciado pela OMS com a participação de diferentes laboratórios mostrou que o ensaio de ATP modificado para avaliar a viabilidade da vacina BCG pode ser considerado robusto, reprodutível e portátil. O novo ensaio mostrou-se capaz de detectar diferenças significativas na viabilidade nas amostras de BCG liofilizados quando estocados em condições abaixo de -20°C ou a 37°C por quatro semanas (Ho et al. 2008).

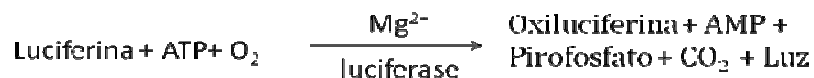


Figura 1.9 - Esquema da formação de luz pela reação entre ATP e o complexo enzimático luciferina/luciferase. A reação utilizando a luciferase catalisa a oxidação da luciferina por oxigênio, ativada por Mg^+/ATP , a reação ocorre em duas etapas pela oxidação da luciferina em oxiluciferina e emissão de luz a 560 nm.

O presente trabalho faz parte de um estudo multicêntrico internacional coordenado pela OMS em andamento desde 2004, envolvendo outras três cepas vacinais certificadas (1331 Dinamarquês, Russo BCG-I e Tóquio 172-1). As preparações da vacina BCG foram enviadas para 11 laboratórios participantes de nove países. Estes incluem sete fabricantes da vacina BCG, dentre eles a FAP (Brasil) e quatro laboratórios internacionais de referência. Todos os laboratórios se comprometeram a realizar as contagens de cultura viáveis e ensaios de ATP modificado para a avaliação da viabilidade da vacina. Para os ensaios de PCRm a OMS selecionou oito laboratórios de quatro fabricantes, dentre eles a FAP (Brasil) e quatro laboratórios internacionais de referência.

Esses estudos colaborativos visam à uniformização de novas metodologias de Controle de Qualidade cuja normatização deverá ocorrer após a análise dos resultados por comitês da OMS e, conseqüentemente, a melhoria das vacinas BCGs e de outras vacinas em desenvolvimento, contra a tuberculose, que tenham como matriz micobactérias.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Atualização do controle de qualidade da vacina BCG Moreau RDJ por meio do uso de duas novas metodologias, identificação genômica da vacina por PCR multiplex e avaliação da viabilidade por bioluminescência de acordo com as novas normas preconizadas pela OMS.

2.2 - Objetivos Específicos

- Adequar o processo de CQ da vacina BCG Moreau RDJ às novas normas da OMS;
- Avaliar o número de ampolas de vacina necessário à extração de ácidos nucleicos;
- Eleger e padronizar o melhor método de extração de DNA bacteriano;
- Padronizar o ensaio de PCR multiplex;
- Padronizar o ensaio de bioluminescência utilizando o kit comercial;
- Correlacionar a quantidade obtida de URL por seu UFC equivalente;
- Garantir o padrão internacional de CQ da vacina visando a pré-qualificação pela OMS;

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica (LIC) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) e no Laboratório de Controle de Qualidade da FAP.

3.1 - Amostras de Vacina

As amostras de vacina BCG liofilizada utilizadas neste estudo foram preparadas com a subcepa Moreau RDJ fornecida e certificada pela FAP. A vacina BCG é apresentada em ampola âmbar contendo 1mg de BCG liofilizado, correspondendo a 10 doses. As ampolas utilizadas no presente estudo foram produzidas entre janeiro e dezembro de 2011.

3.2 - Vacina de Referência

A vacina de referência utilizada para a realização deste trabalho é a BRABCG003, também preparada com o BCG Moreau RDJ. Produzida pela OMS e certificada pela FAP.

3.3 - Protocolos de extração de DNA da vacina BCG

Foram utilizadas três metodologias para a extração do DNA genômico das ampolas da vacina BCG Moreau RDJ (Tabela 3.1). A primeira com o kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante. A segunda com a técnica de choque térmico (Fuverki et al. 2008), que consistiu em três ciclos de 30 minutos a 94° C e 30 minutos a -20°C para inativação do agente e liberação do material genético. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf modelo 5410) por 1 minuto, os sobrenadantes transferidos para novos tubos e mantidos a -20 °C até o momento da análise. A terceira metodologia envolveu a utilização do choque térmico seguido do kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®).

Tabela 3.1 - Metodologia de extração de DNA das ampolas de BCG.

Metodologia	n° de ampolas
CT	1
CT	2
CT	4
CTK	1
CTK	2
CTK	4
K	1
K	2
K	4

CT = choque térmico; CTK = choque térmico+kit comercial; K = kit comercial

3.4 - Quantificação de DNA da vacina BCG

A quantificação do DNA extraído foi realizado utilizando o reagente dsDNA BR (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e o espectrofotômetro Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) seguindo as recomendações do fabricante para a dosagem de DNA em baixas concentrações (Figura 3.1).

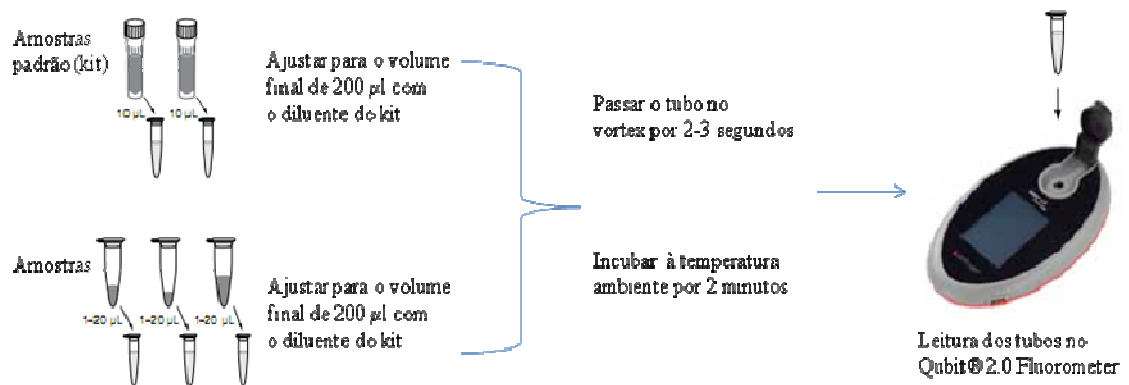


Figura 3.1- Esquema do ensaio de dosagem de DNA utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA).

3.5 - Volume de DNA utilizado para a amplificação

Foram utilizados 5 µL de DNA com os produtos resultantes das três diferentes condições de extração e concentrações das ampolas de BCG.

3.6 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação das sequências-alvo foi realizada conforme descrito por Markey e colaboradores (2010).

3.6.1 - PCR multiplex (PCRm)

Seguindo a metodologia de Bedwell et al. (2001), o ensaio foi realizado com as alíquotas dos 13 oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA) utilizados na PCRm. Todas as amostras e demais insumos foram armazenados a -20°C até o momento de realização do teste. Os genes alvos selecionados para a realização deste trabalho estão indicados na Tabela 3.2, juntamente com as sequências dos respectivos oligonucleotídeos iniciadores.

Os métodos de extração de DNA e purificação do DNA das ampolas de BCG Moreau RDJ foram realizados seguindo as metodologias já descritas. Após a extração do material genético foram realizados os ensaios de PCRm com diluições de 1:10. O protocolo para o método PCRm utilizou um volume de 50 μL com 5 μL de DNA e 45 μl do *mix* (1 x PCR buffer, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP mix (0,2 mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 0,4 mM de todos os oligonucleotídeos iniciadores, exceto ET1 e ET3 que foram utilizados na concentração de 0,2 mM cada e 1,5 U DNA Taq DNA polimerase).

Tabela 3.2 - Alvos genéticos e Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR multiplex.

Nome dos iniciadores e alvos genéticos*	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Local de início dos iniciadores	Número de acesso da sequência
Região de diferenças 1			
ET1	AAGCGGTTGCCCGCCGACCGACC	2230	U34848
ET2	CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG	11785	U34848
ET3	GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG	11930	U34848
Região de diferenças 2			
RD2l	CCAGATTCAAATGTCCGACC	10827	U34849
RD2r	GTGTCATAGGTGATTGGCTT	11141	U34849
Região de diferenças 8			
RD8l	ACTCCTAGCTTTGCTGTGCGCT	16687	BX842573
RD8r	GTACTGCGGGATTTGCAGGTTC	17158	BX842573
Região de diferenças 14			
RD14l	CAGGGTTGAAGGAATGCGTGTC	32258	BX248340
RD14r	CTGGTACACCTGGGGAATCTGG	32509	BX248340
Região de diferenças 16			
RD16l	ATCGTTCACGGACAGCCGTAGT	12378	BX842582
RD16r	CTCGATCCAAGGTCAACCACG	12778	BX842582
<i>senX3-regX3</i>			
C3	GCGCGAGAGCCCGAACTGC	1469	Y13627
C5	GCGCAGCAGAAACGTCAGC	1744	Y13627

* Oligonucleotídeos iniciadores esquerdos são denominados por l e oligonucleotídeos iniciadores direitos por r.

3.6.2 - Programação para a amplificação de DNA pela PCR

A amplificação das sequências-alvo foi realizada utilizando o termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 2400. O perfil térmico utilizou um ciclo de 94° C (10 minutos), 30 ciclos a 94° C (1 minuto), 55° C (1 minuto) e 72° C (2 minutos) e um ciclo de 72° C (10 minutos), como demonstrado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Programa utilizado para PCR.

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	10 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	30
Anelamento	55°C	1 min	
Extensão	72°C	2 min	
Extensão	72°C	10 min	1

3.6.3 - Análises do produto amplificado – Eletroforese em gel de agarose

Após a PCR, 10µl dos produtos amplificados foram analisados em eletroforese horizontal de agarose a 3% (m/v), utilizando como tampão o Tris-Borato EDTA, pH 8.0, 1X concentrado, acrescido de 5 µL/100mL da solução de brometo de etídio a 5µg/µL. A separação eletroforética foi realizada a 80V durante 3 horas (Sambrook 1989), visualizada em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com um sistema de documentação Kodak (Gel Logic 100 Imaging System), utilizando o software *Kodak molecular imaging software* 4.0.0. Os marcadores de DNA utilizados foram 50bp e 100pb (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA).

3.7 - Ensaio de viabilidade

Para a avaliação da viabilidade de amostras de vacinas *M. bovis* BCG Moreau RDJ produzidas e comercializadas pela FAP foram utilizados dois métodos: UFC e o de ensaio de bioluminescência.

3.7.1 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

A técnica de UFC (método tradicional) foi realizada a partir de diluições das amostras (vacina comercial), seguida do plaqueamento em meio sólido Lowenstein-Jensen (LJ). As placas são mantidas a 37 ± 1 °C por um período de 20-30 dias. Após este período, as colônias são contadas e o resultado dado em UFC/mL.

3.7.1.1 - Meios de cultura utilizados

O meio líquido Sauton $\frac{1}{4}$ foi o escolhido para a diluição das amostras reconstituídas de vacinas. A composição e o modo de preparo encontram-se descritos no anexo A.

O meio sólido de LJ foi utilizado como substrato para o cultivo de unidades viáveis presentes nos volumes inoculados de cada diluição da vacina. Ele foi preparado a partir de base comercial Merck®, acrescida de glicerol e de suspensão de ovos batidos, distribuído em volumes de 15 mL em tubos de ensaio 25 x 200 mm providos de rolhas de gaze e coagulados por 45 minutos a 85°C. A composição e os detalhes referentes ao preparo do meio LJ encontram-se descritos no anexo A.

3.7.1.2 - Desenho do ensaio

- 1º) Os tubos com meio LJ utilizados em cada ensaio foram preparados em um único procedimento de preparo de meio, para pertencer a um mesmo lote;
- 2º) As amostras de cada ampola de vacina BCG foram reconstituídas com 1mL do diluente (cloreto de sódio 0,9%) da própria vacina, homogeneizando até que a suspensão apresentasse aspecto homogêneo;
- 3º) A diluição das amostras foi realizada com três diluições de cada uma das vacinas utilizando o fator dois de diluição (Tabela 3.4). O meio Sauton $\frac{1}{4}$ foi distribuído em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, por meio de dispensador automático para volumes de 99 mL e em tubos de 18x180mm, por meio de pipetas sorológicas de 5 mL e 10 mL;

Tabela 3.4 - Procedimento para o preparo das diluições.

Diluição	Procedimento
1/100	1 mL da vacina reconstituída + 99 mL de Sauton $\frac{1}{4}$
1/10000	1 mL da diluição 1/100 + 99 mL de Sauton $\frac{1}{4}$
1/20000	4 mL da diluição 1/10000 + 4 mL de Sauton $\frac{1}{4}$
1/40000	2 mL da diluição 1/10000 + 6 mL de Sauton $\frac{1}{4}$
1/80000	2 mL da diluição 1/10000 + 14 mL de Sauton $\frac{1}{4}$

4º) Para inoculação de cada amostra de vacina foram utilizados 20 tubos contendo meio LJ, onde as duas primeiras diluições foram inoculadas em cinco tubos cada uma e a terceira em dez tubos;

5º) Um volume de 100µL das diluições foi inoculado em cada tubo contendo meio LJ. O volume do inoculo foi distribuído uniformemente por toda a superfície do meio, sendo os tubos mantidos na posição horizontal e ao abrigo da luz, ligeiramente inclinados, com a base inoculada direcionada para cima, durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Os tubos foram colocados na posição vertical, vedados com rolhas de silicone parafinadas e aquecidas em chama e, posteriormente, incubados a 37 ± 1 °C ao abrigo da luz durante 4 semanas;

6º) A contagem das colônias é realizada com o auxílio de lente de aumento, avaliando-se o aspecto rugoso, espreado e esbranquiçado (ausência de pigmentação). As contagens superiores a 100 colônias devem ser excluídas. Os cálculos e detalhes do teste de UFC encontram-se no anexo A

3.7.2 - Ensaio de Bioluminescência

3.7.2.1 - Preparo das amostras

As ampolas da vacina BCG foram reconstituídas com 1 mL de meio de cultura Sauton $\frac{1}{4}$ e transferidas para tubos estéreis de 2 mL. As suspensões foram incubadas a 37 °C por 22-26 horas e a viabilidade das amostras avaliada por ensaio de bioluminescência.

Em seguida as amostras foram distribuídas em placas brancas OptiPlate™-96 (Perkin Elmer, USA), conforme o esquema da Figura 3.2, adicionando os reagentes do kit comercial e após a incubação por 15 minutos a luminescência (URL) foi determinada no luminômetro Victor™ X3 (Perkin Elmer, USA). A técnica de bioluminescência permite a avaliação de 8 lotes em uma mesma placa, proporcionando maior rapidez e menor custo para a avaliação dos lotes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Branco
B	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Branco
C	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4
D	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4
E	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4
F	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4
G	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4
H	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4	Puro	1:2	1:4

Figura 3.2 - Esquema da organização das amostras (lotes) para identificação e posterior leitura. Cada padrão de cor determina a posição da curva (verde), o branco (branco) e os lotes (demais cores) nas diluições puro, 1:2 e 1:4.

A concentração de pmol/ampola foi determinada após a multiplicação do valor obtido em 100µL por 50, pois foi utilizado 20µL na reação e a ampola foi constituída com 1mL de Sauton ¼. A concentração em ng/ampola foi determinada a partir do peso molecular do ATP utilizado no kit, por regra de três simples.

3.7.2.2 - Preparo da reação de Bioluminescência

Na realização do ensaio de bioluminescência utilizou-se o kit ATP Determination (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA). Este kit determina quantitativamente o ATP produzido durante o metabolismo celular, utilizando a enzima recombinante *firefly luciferase* e o substrato D-luciferina. O ATP age como cofator para a reação enzimática e consequente liberação de luz.

A reação foi realizada com 1,25 mg/mL da enzima recombinante *firefly luciferase*, 50 mM de D-luciferina e 1 mM de ditiotreitól (DTT) em tampão de reação 1X e 20µL da amostra preparada no item 3.7.2.1. Após a incubação por 15 minutos a luminescência foi

determinada no luminômetro Victor™ X3 (Perkin Elmer, USA) e os dados analisados com o programa Workout2.5.

3.8 - Análise estatística

Para a contagem de culturas viáveis de micobactérias os resultados foram convertidos em UFC/ampola e a média estimada para cada ampola foi determinada após a exclusão dos valores extremos utilizando um programa *in-house* (Gaines & Rice, 1985). A média UFC/ampola de cada um dos lotes utilizados neste estudo foi calculada a partir das estimativas de médias de contagens de colônias de cada diluição seguindo o guia de recomendações da OMS (WHO/TB/Technical Guide/77.9), apresentado no Anexo A.

Para os ensaios de ATP, as curvas foram geradas por regressão linear log10 partindo da concentração log10 do padrão de ATP. Os lotes analisados tiveram os seus valores de ATP (URL) transformados em pmol/100uL para ajuste das linhas de regressão linear seguidos de conversão para ng / ampola.

O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis. Esta ferramenta estatística foi utilizada para a observação das variáveis URL (x) e UFC (y) e para avaliação de correlação linear positiva, negativa ou nula dos dados obtidos.

O coeficiente de correlação de Pearson é normalmente representado pela letra **r** e a sua fórmula de cálculo é:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum (x_i - \bar{x})^2)(\sum (y_i - \bar{y})^2)}}$$

4 - RESULTADOS

4.1 - Padronização da extração e quantificação de DNA da vacina BCG

Para a observação e padronização da melhor metodologia de extração de DNA das ampolas da vacina BCG foram utilizados três lotes submetidos a três diferentes metodologias de extração, com a utilização de 1, 2 e 4 ampolas. A quantificação do DNA (ng/μL) foi realizada utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA). A Tabela 4.1 mostra o resultado do ensaio.

Tabela 4.1 - Dosagem de DNA utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA) para verificar as concentrações de DNA extraído em diferentes metodologias de extração.

Lotes	Metodologia	n° de ampolas	Concentração de DNA (ng/μL)
108004	CT	1	1,02
	CT	2	2,49
	CT	4	3,81
	CTK	1	3,93
	CTK	2	7,93
	CTK	4	9,99
	K	1	1,99
	K	2	4,88
	K	4	8,73
109007	CT	1	3,41
	CT	2	5,43
	CT	4	7,88
	CTK	1	5,22
	CTK	2	11,11
	CTK	4	20,3
	K	1	6,55
	K	2	9,07
	K	4	19,01
RHO/2010	CT	1	3,33
	CT	2	6,93
	CT	4	8,40
	CTK	1	4,42
	CTK	2	12,11
	CTK	4	21,72
	K	1	12,01
	K	2	16,50
	K	4	20,81

CT = choque térmico; CTK = choque térmico+kit comercial; K = kit comercial

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.1 quando se usa apenas a metodologia de choque térmico, o rendimento de DNA extraído (concentração) é menor nos três lotes avaliados. A combinação de choque térmico com o kit comercial apresentou um pequeno aumento nos resultados de DNA extraído, porém para a realização deste processo foi dispendido mais tempo e uma quantidade aumentada de material de consumo. O uso isolado do kit comercial proporcionou resultados semelhantes de DNA extraído quando comparado às técnicas combinadas.

4.2 - Amplificação dos alvos genéticos por PCR multiplex

A PCRm foi realizada utilizando treze oligonucleotídeos iniciadores contra seis diferentes alvos. Os fragmentos (pb) obtidos da amplificação do DNA extraído do BCG Moreau e seus produtos podem ser observados na Tabela 4.2.

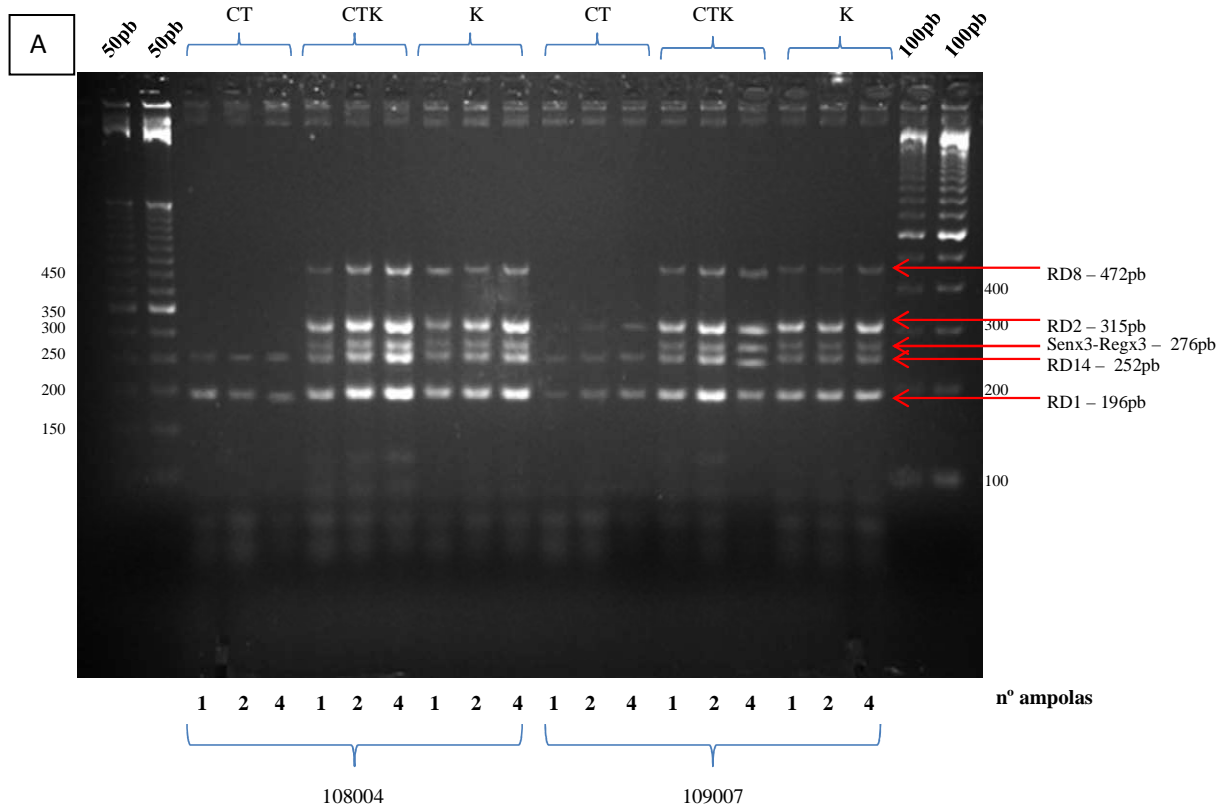
Tabela 4.2 - Alvos genéticos e fragmentos (pb) esperados da reação de PCRm com a subcepa BCG Moreau RDJ.

Alvos genéticos	Fragmentos (pb)
RD8	472
RD2	315
<i>senX3-regX3</i>	276
RD14	252
RD1	196

O ensaio de PCRm utilizando os seis diferentes alvos amplificou cinco regiões que são características do BCG Moreau RD8(472 pb), RD2(315 pb), *senX3-regX3*(276 pb), RD14(252 pb) e RD1(196 pb). O fragmento RD16 (401 pb), não está presente no BCG Moreau. Este fragmento faz parte de outros BCG como a subcepa Dinamarquesa 1331, Tóquio 172-1, BCG-I Russo e Glaxo.

4.2.1 - Eletroforese em gel de agarose a 3%

A eletroforese em gel de agarose a 3% mostra o produto da amplificação das amostras submetidas a diferentes metodologias de extração e concentrações. Na Figura 4.1 podem ser evidenciados os cinco fragmentos amplificados, RD8(472 pb), RD2(315 pb), senx3-regx3(276 pb), RD15(252 pb) e RD1(196 pb), presentes no BCG Moreau.



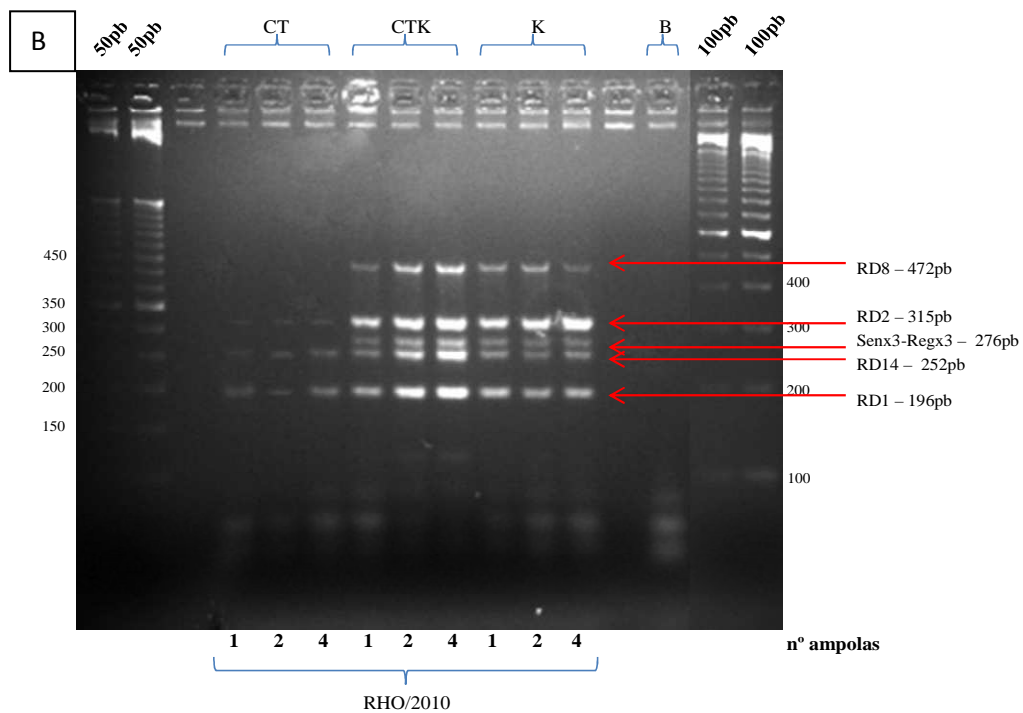


Figura 4.1 - Padrão de amplificação das amostras por PCR multiplex (A e B). Eletroforese em gel de agarose a 3% das amostras de BCG em diferentes concentrações e submetidos a diferentes metodologias de extração. Branco (B), choque térmico (CT), choque térmico e kit (CTK), kit (K), ampolas (1,2 e 4) e os marcadores de DNA 50pb e 100pb (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA).

Após a eletroforese do material obtido por choque térmico e amplificado por PCRm apenas alguns fragmentos de DNA puderam ser observados. O lote 108004 possibilitou a amplificação das regiões RD14 (252 pb) e RD1 (196 pb) utilizando 1, 2 ou 4 ampolas. O uso das demais metodologias possibilitou a amplificação das cinco regiões alvo. Uma condição semelhante pode ser observada nos lotes 109007 e RHO/2010 nos quais a região RD2 (315 pb) foi amplificada. As metodologias utilizando a combinação choque térmico e kit comercial ou apenas o kit comercial permitiram amplificar satisfatoriamente as cinco regiões esperadas.

4.2.2 - Avaliação da extração e quantificação de DNA da vacina BCG

Após a padronização do ensaio de extração e dosagem de DNA foi realizada a avaliação de 10 lotes da vacina BCG para a observação da reprodutibilidade do método. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Dosagem de DNA utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA) para verificar as concentrações de DNA extraído pelo Kit comercial.

Lotes		nº de ampolas	Concentração de DNA (ng/µL)
109014	}	2	4,51
		4	9,55
109009	}	2	4,57
		4	8,89
108003	}	2	6,81
		4	9,8
111050	}	2	4,72
		4	8,7
110039	}	2	5,2
		4	10,11
110042	}	2	5,17
		4	10,7
109008	}	2	7,2
		4	10,92
108006	}	2	8,2
		4	12,39
012182	}	2	6,93
		4	12,3
108002	}	2	7,53
		4	13,91
009083	}	2	10,5
		4	18,6

A metodologia utilizando apenas o kit comercial foi a escolhida para a avaliação dos 10 lotes da vacina BCG, por sua praticidade e baixo tempo de execução. Ampolas em número de 2 e 4 foram usadas para a realização do ensaio com o objetivo de aumentar a probabilidade de amplificação de todas as regiões de DNA esperadas da vacina BCG Moreau RDJ. Os resultados encontrados de DNA extraído foram satisfatórios para todos os lotes analisados.

Para a observação do produto de amplificação do DNA extraído foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 3% . A Figura 4.2 mostra os cinco fragmentos, RD8(472 pb), RD2(315 pb), senx3-regx3(276 pb), RD15(252 pb) e RD1(196 pb) presentes no BCG Moreau. A amostra do lote 108003 (4 ampolas) apresentou problemas de estocagem, não amplificando as cinco regiões esperadas. Os demais lotes independente do número de ampolas utilizadas apresentaram resultados expressivos e satisfatórios. Os resultados obtidos no ensaio de PCRm mostram que a vacina BCG Moreau RDJ manteve a sua identidade nos lotes testados neste trabalho.

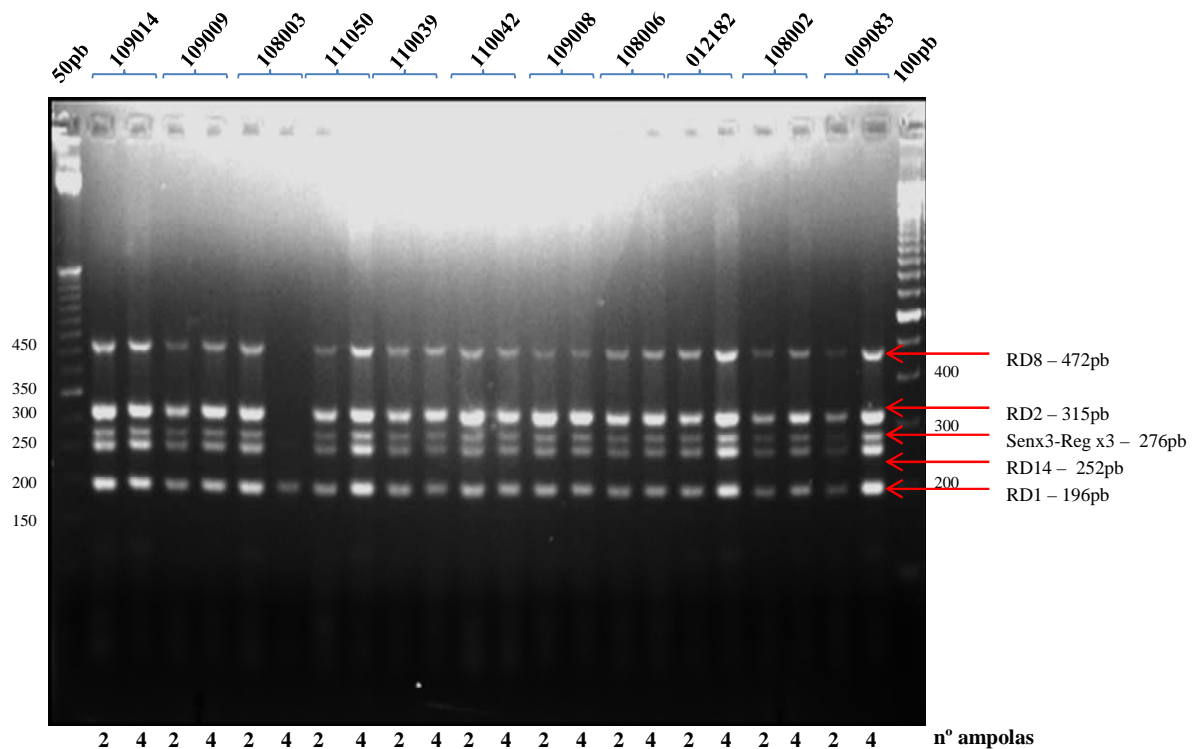


Figura 4.2 - Amplificação das amostras por PCR multiplex dos 10 lotes de ampolas da vacina BCG. Eletroforese em gel de agarose a 3% das amostras de BCG, utilizando as concentrações de 2 e 4 ampolas submetidas ao kit comercial de extração. Os marcadores de DNA utilizados foram 50pb e 100pb (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA).

4.3 - Ensaio de Bioluminescência

4.3.1 - Curva Padrão

Para o ensaio de bioluminescência foi utilizado o kit ATP Determination (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA). Antes da avaliação das amostras da vacina BCG foi feito um ensaio de análise da curva padrão (Figura 4.3). Os resultados obtidos possibilitaram estabelecer o grau de detecção dos reagentes do kit comercial e o seu coeficiente de determinação.

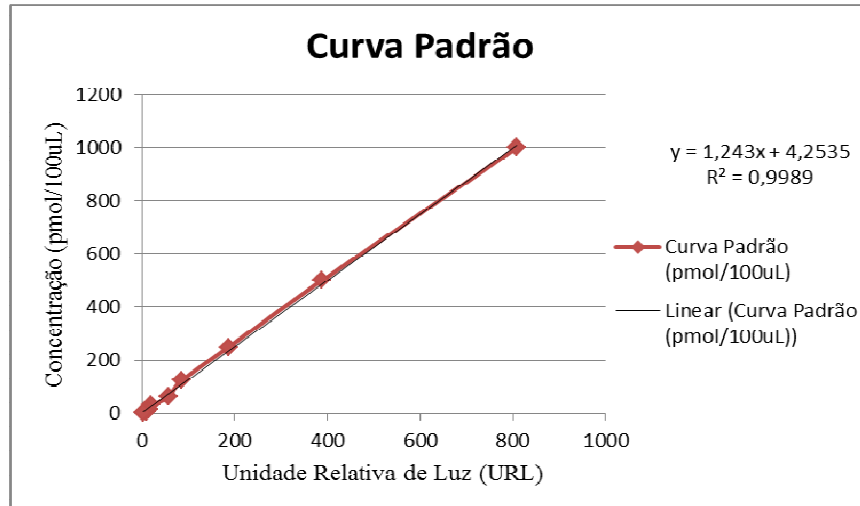


Figura 4.3 - Ensaio de padronização da reta de regressão em relação à concentração de ATP (pmol/100µL) e a Unidade Relativa de Luz (URL) para o lote RHO/2010 da vacina BCG. x = concentração (pmol/100µL) conhecida ou teórica da vacina. y = Fórmula de determinação da concentração de ATP (pmol/100µL) a partir da URL. R^2 = coeficiente de determinação.

Os resultados permitiram determinar a relação provável da URL pela concentração (pmol/100uL) na amostra padrão do kit comercial, além da variação da curva.

4.3.2 - Avaliação das amostras pelo ensaio de bioluminescência

Após a avaliação de 10 lotes da vacina BCG pelo ensaio de bioluminescência foi possível construir tabelas com os resultados individuais de URL de cada lote. A partir desses dados foi utilizada a fórmula de determinação da concentração de ATP (y) para calcular os valores em pmol/100µL. Os maiores e menores resultados obtidos das 5 ampolas de cada lote foram descartados e a média e o desvio padrão das ampolas foi determinado. As tabelas (4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14) mostram a avaliação de cada lote individualmente.

Tabela 4.4 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 110042).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	76	76				
	1:2	32	64	96	123,58	6179	3542
	1:4	37	148				
2	Puro	76	59				
	1:2	28	56	64	83,39	4170	2390
	1:4	19	76				
3	Puro	62	62				
	1:2	23	46	128	163,35	8168	4681
	1:4	69	276				
4	Puro	73	73				
	1:2	22	44	50	65,98	3299	1891
	1:4	8	32				
5	Puro	55	55				
	1:2	26	52	70	91,67	4584	2627
	1:4	26	104				
Média				77	100	4978	2853
Desvio Padrão				17,07	21,22	1061	608,12

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.5 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109008).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	144	144				
	1:2	87	174	161	204	10198	5845
	1:4	41	164				
2	Puro	144	144				
	1:2	78	156	152	193	9659	5536
	1:4	39	156				
3	Puro	113	113				
	1:2	71	142	138	176	8810	5050
	1:4	40	160				
4	Puro	146	146				
	1:2	57	114	131	167	8334	4776
	1:4	33	132				
5	Puro	150	150				
	1:2	91	182	161	205	10240	5869
	1:4	38	152				
Média				150	191	9556	5477
Desvio Padrão				11,25	13,99	699,78	401,08

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.6 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 108006).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	39	39				
	1:2	44	88	53	70	3507	2010
	1:4	8	32				
2	Puro	37	37				
	1:2	27	54	44	59	2927	1677
	1:4	10	40				
3	Puro	47	47				
	1:2	22	44	48	64	3175	1820
	1:4	13	52				
4	Puro	42	42				
	1:2	16	32	39	53	2657	1523
	1:4	11	44				
5	Puro	43	43				
	1:2	19	38	47	63	3134	1796
	1:4	15	60				
Média				46	62	3078	1764
Desvio Padrão				2,14	2,66	133,18	76,33

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.7 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109014).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	32	32				
	1:2	15	30	35	48	2409	1381
	1:4	11	44				
2	Puro	62	62				
	1:2	20	40	54	71	3569	2045
	1:4	15	60				
3	Puro	63	63				
	1:2	37	74	64	84	4211	2414
	1:4	14	56				
4	Puro	67	67				
	1:2	19	38	64	84	4211	2414
	1:4	22	88				
5	Puro	55	55				
	1:2	28	56	49	65	3258	1867
	1:4	9	36				
Média				56	74	3679	2109
Desvio Padrão				7,81	9,71	485,99	278,55

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.8 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109009).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	76	76				
	1:2	47	94	107	138	6883	3945
	1:4	38	152				
2	Puro	69	69				
	1:2	29	58	65	85	4252	2437
	1:4	17	68				
3	Puro	59	59				
	1:2	33	66	68	89	4460	2556
	1:4	20	80				
4	Puro	79	79				
	1:2	24	48	74	97	4832	2770
	1:4	24	96				
5	Puro	73	73				
	1:2	61	122	110	141	7070	4052
	1:4	34	136				
Média				83	108	5392	3090
Desvio Padrão				21	26,1	1305,15	748,05

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.9 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 110039).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	116	116				
	1:2	54	108	116	148	7422	4254
	1:4	31	124				
2	Puro	101	101				
	1:2	42	84	107	137	6863	3933
	1:4	34	136				
3	Puro	138	138				
	1:2	42	84	114	146	7298	4183
	1:4	30	120				
4	Puro	110	110				
	1:2	58	116	125	159	7961	4563
	1:4	37	148				
5	Puro	120	120				
	1:2	75	150	147	187	9369	5370
	1:4	43	172				
Média				118	151	7560	4333
Desvio Padrão				5,66	7,04	352,38	201,97

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.10 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 108003).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	51	51				
	1:2	31	62	71	93	4625	2651
	1:4	25	100				
2	Puro	66	66				
	1:2	37	74	103	132	6593	3779
	1:4	42	168				
3	Puro	63	63				
	1:2	31	62	66	86	4294	2461
	1:4	18	72				
4	Puro	51	51				
	1:2	26	52	57	75	3755	2152
	1:4	17	68				
5	Puro	71	71				
	1:2	36	72	85	110	5495	3150
	1:4	28	112				
Média				74	96	4805	2754
Desvio Padrão				9,98	12,41	620,57	355,69

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.11 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 111050).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	124	124				
	1:2	62	124	139	177	8831	5061
	1:4	42	168				
2	Puro	186	186				
	1:2	134	268	239	302	15087	8647
	1:4	66	264				
3	Puro	194	194				
	1:2	121	242	472	591	29547	16935
	1:4	245	980				
4	Puro	142	142				
	1:2	75	150	155	197	9825	5631
	1:4	43	172				
5	Puro	181	181				
	1:2	116	232	222	280	13989	8018
	1:4	63	252				
Média				205	259	12967	7432
Desvio Padrão				44,66	55,51	2775,9	1591,03

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.12 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 108004).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	55	55				
	1:2	34	68	84	108	5413	3102
	1:4	32	128				
2	Puro	50	50				
	1:2	27	54	53	71	3527	2022
	1:4	14	56				
3	Puro	54	54				
	1:2	44	88	69	90	4480	2568
	1:4	16	64				
4	Puro	61	61				
	1:2	28	56	68	89	4460	2556
	1:4	22	88				
5	Puro	64	64				
	1:2	38	76	72	94	4687	2687
	1:4	19	76				
Média				70	91	4542	2604
Desvio Padrão				2,02	2,52	126,01	72,22

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

Tabela 4.13 - Estimativa do conteúdo de ATP por ampola da vacina BCG (Lote 109007).

Amostra	Diluição	URL	Fator	Média URL	pmol/100uL ¹	pmol/ampola ²	ng/ampola
1	Puro	48	48				
	1:2	21	42	59	78	3900	2235
	1:4	22	88				
2	Puro	49	49				
	1:2	19	38	44	59	2927	1677
	1:4	11	44				
3	Puro	55	54				
	1:2	36	72	68	88	4418	2532
	1:4	19	76				
4	Puro	40	40				
	1:2	31	62	135	172	8624	4943
	1:4	76	304				
5	Puro	79	79				
	1:2	53	106	98	126	6283	3601
	1:4	27	108				
Média				75	97	4867	2790
Desvio Padrão				20,16	25,06	1253,03	718,18

¹ A reação foi realizada com 20µL da amostra da vacina.

² Multiplicar pelo fator de 50 referente a estimativa da reação em 1mL.

4.4 - Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da vacina BCG

Nos ensaios realizados para avaliar a viabilidade das amostras da vacina BCG Moreau RDJ, foram utilizados 20 ampolas dos 10 lotes. A vacina de referência BRABCG003 foi usada para a comparação dos resultados obtidos. A Tabela 4.14 apresenta o número de UFC determinados ao final do experimento. Os 10 lotes da vacina foram realizados posteriormente, podendo ser analisados nas Tabelas (4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23 e 4.24). A metodologia usada e os cálculos para a determinação do UFC/mL estão expostos no Anexo A.

Tabela 4.14 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:RHO/2010) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID													LOTE: RHO/2010						
VACINA MANTIDA A -30°C						Data da realização do teste: 29/12/2011													
Diluições	Leituras					S QUADR					SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA= SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx10 ⁶	
1:1	55	51	64	58	43	14935					271	5	4,55	54,2	104,4	52,2	0,2	10,44	
1:3	26	26	21	26	17	2758					116	5	2,88	23,2	50,2	25,81	0,4	10,32	
1:7	9	16	15	16	15	11	12	15	12	14	1873	135	10	3,74	13,5	27	12,18	0,8	9,74
LJ - Lote: 01	SAUTON - Lote: 01					Leitura em 26/01/2012					Vacina de referência: 9,86								
VACINA MANTIDA A -30°C						Data da realização do teste: 29/12/2011													
Diluições	Leituras					S QUADR					SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA= SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx10 ⁶	
1:1	57	60	49	60	48	15154					274	5	2,53	54,8	112,8	56,4	0,2	11,28	
1:3	33	24	29	32	29	4371					147	5	1,67	29,4	58	28,54	0,4	11,42	
1:7	15	12	17	16	16	13	7	19	13	15	2143	143	10	6,86	14,3	28,6	14,55	0,8	11,64
LJ - Lote: 01	SAUTON - Lote: 01					Leitura em 26/01/2012					Vacina de referência: 9,86								

Tabela 4.15 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:108003) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 108003 AGO07 (2011)										
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 18/09/2012										
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA= SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106		
1:1	14 16 20 13 21	1462	84	5	3,02	16,8	38,8	19,4	0,2	3,88		
1:3	12 10 16 5 10	625	53	5	5,96	10,6	22	8,98	0,4	3,59		
1:7	6 2 4 6 6 11 6 5 5 6	371	57	10	8,09	5,7	11,4	5,35	0,8	4,28		
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012										

Tabela 4.16 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:108004) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 108004 AGO08 (2011)										
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 18/09/2012										
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA= SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106		
1:1	17 22 12 23 17	1735	91	5	4,33	18,2	35	17,5	0,2	3,5		
1:3	6 5 7 12 9	335	39	5	3,95	7,8	16,8	8,94	0,4	3,58		
1:7	4 3 7 5 5 3 7 6 1 4	235	45	10	7,22	4,5	9	3,96	0,8	3,17		
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012										

Tabela 4.17 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:108006) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 108006 AGO10 (2011)									
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 18/09/2012									
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA=SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106	
1:1	6 5 4 7 9	207	31	5	2,39	6,2	13,6	6,8	0,2	1,36	
1:3	2 4 3 2 4	49	15	5	1,33	3	7,4	3,15	0,4	1,26	
1:7	2 2 0 2 2 4 6 0 2	76	22	10	12,55	2,2	4,4	1,53	0,8	1,22	
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012									

Tabela 4.18 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109007) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 109007 SET01 (2011)									
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 18/09/2012									
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA=SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106	
1:1	33 28 30 24 29	4190	144	5	1,49	28,8	54,6	27,3	0,2	5,46	
1:3	13 20 11 11 10	911	65	5	5,08	13	25,8	13,88	0,4	5,55	
1:7	6 3 5 7 9 8 9 6 8 3	454	64	10	6,94	6,4	12,8	6,48	0,8	5,19	
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012									

Tabela 4.19 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109008) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 109008 SET02 (2011)										
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 18/09/2012										
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA= SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106		
1:1	49 55 33 36 34	8967	207	5	9,59	41,4	84,2	42,1	0,2	8,42		
1:3	19 22 21 22 18	2094	102	5	0,65	20,4	42,8	21,07	0,4	8,43		
1:7	16 15 13 11 10 8 8 6 14 11	1352	112	10	8,71	11,2	22,4	10,46	0,8	8,37		
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012										

Tabela 4.20 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109009) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 109009 SET03 (2011)										
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 18/09/2012										
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA= SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106		
1:1	42 28 25 40 36	6069	171	5	6,46	34,2	71,8	35,9	0,2	7,18		
1:3	20 13 20 16 15	1450	84	5	2,31	16,8	37,6	17,86	0,4	7,14		
1:7	9 13 7 10 7 11 14 13 7 13	1152	104	10	6,77	10,4	20,8	8,84	0,8	7,07		
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012										

Tabela 4.21 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109014) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 109014 SET08 (2011)									
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 18/09/2012									
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA=SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106	
1:1	7 8 14 6 10	445	45	5	4,44	9	19,4	9,7	0,2	1,94	
1:3	5 8 6 9 1	207	29	5	6,69	5,8	10,4	4,58	0,4	1,83	
1:7	1 3 6 1 2 2 2 3 2 1	73	23	10	8,74	2,3	4,6	2,86	0,8	2,29	
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012									

Tabela 4.22 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:109039) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 110039 OUT12 (2011)									
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 18/09/2012									
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA=SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106	
1:1	41 45 35 41 22	7096	184	5	8,83	36,8	75,2	37,6	0,2	7,52	
1:3	17 23 19 16 15	1660	90	5	2,22	18	38,4	18,78	0,4	7,51	
1:7	14 11 14 9 8 16 3 7 9 11	1174	102	10	13,1	10,2	20,4	9,28	0,8	7,42	
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012									

Tabela 4.23 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:111050) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 111050 NOV09 (2011)									
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 05/09/2012									
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA= SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106	
1:1	49 52 46 51 41	11503	239	5	1,65	47,8	97,8	48,9	0,2	9,78	
1:3	31 27 23 26 27	3624	134	5	1,22	26,8	50	24,58	0,4	9,83	
1:7	16 13 11 14 10 14 11 8 12 7	1416	116	10	6,07	11,6	23,2	12,82	0,8	10,26	
LJ - Lote: 31	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 16/10/2012									

Tabela 4.24 - Determinação da viabilidade da vacina BCG (Lote:110042) pelo método de UFC/mL.

VIABILIDADE DA VACINA BCG ID		LOTE: 110042 OUT16 (2011)									
VACINA MANTIDA A -30°C		Data da realização do teste: 05/09/2012									
Diluições	Leituras	S QUADR	SOMA (Sx)	n	χ^2	MÉDIA= SX/n	PARCIAL	CÁLC.	d/v	UFCx106	
1:1	31 27 34 27 21	4016	140	5	3,43	28	61,2	30,6	0,2	6,12	
1:3	20 12 21 11 20	1506	84	5	5,64	16,8	33,2	14,97	0,4	5,99	
1:7	14 7 12 1 8 7 5 12 8 8	800	82	10	15,56	8,2	16,4	8,36	0,8	6,69	
LJ - Lote: 33	SAUTON - Lote: 16	Leitura em 17/10/2012									

4.5 - Relação da concentração de ATP (URL) por UFC equivalente

A Tabela 4.25 determina a quantidade de ATP em pmol/100 μ L e ng/ampola do lotes (108006, 109014, 108004, 108003, 109007, 110042, 109009, 110039, 109008, 111050) relacionando os valores obtidos no ensaio de bioluminescência pelo UFC correspondente do mesmo lote.

Tabela 4.25 - Relação da concentração (pmol/100 μ L e ng/ampola) por UFC equivalente.

Lote	Média	Desvio Padrão	UFC equivalente (x10 ⁶ /ampola)
108006			
pmol/100 μ L	62	+/- 2,66	1,26
ng/ampola	1764	+/- 76,33	
109014			
pmol/100 μ L	74	+/- 9,71	1,94
ng/ampola	2109	+/- 278,55	
108004			
pmol/100 μ L	91	+/- 2,52	3,50
ng/ampola	2604	+/- 72,22	
108003			
pmol/100 μ L	96	+/- 12,41	3,88
ng/ampola	2754	+/- 355,69	
109007			
pmol/100 μ L	97	+/- 25,06	5,46
ng/ampola	2790	+/- 718,18	
110042			
pmol/100 μ L	100	+/- 21,22	6,12
ng/ampola	2853	+/- 608,12	
109009			
pmol/100 μ L	108	+/- 26,01	7,14
ng/ampola	3090	+/- 748,05	
110039			
pmol/100 μ L	151	+/- 7,04	7,51
ng/ampola	4333	+/- 201,97	
109008			
pmol/100 μ L	191	+/- 13,99	8,42
ng/ampola	5477	+/- 401,08	
111050			
pmol/100 μ L	259	+/- 25,06	9,83
ng/ampola	7432	+/- 1591,03	

Os resultados obtidos revelam uma correlação linear positiva da concentração de bioluminescência (pmol/100uL ou ng/ampola) pelo UFC equivalente (Figura 4.4). Os menores valores obtidos no ensaio de bioluminescência se relacionam com os menores resultados obtidos no ensaio de UFC, mostrando que a concentração de ATP está diretamente relacionada a viabilidade do bacilo que pode ser determinado pelo ensaio de UFC.

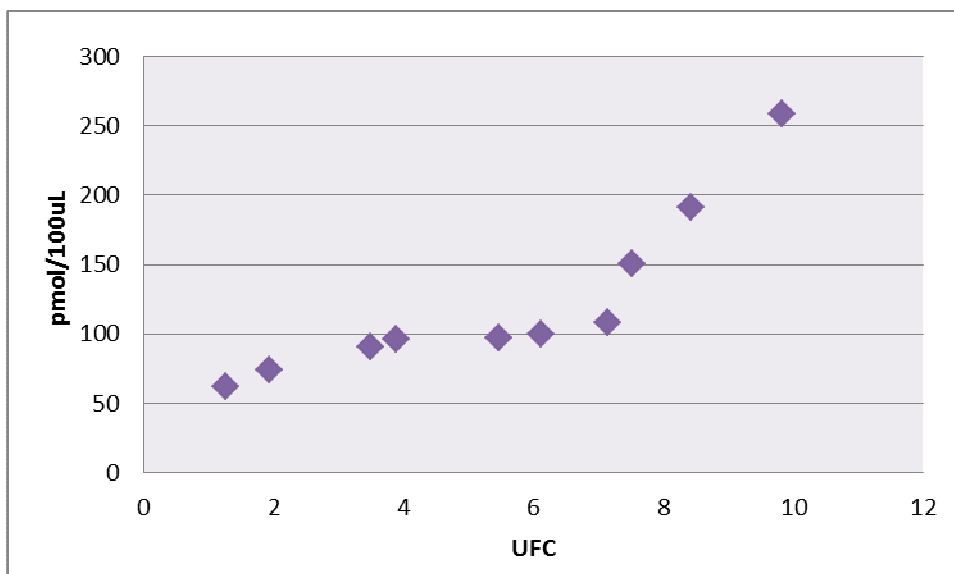


Figura 4.4 - Diagrama de dispersão (pmol/100uL x UFC).

A intensidade da associação linear existente entre as variáveis foi quantificada por meio do coeficiente de correlação linear de Pearson, obtido dividindo a covariância de duas variáveis pelo produto de seus desvios padrão. O resultado obtido mostrou a existência de uma correlação forte e positiva ($0,8 \leq r < 1$) com $r = 0,872961$.

5 – DISCUSSÃO

No início do século passado, existia a esperança de que a TB pudesse ser erradicada através da vacinação pela BCG, recém-desenvolvida por Calmette e Guérin, em Lille, na França (Calmette et al. 1927). Durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), estas esperanças aumentaram com a descoberta da ação bacteriostática da estreptomicina por Selman Waksman, Prêmio Nobel de Medicina em 1952 (Waksman 1964). O tratamento com estreptomicina parecia eficaz, mas o *M. tuberculosis* começou a desenvolver resistência às drogas rapidamente, um indício da capacidade do bacilo em adquirir resistência aos medicamentos (Kaufmann & Parida 2007).

O equívoco de que a erradicação da TB poderia dar-se apenas por uso de antibióticos e pela vacinação levou à complacência da sociedade frente à doença por várias décadas. Esta situação mudou apenas no início de 1990, quando a OMS declarou a TB como uma emergência global. Cientistas de diversos países começaram então a concentrar esforços em outras áreas de pesquisa, iniciando estudos para entender melhor a doença, a busca de novas vacinas, desenvolver novos métodos de diagnóstico e introduzir melhorias nos processos de produção e controle de qualidade da atual vacina (Ottenhoff & Kaufmann 2012).

A vacina BCG é amplamente utilizada contra a TB e mais recentemente começou a ser usada como agente imunoterápico frente ao câncer superficial de bexiga (Brandau 2007; Gontero et al. 2010). Aproximadamente, cem milhões de doses da vacina BCG são administradas a cada ano para prevenir a TB e centenas de milhares de doses têm sido destinadas para tratar as formas iniciais de câncer de bexiga (OMS 2004).

Apesar de sua ampla utilização, os métodos de produção e controle de qualidade da vacina BCG permaneceram inalterados ao longo de décadas. Portanto, métodos aperfeiçoados e melhor controlados são essenciais para facilitar o processo de

fabricação e auxiliar na avaliação de produtos micobacterianos. Além disso, vários novos candidatos a vacinas usando micobactérias atenuadas encontram-se em desenvolvimento como alternativa para a BCG (Walker et al. 2010).

Os métodos de controle de qualidade recomendados pela Farmacopéia Européia e OMS para a avaliação da identidade da vacina BCG envolvem o exame microscópico da coloração de BAAR que confirma apenas a presença de micobactérias no produto final e a aparência das colônias crescidas em meio sólido. Estes métodos não permitem ao produtor diferenciar e caracterizar as subcepas de BCG e tampouco a presença de outros membros do complexo *M. tuberculosis* muitos dos quais patogênicos (Donikian et al. 1987; European Pharmacopoeia Commission 2008).

Os BCGs apesar de provenientes de uma cepa virulenta de *M. bovis* apresentam, devido aos diferentes métodos de passagem e de armazenamento ao longo dos anos, diferenças fenotípicas, bioquímicas e heterogeneidade genética (Cole et al. 1998).

Essas características podem ser utilizadas para diferenciação e classificação das subcepas (Anônimo 1978; Zhang et al. 1995), sendo o método genômico o melhor, pois permite o sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* e pela utilização de tecnologias avançadas como o ensaio de microarranjos de DNA que permite identificar as deleções de algumas subcepas (Behr et al. 1999).

Estudos desenvolvidos por Magdalena et al. (1998) utilizando a PCR possibilitaram distinguir de maneira específica as subcepas de BCG das cepas virulentas do complexo *M. tuberculosis*, a partir da análise de dois componentes gênicos, nomeados *senX3-regX3*.

Talbot et al. (1997) mostraram que a região genômica designada RD1 encontrava-se presente em todas as micobactérias virulentas tanto do *M. bovis* quanto do complexo *M. Tuberculosis* e ausente nas subcepas da vacina BCG. Assim, um método de PCRm foi desenvolvido para detectar a deleção RD1 e uma ampla coleção de BCG e outras linhagens do complexo *M. tuberculosis* foram testadas. Os resultados mostraram que a RD1 foi excluída de todas as 23 cepas de BCG avaliadas, enquanto a RD1 estava presente nas 129 cepas do complexo *M. tuberculosis* analisadas.

Técnicas de amplificação de ácidos nucléicos como métodos alternativos de CQ não apenas para diferenciar as várias subcepas de BCG como também revelar a

presença de micobactérias virulentas nas preparações foram objeto de um estudo realizado por Bedwell et al. (2001). Os autores desenvolveram um método de PCRm barato, específico, rápido, reprodutível, portátil e robusto. A base deste método utiliza a PCR para amplificar seis regiões genéticas encontradas em várias micobactérias. Cinco destas são regiões de diferença (RD 1, 2, 8, 14 e 16) que podem estar presentes ou ausentes nas subcepas de BCG. O sexto alvo é uma região de dois componentes (*senX3-regX3*) que tem um número variável de repetições em entre as subcepas de BCG.

O sequenciamento do genoma do *M. bovis* BCG Moreau RDJ por Gomes et al. (2011) favoreceu além das características genéticas e fenotípicas, a comprovação histórica das deleções gênicas ocorridas pelo BCG Moreau ao longo dos anos, possibilitando deste modo caracterizar a identidade molecular da vacina. Apesar da sua ampla utilização no país pouco tinha sido feito até o momento para caracterizar a BCG brasileira no aspecto molecular.

A BCG Moreau pertence a um seleto grupo de subcepas vacinais que apresentam o sequenciamento do genoma completo. Dentre elas podemos destacar as cepas Pasteur e Tóquio que tiveram seus genomas revelados (Brosch et al. 2007; Seki et al. 2009). As cepas da China, Dinamarca, Rússia e Tice estão seguindo o mesmo caminho das cepas que tiveram seu sequenciamento concluído (Pan et al. 2011).

A técnica de PCRm pode ser utilizada como ferramenta de identificação e caracterização da vacina BCG e em amostras clínicas. Apesar de ser considerada não patogênica, em alguns casos, a vacina BCG pode causar doenças em indivíduos vacinados, quando estes estiverem em imunossupressão (Abramowsky et al. 1993). O uso da BCG como um agente imunoestimulador para o tratamento de carcinoma de bexiga pode, em alguns casos provocar uma infecção local, regional ou até mesmo sistêmica (Nicod 1995). O método de PCR poderia então ser utilizado para diferenciar a infecção causada pela vacina/imunomodulador de uma infecção externa causada por outra micobactéria.

Outra utilização da PCRm está na investigação de lotes sementes cuja produção é realizada de acordo com as recomendações da OMS. Para evitar a ocorrência de mutações e possíveis alterações da imunogenicidade são recomendadas apenas 12 passagens em meio de cultura a partir do lote primário. A OMS sugere que as culturas sejam avaliadas a partir de observações microscópicas dos bacilos, pela coloração de ZN, com a determinação da dimensão das colônias, a exclusão de contaminação

bacteriana ou fúngica e a ausência de micobactérias virulentas (WHO 1987).

Um estudo realizado por Trovero et al. (2010) avaliou lotes sementes obtidos a partir de um lote secundário liofilizado da cepa BCG Pasteur 1132 P2, geneticamente caracterizada. O genoma de cinco regiões alvo (RD1, RD2, RD14, RD15 e DU2) foi analisado por PCRm, usando o lote semente e diferentes cepas disponíveis como modelos. Os resultados não mostraram diferenças genéticas nos fragmentos estudados em comparação com a cepa Pasteur. Um total de 20 passagens foi realizado e não foram encontradas diferenças no tamanho dos fragmentos amplificados. Em conclusão, este método permite controlar genotipicamente um lote semente de trabalho e avaliar a estabilidade do genoma da vacina BCG.

A técnica de PCRm foi usada também por Seki et al. (2012) para avaliar a validade do número de passagens do lote semente em meio de cultura exigido pela OMS. Após 20 passagens, quase o dobro do limite estabelecido para a produção de vacinas no Japão, o genoma de cinco regiões alvo (RD1, RD2, RD15, RD16 e *senX3-regX3*) foi analisado e não foram observadas diferenças genotípicas e fenotípicas.

Aldous et al. (2005) comparou seis métodos de extração de DNA genômico do *M. tuberculosis* incluindo uso de detergentes, rotura mecânica, enzimas proteolíticas, kit comercial e extração pelo calor. Apesar das dificuldades, os resultados mostraram que os métodos são eficazes e o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) apresentou resultados semelhantes aos demais, com menor tempo e custo para a extração.

Na primeira parte do estudo foi padronizada a metodologia usando os melhores valores de concentração de DNA extraído. A utilização do kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) proporcionou resultados expressivos em relação ao tempo de obtenção quando comparado ao método de choque térmico e a combinação de ambos. Em nosso estudo, o lote RHO/2010 da vacina BCG Moreau apresentou os melhores resultados dentre os três lotes usados para a padronização e de acordo com esses dados os valores de DNA (ng/μL) para CT (8,40), CTK (21,72) e K (20,81) indicam diferenças mínimas entre os métodos CTK e K. Dessa forma, justifica-se o uso do kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) por sua rapidez e praticidade.

Para a avaliação da identidade da vacina BCG foi utilizado o protocolo de Markey et al. (2010) segundo um estudo coordenado pela OMS com treze oligonucleotídeos para seis regiões alvo. Os resultados obtidos nesse trabalho apresentaram o padrão esperado de amplificação das vacinas candidatas a RR

(Dinamarquês 1331, Tóquio 172-1, Russa-I, Moreau e Glaxo).

Nossos resultados foram semelhantes aos do estudo da OMS com a amplificação das regiões RD8 (472 pb), RD2 (315 pb), senX3-regX3 (276 pb), RD14 (252 pb) e RD1 (196 pb) e a ausência esperada do fragmento RD 16 (401 pb) como observado nos 10 lotes (109014, 109009, 108003, 111050, 110039, 110042, 109008, 108006, 012182, 108002 e 009083) avaliados. Tais achados são indicativos do genótipo real do BCG Moreau RDJ segundo o histórico e os estudos moleculares anteriormente descritos (Harboe et al. 1984; Fomukong et al. 1992; Behr et al. 1999). Foi possível observar por meio da avaliação da identidade dos 10 lotes da vacina BCG Moreau RDJ obtidos em diferentes períodos de produção a preservação das características genéticas sem contaminação por outras subcepas ou bactérias patogênicas.

Em nosso estudo, os resultados obtidos pela PCRm revelaram que o método é específico, reprodutível, robusto e eficaz para a determinação pelo CQ, durante as etapas de produção, avaliação da identidade e caracterização da vacina BCG Moreau RDJ e das diferentes subcepas, com base em suas deleções e regiões variáveis peculiares.

O ensaio proposto permite identificar também regiões que apresentam polimorfismo gênico, a ocorrência de subcepas mistas ou a contaminação do produto final por cepas virulentas do complexo *M. Tuberculosis*, podendo ser avaliada para todos os lotes. A técnica de PCRm mostrou ser um método alternativo adequado para substituir a coloração álcool-ácido, conferindo segurança para a vacina comercializada no mercado interno e internacional.

A utilização de procedimentos mais rápidos e eficazes para quantificar a potência destes novos candidatos à vacina poderiam agilizar a sua avaliação clínica e entre os testes de CQ utilizados na produção da BCG, atualmente somente o ensaio de UFC avalia o número de micobactérias viáveis (Orme 1988; Parra et al. 2009).

Nos últimos anos alguns grupos tem utilizado o ensaio de ATP intracelular, um procedimento mais rápido para quantificar partículas de BCG viáveis (Askgaard et al. 1995, Ho et al. 2008, Jensen et al. 2008 e Prioli et al. 1985). Embora os ensaios de ATP tenham sido testados inicialmente há 35 anos, o número de cepas que foram avaliadas desde os anos 1970 é extremamente limitado (Crispen 1971). Em contraste com o ensaio de UFC que consome várias semanas, esse ensaio pode ser completado em

aproximadamente 24 horas (Askgaard et al. 1995 e Prioli et al. 1985; Imamura et al. 2009). Em preparações de vacinas BCG liofilizadas foi observada por Jensen et al. (2008) uma alta correlação entre as concentrações intracelulares de ATP e o número de bacilos viáveis. Além disso, os resultados de um estudo internacional colaborativo sob coordenação da OMS indicaram que a técnica de bioluminescência de ATP é um método prático, robusto e reprodutível que pode ser utilizado como um procedimento de CQ de rotina na fabricação da vacina BCG (Ho et al. 2008).

Diversos estudos foram realizados nos últimos anos para comparar o método tradicional (contagem de UFC) e o ensaio de bioluminescência. Askgaard et al. (1995) realizou um estudo no qual os resultados revelaram uma relação proporcional entre o UFC e o teor de ATP por ampola mostrando que esse método alternativo poderia ser um candidato para a avaliação da viabilidade da vacina BCG pelo CQ. Já outro estudo realizado por Kolibab et al. (2012) mostrou que o ensaio de ATP intracelular pode ser utilizado para determinar o número de organismos viáveis nas vacinas BCG liofilizadas e congeladas, incluindo novas cepas recombinantes e também monitorar o crescimento e a quantificação de culturas de micobactérias *in vitro*. Os mesmos autores sugerem que o ensaio de ATP pode ser utilizado em estudos pré-clínicos para quantificar a resposta de organismos vivos a drogas e vacinas que estão em desenvolvimento. Além disso, Hoffner et al. (2009) demonstraram que o ensaio de ATP tem potencial para uso em rotina em testes de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.

Um importante estudo realizado sob a coordenação da OMS avaliou a viabilidade de três candidatos (vacinas Dinamarquesa 1331, Tóquio 172-1 e Russa-I) a RR, utilizando os métodos de contagem de culturas viáveis e bioluminescência (Ho et al. 2011). Entretanto, os resultados não indicaram que o método de ATP é melhor que o de UFC, mas mostraram que podem ser utilizados de forma complementar pelos fabricantes da vacina, com isto poderia diminuir o tempo de fabricação das mesmas. No entanto, este mesmo estudo mostrou que a inexperiência de alguns laboratórios em realizar o ensaio de ATP modificado resultou na exclusão de três participantes pela elevada variabilidade nos resultados deste teste. Portanto, estudos complementares, incluindo treinamento de pessoal, tornam-se necessários para justificar a utilização desse ensaio rápido e reprodutível em testes de caracterização de fármacos e vacinas micobacterianas

Em nossos estudos os resultados obtidos com o kit ATP Determination

(Invitrogen, Carisbad, Califórnia, USA) mostraram a possibilidade do uso deste produto para a avaliação das ampolas da vacina BCG Moreau a partir do ATP produzido, com limites de detecção entre 0,1 e 1000 pmol/100µL. A avaliação de cada lote revelou um padrão de concentração de ATP característico reforçando que quanto maior a quantidade de ATP maior será o valor de UFC uma vez que, a concentração de ATP está diretamente relacionada à viabilidade do bacilo. Assim, pelo coeficiente de correlação linear de Pearson foi possível mostrar a existência de uma correlação forte e positiva ($0,8 \leq r < 1$; $r = 0,872961$) entre o ATP produzido e o seu UFC correspondente.

Em nossa opinião, para a subcepa Moreau Rio de Janeiro, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a utilização da técnica de bioluminescência para avaliar a viabilidade da vacina BCG possibilitará maior rapidez e consistência na determinação da quantidade de bacilos vivos durante o processo de produção e no produto final proporcionando maior eficiência na liberação de lotes para o mercado brasileiro e internacional. Além disto, concordamos com outros grupos que o ensaio de ATP poderá ser utilizado por pesquisadores acelerando os testes pré-clínicos e clínicos no desenvolvimento de novas vacinas uma vez que o período de incubação de 3 a 4 semanas do ensaio de UFC retarda essas avaliações.

É importante ressaltar que os nossos resultados são semelhantes aos de um estudo da OMS com outras subcepas de BCG que comparou os ensaios de ATP modificado e UFC, sendo que também conseguimos relacionar a quantidade de UFC pelo valor obtido de ATP em 10 lotes de vacina (OMS 2009). Embora os lotes da vacina tenham apresentado diferenças no desvio-padrão, os valores encontrados são aceitáveis por se tratar de uma vacina viva atenuada para a qual a FB estabelece a quantidade de bacilos viáveis entre 2 e 10 milhões por ampola (Brasil 2010).

A padronização de metodologias alternativas para o CQ da vacina BCG Moreau RDJ objeto de pesquisa da OMS deverá ter a sua normatização finalizada após a análise dos resultados dos estudos colaborativos em desenvolvimento, incluindo os da presente investigação e contribuirá para a melhoria e segurança da utilização das vacinas BCG em uso atualmente no mundo.

6 - CONCLUSÕES

- Em nosso estudo foi estabelecida a melhor metodologia de extração de DNA a partir das ampolas da vacina BCG Moreau RDJ.
- Os resultados de rendimento de DNA utilizando a combinação do kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) seguido da técnica de choque térmico foram ligeiramente superiores aqueles obtidos usando-se apenas o kit comercial, porém, o tempo consumido foi maior.
- O método de extração utilizando apenas o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit

(Qiagen®) foi o de escolha e será usado na avaliação dos lotes de produção e também dos lotes sementes.

- A identidade da vacina BCG foi comprovada avaliando-se diferentes lotes em datas distintas. Estes resultados revelam que a vacina BCG Moreau RDJ mantém suas características genotípicas nos produtos finais comercializados.

- A metodologia de eletroforese em gel de agarose permitiu determinar as melhores condições de corrida e a concentração ideal para a visualização dos pequenos fragmentos de DNA e os marcadores utilizados favoreceram a caracterização dos fragmentos amplicados.

- O uso do kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) possibilitou determinar a concentração de ATP das ampolas de diferentes lotes da vacina BCG Moreau RDJ.

- Os resultados obtidos pelo ensaio de bioluminescência e UFC permitiram estabelecer uma relação entre a concentração obtida de ATP por lote e seu respectivo valor de UFC.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramowsky C, Gonzalez B, Sorensen RU. **Disseminated bacillus Calmette–Guerin infections in patients with primary immunodeficiencies.** *Am J Clin Pathol* 1993; 100:52–6.

American Thoracic Society and Centers for Disease Control and Prevention. **Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (4 pt 1): 1376–1395.

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. **Specific immune-based diagnosis of tuberculosis.** *Lancet* 2000; 356 (9235): 1099-104.

Anonymous. **Phenotypes of BCG-vaccines seed lot strains: results of an international cooperative study.** *International Union against Tuberculosis. Tubercle* 1978; 59: 139–142.

Askgaard DS, Gottschau A, Knudsen K, Bennedsen J. **Firefly luciferase assay of adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines.** *Biologicals* 1995; 23(1): 55-60.

Baharoon S. **Tuberculosis of the breast.** *Ann Thorac Med* 2008; 3(3): 110-114.

Baker JM, Griffiths MW, Collins-Thompson DL. **Bacterial bioluminescence: applications in food microbiology.** *Journal Food Protection* 1992; 55 (1): 62-70.

Barrichello A, Alil MCA. **Bioluminescência: uma nova ferramenta para tornar o controle microbiológico mais rápido, fácil e preciso.** *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes* 1997; 52 (300): 71-79.

Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. **Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR.** *Vaccine* 2001; 19 (15–16): 2146–51.

Behr MA, Small PM. **A historical and molecular phylogeny of BCG strains.** *Vaccine* 1999; 17: 915–22.

Behr MA. **BCG–different strains, different vaccines?** *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 86-92.

Benévolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LRR. **BCG Moreau Rio de Janeiro: An oral vaccine against tuberculosis.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 (5): 459-465.

Beveridge NE, Price DA, Casazza JP, Pathan AA, Sander CR, Asher TE, et al. **Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ memory T lymphocyte populations.** *Eur J Immunol* 2007; 37: 3089-3100.

Bloom BR, Fine PEM. **The BCG experience: Implications for future vaccines against tuberculosis.** In: Bloom BR. (Ed) *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* Washington, DC: American Society for Microbiology 1994; Cap. 31, p. 531 – 557.

Brandau S, Suttman H. **Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement.** *Biomed. Pharmacother* 2007; 61, 299–305.

Brasil. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA 2010a; 783-784.

Brasil. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Especial Tuberculose volume 43 / Secretaria de Vigilância em Saúde 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Programa Nacional de Controle da Tuberculose [online]. Brasília, DF, 2011. [capturado 15 nov 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_tb.pdf.

Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. **Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy**. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104 (13): 5596–5601.

Brum RCS. **Padronização e Validação da técnica do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Semi-Quantitativa e Quantitativa para o Biofármaco Alfainterferona 2b Humana Recombinante**. Rio de Janeiro; 2009. Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos – Instituto Oswaldo Cruz.

Burril J, Williams CJ, Baln G, Conder G, Hine AL, Misra RR. **Tuberculosis. A radiologic review**. Radiographics 2007; 27: 1255-73.

Calmette A, Guérin C, Boquet A, Négre L. **La vaccination préventive contre la tuberculose par le “BCG”**. Masson 1927.

Center for Diseases Control Prevention (CDC). **Trends in Tuberculosis. 2008** [online]. [Capturado em 10 de jan. 2012]; 1(1). Disponível em: <HTTP://www.cdc.gov>.

Centers for Disease Control and Prevention. **Interactive core curriculum on tuberculosis**.

Website.http://www.cdc.gov/tb/webcourses/CoreCurr/TB_Course/Menu/frameset_internet.htm. Acessado em 15 de janeiro de 2012.

Ceyhan I, Simşek H, Tarhan G. **Comparison and evaluation of Lowenstein-Jensen medium and 2% ogawa medium for the diagnosis of tuberculosis**. Mikrobiyol Bul 2012; 46(1): 33-8.

Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, et al. **The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature**. Pediatrics 1995; 96: 29-35.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence**. Nature 1998; 393: 537– 44.

Comhaire FH, Vermeulen L, Monsieur L. **Determination of adenosine triphosphate in human semen to estimate the fertilizing potential and to quantify sperm antibodies**. J. Biolum. Chemilum 1989; 4: 399-405.

Conde MB, Muzy de Souza GR. **Pneumologia e fisiologia: uma abordagem prática.** São Paulo: Atheneu, 2009.

Cooper AM. **Cell-mediated immune responses in tuberculosis.** *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 393–422.

Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, Knezevic I. **Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains,** Imperial College, London, 15–16 December. *Vaccine* 2004; 2675–2680.

Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs Junior WR. **Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice.** *Nature* 1999; 402 (6757): 79–83.

Crispen RG. **Rapid testing of freeze dried BCG vaccine for stability and viability.** *Symp. Ser. Immunobiol. Stand* 1971; 17, 205–210.

Daley CL, Gotway MB, Jasmer Rm. **Radiographic manifestations of tuberculosis: A primer for clinicians.** San Francisco: Francis J. Cur Nat Tuberc Cent 2009.

De Luca M, McElroy WW. **Kinetics of firefly luciferase catalyzed reactions.** *Biochemistry* 1974; 13: 921-925.

Del Portillo P, Thomas MC, Martínez E, Marañón C, Valladares B, Patarroyo ME, *et al.* **Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinica samples.** *J Clin Microbiol* 1996; 34: 324–8.

Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GA. **Lung remodeling in pulmonary tuberculosis.** *J Infect Dis* 2005; 192: 1201–1210.

Dietrich J, Doherty TM. **Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: consequences for vaccine development.** *Journal Compilation* 2009; 117: 440–457.

Doherty TM, Andersen P. **Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress.** *Clin Microbiol Rev* 2005; 18 (4): 687-702.

Donald PR, Van Helden PD. **The global burden of tuberculosis –combating drug resistance in difficult times.** *N Engl J Med* 2009; 360: 2393–5.

Donikian R, Gheorghiu M, Jablokova TB. **Requirements for dried BCG vaccine.** *WHO Tech Rep Ser* 1987; 745: 60–92.

Ducati RG, Netto AR, Basso LA, Santos DS. **The resumption of consumption . A review on tuberculosis.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (7): 697-714.

European Pharmacopoeia Commission, **BCG vaccine, freeze dried.** European pharmacopoeia. 6th ed. Council of Europe, Strasbourg 2008; 759–61.

Fend R, Geddes R, Lesellier S, Vordermeier HM, Corner LA, Gormley E. **Use of an electronic nose to diagnose *Mycobacterium bovis* infection in badgers and cattle.** *J Clin Microbiol* 2005; 43 (4): 1745-51.

Fine PE, Sterne JA, Ponnighaus JM, Rees RJ. **Delayed type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity.** *Lancet* 1994; 344 (8932): 1245-9.

Fomukong NG, Dale JW, Osborn TW, Grange JM. **Use of gene probes based on the insertion sequence IS986 to differentiate between BCG vaccine strains.** *J Appl Bacteriol* 1992; 72: 126-33.

Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. **Tuberculosis.** *Lancet* 2003; 362: 887-899.

Fuverki, RBN, Murakami PS, Biondo AW, Barros-Filho IR. **PCR use for detection and identification of mycobacterias from bovine clinical samples.** *Archives of Veterinary Science* 2008; 13 (1): 73-77.

Gaines Das RE, Rice LR. **SCAN, an exploratory program for preliminary analysis of bioassay and immunoassay data.** *Comput Methods Programs Biomed* 1985; 21 (1): 25-33.

Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M. **Multidrug resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis.** *Lancet* 2010; 375: 1830-1843.

Gary M, Wilkinson RJ. **Tuberculosis.** *Lancet* 2007; 370: 2030-43.

Glickman MS, Jacobs W. R. **Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline.** *Cell* 2003; 104 (4): 477-485.

Golden MP & Vikram HR. **Extrapulmonary tuberculosis: an overview.** *Am Fam Physician* 2005; 72: 1761-1768.

Gomes LH, Otto TD, Vasconcellos EA, Ferrão PM, Maia RM, Moreira AS, et al. **Genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis.** *J Bacteriol* 2011; 193 (19): 5600-1.

Gontero P, Bohle A, Malmstrom PU, O'Donnell MA, Oderda M, Sylvester R, et al. **The role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle invasive bladder cancer.** *Eur. Urol* 2010; 57, 410-429.

Guerrero GG, Debrie AS, Loch C. **Boosting with mycobacterial heparin-binding haemagglutinin enhances protection of *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated**

newborn mice against *M.tuberculosis*. *Vaccine* 2010; (28) 4340–4347.

Haldar S, Bose M, Chakrabarti P. **Improved laboratory diagnosis of tuberculosis - The Indian experience.** *Tuberculosis* 2011; 91: 414-426.

Harboe M, Nagai S. **MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG.** *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 444–52.

Herring P. **Systematic distribution of bioluminescence in living organisms.** *J. Biolum. Chemilum* 1987; 1: 147-163.

Ho MM, Corbel MJ, Knezevic I, Roumiantzeff M. **Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG vaccines,** WHO, Geneva, Switzerland, 8–9 December 2004. *Vaccine* 2005; 5700–5704.

Ho MM, Markey K, Rigsby P, Jensen SE, Gairola S. **Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine.** *Vaccine* 2008; 26 (36): 4754-7.

Ho MM, Markey K, Rigby P, Hockley J, Corbel MJ. **Report of an International collaborative study to establish the first WHO reference reagents for BCG vaccines of three different sub-strains.** *Vaccine* 2011; 29 (3): 512-8.

Hoffner S, Jimenez-Misas C, Lundin A. **Improved extraction and assay of mycobacterial ATP for rapid drug susceptibility testing.** *Luminescence* 1999; 14 (5): 255-61.

Hoft DF. **Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation.** *Lancet* 2008; 372: 164–75.

Hotter GS, Wards BJ, Mouat P, Besra GS, Gomes J, Singh M, *et al.* **Transposon mutagenesis of Mb0100 at the ppe1-nrp locus in *Mycobacterium bovis* disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG.** *J Bacteriol* 2005; 187 (7): 2267–77.

Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, Actor JK. **Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease.** *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36: 371–86.

Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, *et al.* **Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106 (37): 15651-6.

Jensen PA, Lambert LA, Iademarco MF, Ridzon R. Centers for Disease Control and Prevention. **Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings 2005.** *MMWR Recomm Rep* 2005; 54: 1-141.

Jensen SE, Hubrechts P, Klein BM, Haslov KR. **Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine.** *Biologicals* 2008; 36 (5): 308-14.

Kaufmann SHE. **Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response.** *J Intern Med* 2010; 267: 337–353.

Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. **New vaccines for tuberculosis.** *Lancet* 2010; 375: 2110–2119.

Kaufmann SH, Parida SK. **Changing funding patterns in tuberculosis.** *Nat Med* 2007; 13: 299–303.

Knechel NA. **Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis.** *Crit Care Nurse* 2009; 29 (2): 34-43.

Knezevic I, Corbel MJ. **WHO discussion on the improvement of the quality control of BCG vaccines.** *Vaccine* 2006; 24: 3874– 7.

Kolibab K, Derrick SC, Jacobs WR, Morris SL. **Characterization of an intracellular ATP assay for evaluating the viability of live attenuated mycobacterial vaccine preparations.** *J Microbiol Methods* 2012; 90 (3): 245-9.

Korf JE, Pynaert G, Tournoy K, Boonefaes T, Van Oosterhout A, Ginneberge D *et al.* **Macrophage reprogramming by mycolic acid promotes a tolerogenic response in experimental asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174 (2): 152-160.

Krystski A, Melo FAF. **Tuberculosis in adults.** In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007: from basic science to patient care: www.TuberculosisTextbook.com.* [S.l.]: BourcillierKamps, ©2007. Cap. 15, p. 487-524. Disponível em: <<http://www.TuberculosisTextbook.com>>. Acesso em: 15 nov 2010.

Lee RB, Li W, Chatterjee D, Lee RE. **Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed.** *Glycobiology* 2005; 15 (2): 139-151.

Lee, J. “Bioluminescence.” *The Science of Photobiology* . Ed. Kendric C. Smith. 2nd ed. New York: Plenum Press 1989; 391-417.

Leung AS, Tran V, Wu Z, Yu X, Alexander DC, Gao GF, et al. **Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy.** *BMC Genomics* 2008; 9: 413.

Li Y, Petrofsky M, Bermudez LE. ***Mycobacterium tuberculosis* uptake by recipient host macrophages is influenced by environmental conditions in the granuloma of the infectious individual and is associated with impaired production of interleukin-**

12 and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 2002; 70: 6223–6230.

Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. **BCG vaccines Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy.** *Human Vaccines* 2009; 5:2, 70-78.

Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, Carra G, Gerosa F. **Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production, the T-helper 17 response in humans.** *Immunol Rev* 2008; 226: 112-131.

Lundin A. **Use of firefly luciferase in ATP- related assays of biomass, enzymes, and metabolites.** *Methods Enzymol* 2000; 305: 346–70.

Machado-Tonus MEM. **Controle do ensaio de viabilidade da vacina BCG: da otimização a validação.** Rio de Janeiro; 2005. Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância – Instituto Nacional de Controle de qualidade.

Macintyre CR. **New developments in BCG vaccine: implications for tuberculosis control.** *Epidemiol. Infect* 2007; 135, 177–180.

Magdalena J, Supply P, Loch C. **Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2471–6.

Malbruny B, Le Marrec G, Courageux K, Leclercq R, Cattoir V. **Rapid and efficient detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory samples.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 553–555.

Markey K, Ho MM, Choudhury B, Seki M, Ju L, Castello-Branco LR, et al. **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* 2010; 28 (43): 6964-9.

Martín C. **The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG?** *Eur Resp J* 2005; 26: 162–167.

Mc Shane H. **Prime-boost immunization strategies for infectious diseases.** *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4: 23-7.

Michos AG, Daikos GL, Tzanetou K, Theodoridou M, Moschovi M, Nicolaidou P *et al.* **Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in respiratory and nonrespiratory specimens by the Amplicor MTB PCR.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 121–126.

Mostowy S, Tsolaki A, Small P, Behr M. **The *in vitro* evolution of BCG.** *Vaccine* 2003; 21: 4270-4.

Nicod LP. **Immunology of tuberculosis.** Swiss Med Wkly 2007; 137 (25-26): 357-362.

Nicol D. **BCG in bladder cancer — a warning.** Aust NZ J Med 1995; 25: 275–7.

Nolte FS, Metchock B. **Mycobacterium.** In: Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of clinical microbiology: 6th ed. Washington, DC: ASM Press, 1995: 400 – 37.

Okamoto YY, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K. **Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung.** J Immunol 2010; 184: 4414–4422.

Orme IM. **Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines.** Infect. Immun 1988; 56, 3310–3312.

Ottenhoff TH. **Overcoming the global crisis: “yes, we can”, but also for TB ... ?** Eur J Immunol 2009; 39: 2014–2020.

Ottenhoff TH, Kaufmann SH. **Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go?** PLoS Pathog 2012; 8 (5): e1002607

Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. **Tuberculosis 2007: from basic science to patient care.** [place unknown]: Bourcillier Kamps, New vaccines against tuberculosis 2007; 341-59.

Pai M, Menzies R. **Diagnosis of latent tuberculosis infection in adults.** [S.l.: UpToDate, Inc., 2009]. Disponível em: < http://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-latent-tuberculosis-infection-in-adults?source=search_result&selectedTitle=1%7E54>. Acesso em: 11 de nov 2012.

Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. **Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review.** Lancet Infect Dis 2004; 4 (12): 761-76.

Pan Y, Yang X, Duan J, Lu N, Leung AS, Tran V, et al. **Whole-genome sequences of four Mycobacterium bovis BCG vaccine strains.** J Bacteriol 2011; 193 (12): 3152-3.

Parida KS, Kaufmann HES. **Novel tuberculosis vaccines on the horizon. Current Opinion in Immunology** 2010; 22: 374–384.

Parish T & Stoker NG. **Mycobacteria.** In _____. Mycobacteria Protocols. Humana Press, 1st .ed. Totowa, New Jersey, 1998. p. 1.

Parra M, Yang AL, Lim J, Kolibab K, Derrick S, Cadieux N, et al. **Development of a murine mycobacterial growth inhibition assay for evaluating vaccines against Mycobacterium tuberculosis.** Clin. Vaccine Immunol 2009; 16 (7), 1025–1032.

Pedrozo C, Sant'Anna C, March MFP, Lucena S. **Clinical scoring system for paediatric tuberculosis in HIV-infected and non-infected children in Rio de Janeiro.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 413-5.

Pieters J, Garfield J. **Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages.** *Trends in Microbiology* 2002; 10 (3): 142-146.

Pinheiro RO, Dalcolmo M P, Sampaio EP. **Tuberculose e TBMR: mecanismos imunológicos e novas ferramentas de controle da doença.** RECIIS –R. *Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde* 2008; 2 (1): 97-104.

Pollock JM, Neill SD. ***Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle.** *Vet J* 2002; 163 (2): 115-27.

Porth CM. **Alterations in respiratory function: respiratory tract infections, neoplasms, and childhood disorders.** In: Porth CM, Kunert MP. *Pathophysiology: Concepts of Altered Health States.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2002: 615-619.

Prioli RP, Tanna A, Brown IN. **Rapid methods for counting mycobacteria—comparison of methods for extraction of mycobacterial adenosine triphosphate (ATP) determined by firefly luciferase assay.** *Tubercle* 1985; 66 (2): 99-108.

Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, et al. **A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response.** *Nature* 2004; 431 (7004): 84–7.

Rodriguez-Alvarez M, Mendoza-Hernandez G, Encarnacion S, Calva JJ, Lopez-Vidal Y. **Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level.** *Tuberculosis* 2009; 89 (2): 126–35.

Rojahn, M. Brasil. Ministério da Saúde. **Portal da Saúde - SUS. 2012.** Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4567/162/tuberculose:-brasil-reduz-numero-de-casos-em-354-no-ultimo-ano.html>>

Rosemberg J. **Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação.** *Boletim de Pneumologia Sanitária* 1999; 7: 5-29.

Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, Aagaard C, Barry CE, Andersen P. **Hypoxic response of *Mycobacteria tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins.** *J Bacteriol* 2002; 184: 3485–3491.

Sakula A. **BCG: Who were Calmette and Guérin?** *Thorax* 1983; 38: 9-6-812.

Sant'Anna CC. **Formas clínico-radiológicas** In: Sant'Anna CC, Bethlem N. *Tuberculose na infância.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica 1988; 36-52.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (2nd Edition) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)

Sant'Anna C, March MF, Barreto M, Pereira S, Schmidt C. **Pulmonary tuberculosis in adolescents: radiographic features.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 1566-8.

Scheinmann P, Refabert L, Delacourt C, Le Bourgeois M, Paupe J, de Blic J. **Paediatric tuberculosis in: Wilson R. Tuberculosis.** *Eur Respir Monograph*, 1997; 4.

Schram E, Weyens-van WA. **Improved ATP methodology for biomass assays.** *J Biolumin Chemilumin* 1989; 4 (1): 390-8.

Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. **Whole genome sequence analysis of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains.** *Vaccine* 2009; 27 (11): 1710-6.

Seki M, Udagawa T, Sugawara I, Iwama K, Honda I, Fujita I, et al. **The effect of passages during Japanese BCG vaccine production on genetic stability and protective efficacy.** *Vaccine* 2012; 30 (8): 1460-4.

Sester M, Sester U, Clauer P. **Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients.** *Kidney Int* 2004; 65 (5): 1826-1834.

Shenoi S, Friedland G. **Extensively drug-resistant tuberculosis: a new face to an old pathogen.** *Annu Rev Med* 2009; 60: 307-20.

Skeiky YA, Sadoff JC. **Advances in tuberculosis vaccine strategies.** *Nat Rev Microbiol* 2006; 4 (6): 469-76.

Skeiky YAW, Dietrich J, Lasco TM, Stagliano K, Dheenadhayalan V, Goetz MA, et al. **Non-clinical efficacy and safety of HyVac4:IC31 vaccine administered in a BCG prime-boost regimen.** *Vaccine* 2010; 28 (4): 1084-93.

Smith J. **Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulences.** *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16 (3): 463-496.

Sperhacke RD, Mello FC, Zaha A, Kritski AI, Rosseti ML. **Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8 (3): 312-7.

Succi RCM 1985. **BCG.** In CK Farhat, Fundamentos e Prática das Imunizações em Clínica Médica e Pediatria, Atheneu, Rio de Janeiro, p. 27-41.

Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. **PCR identification of Mycobacterium bovis BCG.** *J Clin Microbiol* 1997; 35: 566-9.

- Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. **Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success.** J Bras Pneumol 2007; 33 (3): 323-334.
- Thrupp L, Bradley S, Smith P, Simor A, Gantz N, Crossley K et al. **Tuberculosis prevention and control in long-term-care facilities for older adults.** Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25: 1097-1108.
- Timmins GS, Robb FJ, Wilmot CM, Jackson SK, Swartz H. M. **Firefly flashing is controlled by gating oxygen to light-emitting cells.** J Exp Biol 2000; 204: 2795-2801.
- Trovero A, Argüelles C, Cataldi A. **Preparation of a working seed lot of BCG and quality control by PCR genotyping.** Rev Argent Microbiol 2010; 42 (1): 4-10.
- Trunz BB, Fine P, Dye C. **Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness.** Lancet 2006; 367: 1173-80.
- Van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. **Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*.** Clin Microbiol Rev 2002; 15: 294-309.
- Vasconcelos-Junior AC, Araújo-Filho JA, Silva EB, Sousa EM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. **Limitations of the BCG vaccine and new prophylaxis strategies against human tuberculosis.** Einstein 2009; 7: 383-9.
- Walker KB, Brennan MJ, Ho MM, Eskola J, Thiry G, Sadoff J, et al. **The second Geneva Consensus: Recommendations for novel live TB vaccines.** Vaccine 2010; 28, 2259–2270.
- Wannalund, J, De Luca K. Stempel PDB. **Use of 14C-carboxyl-luciferin in determining the mechanism of the firefly luciferase catalyzed reactions.** Biochem. Biophys. Res. Commun 1978; 81: 987-992.
- Wilson T, Hastings W. **Bioluminescence.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol 1998; 14: 197-230.
- Wilson T. **Comments on the mechanisms of chemi- and bioluminescence.** Photochem. Photobiol 1996; 62: 601-606.
- Wood KV. **The Chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence.** Photochem. Photobiol 1995; 62: 662-673.
- World Health Organization. **BCG Vaccine.** Wkly. Epidemiol. Rec 2004; 79, 27–38.
- World Health Organization. **Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2008.** Geneva: World Health Organization; 2010.
- World Health Organization. **WHO report 2007: global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.** Geneva: World Health Organization; 2007.

World Health Organization. **Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World.** Geneva: World Health Organization, 2008.

World Health Organization. **Global tuberculosis control: Deaths due to tuberculosis among HIV – negative (per 100000 population per year), 2008. surveillance, planning, financing.** Geneva, 2006: WHO/HTM/TB/2006.362.

World Health Organization. **Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing.** WHO Report 2009. Geneva: World Health Organization, 2009.

World Health Organization. **Global tuberculosis control: Estimated HIV prevalence in new TB cases, 2009. Surveillance, planning, financing.** Geneva, 2006: WHO/HTM/TB/2006.362.

World Health Organization. **Global tuberculosis control: Estimated TB incidence rates, by country, 2009. Geneva, surveillance, planning, financing.** Geneva, 2006: WHO/HTM/TB/2006.362.

World Health Organization. **In vitro assays of BCG products.** WHO/TB/Technical Guide/9, 1977.

_____. WHO Expert committee on Biological Standardization. **Requirements for dried BCG vaccine.** Annex 2. WHO Technical Report Series No. 745, 1987; 60–92.

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

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

Zhang Y, Wallace RJ, Mazurek GH. **Genetic differences between BCG substrains.** Tuberc Lung Dis 1995; 76: 43–50.

Zignol M, Hosseini MS, Wright A, Weezenbeek CL, Nunn P, Watt CJ, Williams BG, et al. **Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis.** J Infect Dis 2006; 194: 479–85.

Zimmer K, Dräger KG, Klawonn W. **Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe® test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle.** J. Vet. Med. B 1999; (46): 137-140.

Waksman SA. **The conquest of tuberculosis** University of California Press; 1964.

Disponível em: <http://wellcometrust.wordpress.com/2011/03/24/world-tb-day-2011/>. Acesso em: 14/03/2012

Disponível em: <<http://linsky.com/2011/07/tuberculosis-transmission-and-symptoms/>>. Acesso em: 14/03/2012.

Disponível em: <<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/u1fig11.html>>. Acesso em: 14/03/2012.

8 - ANEXO A

Meios de Cultura: composição e preparo

A - Meio sólido de Lowenstein-Jensen

1 - Materiais, reagentes e equipamentos:

- 1.1. Béquer de várias graduações;
- 1.2. Pipetador automático;
- 1.3. Colher para pesar;
- 1.4. Tubos de ensaio 22x180 mm;
- 1.5. Gaze;
- 1.6. Rolhas de algodão com gaze;
- 1.7. Papel grau cirúrgico;
- 1.8. Bastão de vidro;
- 1.9. Funil de aço inox com tampa;
- 1.10. Quarto estufa 36-38 °C;
- 1.11. Balança analítica digital (SARTORIUS – Modelo: BP 610);

- 1.12. Placa aquecedora (IKA – Modelo: C-MAG HS10);
- 1.13. Meio de cultura Lownstein Jensen;
- 1.14. Glicerina 85% PA;
- 1.15. Ovos;
- 1.16. Estantes para tubo;
- 1.17. Gavetas plásticas;
- 1.18. Solução de álcool a 70%;
- 1.19. Garrafão de polipropileno;
- 1.20. Batedeira (Walita – Modelo: HL3129);
- 1.21. Coaguladores: Japonês – (HIRASAWA WORK.JICA – Modelo: C2000);
- 1.22. Bico de Bunsen.

2 - Procedimento

2.1. Preparo dos ovos:

2.1.1. Aguardar a chegada dos ovos necessários para a elaboração deste meio de cultura.

Verificar na tabela 8.1 abaixo, as proporções que devem ser seguidas;

2.1.2. Observar os ovos, verificando se estão quebrados, rachados ou com aparência amarelada; estes ovos devem ser descartados.

Tabela 8.1 - Relação da quantidade de insumos adicionados ao LJ.

Quantidades de ovos	Volume de ovos	Quantidade de base	Glicerina
5 dúzias (60 ovos)	± 3.000 mL	1.800 mL	36 mL
± 80 ovos	± 4.000 mL	2.400 mL	48 mL
100 ovos	± 5.000 mL	3.000 mL	60 mL
10 dúzias (120 ovos)	± 6.000 mL	3.600 mL	72 mL
15 dúzias (180 ovos)	± 9.000 mL	5.400 mL	108 mL
19 dúzias (228 ovos)	± 11.000 mL	6.840 mL	137 mL

2.2. Preparo da base:

- 2.2.1. Para 600 mL de água purificada pesar a quantidade de base indicada no frasco;
- 2.2.2. Adicionar a glicerina de acordo com a quantidade de base (tabela 8.1);
- 2.2.3. Homogeneizar e levar para dissolver em placa aquecedora ou bico de Bunsen, agitando ate completa dissolução;
- 2.2.4. Incubar a ampola contendo o bioindicador a uma temperatura de 55 °C a 60 °C por 24 horas. Se houver alteração de cor na ampola o meio deve ser descartado;
- 2.2.5. Deixar o meio em temperatura ambiente e usar no dia seguinte.

2.3. Elaboração do meio de cultura LJ:

- 2.3.1. No dia seguinte colocar os ovos imersos durante meia hora em solução de álcool a 70%. Retirando do álcool e enxugá-los em gaze estéril. Eliminar os ovos que apresentarem anormalidades e anotar a quantidade total de ovos descartados;
- 2.3.2. Quebrar os ovos, um a um, no béquer, a fim de medir o volume e bater com batedeira para homogeneizá-los;
- 2.3.3. Juntar a mistura de ovos, com a quantidade de base previamente esterilizada;
- 2.3.4. Fechar o garrafão e homogeneizar bem;
- 2.3.5. Filtrar em funil de aço inox forrado com gaze de oito dobras;
- 2.3.6. Distribuir assepticamente 15 mL em tubos de ensaio e fechar com rolha de gaze;
- 2.3.7. Colocar os tubos inclinados nas bandejas do coagulador;
- 2.3.8. Após a coagulação colocar em caixas devidamente identificadas com o lote, data e o coagulador onde foi processado;
- 2.3.9. Deixar o lote incubando a 37°C por 48 horas, a fim de verificar a esterilidade do meio;
- 2.3.10. Armazenar por no máximo 6 semanas.

B - Meio Líquido Sauton ¹/₄

1. Materiais, reagentes e equipamentos:

- 1.1. Béquer de 100, 500 e 1.000 mL;

- 1.2. Proveta de 1.000 mL e erlenmeyers de 250 mL;
- 1.3. Recipiente graduado de 20 litros;
- 1.4. Funil de vidro e papel filtro;
- 1.5. Bastão de vidro e espátula de aço;
- 1.6. Sacos plásticos para autoclavagem;
- 1.7. Pipeta sorológica;
- 1.8. Gaze e rolha de gaze;
- 1.9. Aquecedor e agitador magnético (Lab Line - Modelo: 1628);
- 1.10. Potenciômetro (Methrom – Modelo: 827);
- 1.11. Solução de citrato férrico amoniacal a 15%;
- 1.12. Solução tampão pH 7,0 e pH 4,0, para calibrar o potenciômetro;
- 1.13. Balança analítica digital (SARTORIUS – Modelo: BP 610);
- 1.14. Estufa bacteriológica;
- 1.15. Ácido cítrico monohidratado PA;
- 1.16. L-asparagina PA;
- 1.17. Fosfato de potássio dibásico;
- 1.18. Glicerina 85% PA;
- 1.19. Sulfato de magnésio heptahidratado;
- 1.20. Água potável filtrada;
- 1.21. Solução de hidróxido de sódio a 40%;
- 1.22. Pipetador automático Brand.

2. Procedimento:

- 2.1. Pesar e medir as matérias primas conforme tabela 8.2;

Tabela 8.2 - Reagentes necessários para o preparo do meio Sauton $\frac{1}{4}$

Reagentes	Peso (g)	Volume (mL)
Ácido Cítrico Monohidratado PA	0,55	-
L-asparagina PA	1,0	-
Citrato Férrico Amoniacal	0,0125	-

Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4)	0,125	-
Glicerina 85% PA	-	15
Sufato de Magnésio Heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2$)	0,125	
Água Purificada q.s.p	-	1.000

2.2. Medir a glicerina em proveta;

2.3. Dissolver a L-asparagina em cerca de 300 mL de água purificada, na placa aquecedora com aquecimento (em torno de 350 °C) e constante agitação, até completa dissolução;

2.4. Após a dissolução da L-asparagina, juntar o ácido cítrico, o citrato férrico amoniacal, o fosfato de potássio dibásico e o sulfato de magnésio heptahidratado. Misturar bem até completa dissolução;

2.5. Em um recipiente graduado, colocar parte da água, a glicerina, os reagentes dissolvidos acima e completar com água ao volume desejado. Homogeneizar bem em um agitador magnético. Retirar pequena amostra para a determinação do pH;

2.6. Corrigir o pH para a faixa de 6,95 a 7,05 com solução de hidróxido de sódio 40% ou ácido cítrico puro;

2.7. Filtrar em papel filtro. Distribuir 160 mL de meio em erlenmeyers de 250 mL. Arrolhar e proteger com papel cirúrgico;

2.8. Autoclavar a 121 °C por 20 minutos;

2.9. Conservá-lo em geladeira por no máximo 4 semanas.

C - Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias

1. Materiais, reagentes e equipamentos:

1.1. Solução de álcool a 70%;

1.2. Pano livre de fibras;

1.3. Amostras;

1.4. Vacina de Referência Nacional;

1.5. Pipetas graduadas de 1, 5, 10 e 20 mL;

- 1.6. Pipetas Pasteur;
- 1.7. Tubos com solução fisiológica 0,9%;
- 1.8. Erlenmeyers com Sauton $\frac{1}{4}$;
- 1.9. Tubos estéreis vazios;
- 1.10. Estantes para tubos;
- 1.11. Béquer de 500 mL;
- 1.12. Tubos com meio de cultura LJ (20 para cada teste);
- 1.13. Capela de fluxo laminar (VECO – Modelo: HLFS 12);
- 1.14. Estufa 36-38°C – quarto estufa;
- 1.15. Handy Step da Brand;
- 1.16. Erlenmeyers de 250 mL;
- 1.17. Erlenmeyers de 25 mL;

2. Amostragem:

- 2.1. Amostras de vacina da geladeira (GEL) - Total de 5 ampolas por lote.

3. Requisitos de análise:

- 3.1. Testar as ampolas quanto a presença de vácuo no dia do teste;
- 3.2. Fazer a desinfecção da capela de fluxo laminar;
- 3.3. O erlenmeyer que contém 99 mL de Sauton é distribuído com o Handy Step.

4. Procedimento:

- 4.1. Amostras GEL (tabela 8.3);
 - a) Dependendo da quantidade de doses, as ampolas vêm nas seguintes concentrações:
 - 10 doses – 1mg/mL
 - 20 doses – 2mg/mL
 - 50 doses – 5mg/mL

Tabela 8.3 - Reconstituição das amostras

Amostras	n° de doses	Q^{dade} de ampolas	Solução Fisiológica
	10 doses	5 ampolas	5 mL
GEL	20 doses	5 ampolas	10 mL
	50 doses	5 ampolas	25 mL
Referência	50 doses	1 ampolas	5 mL

- b) Fazer a diluição adequada de modo que a concentração final fique 1mg/mL conforme tabela acima;
- c) Dividir o Sauton $\frac{1}{4}$ conforme determinada na tabela 3.4;
- d) Pipetar 1 mL da amostra na concentração de 1mg/mL com pipeta de 1 mL rinsando-a nesta fase e colocá-lo no erlenmeyer 1 que contém 99 mL de Sauton $\frac{1}{4}$, rinsar a pipeta; agitar gentilmente 10 vezes para direita e 10 vezes para esquerda apoiado na bancada, suspender o erlenmeyer e agitar gentilmente 10 vezes para a direita e 10 vezes para esquerda;
- e) Pipetar 1 mL deste erlenmeyer, com pipeta de 1 mL, rinsando-a colocar no erlenmeyer 2 que contém 99 mL de Sauton $\frac{1}{4}$ e rinsar a pipeta; agitar gentilmente 10 vezes para direita e 10 vezes para esquerda apoiado na bancada, suspender o erlenmeyer e agitar gentilmente 10 vezes para a direita e 10 vezes para esquerda;
- f) Pipetar 4 mL do erlenmeyer 2 colocando-o no tubo que contém 4 mL de Sauton $\frac{1}{4}$ agitar gentilmente 10 vezes para direita e 10 vezes para esquerda apoiado na bancada, suspender o erlenmeyer e agitar gentilmente 10 vezes para a direita e 10 vezes para esquerda;
- g) Pipetar 2 mL do erlenmeyer 2 colocando-o no tubo que contém 6 mL de Sauton $\frac{1}{4}$ agitar gentilmente 10 vezes para direita e 10 vezes para esquerda apoiado na bancada, suspender o erlenmeyer e agitar gentilmente 10 vezes para a direita e 10 vezes para esquerda;
- h) Pipetar 2 mL do erlenmeyer 2 colocando-o no tubo que contém 14 mL de Sauton $\frac{1}{4}$ agitar gentilmente 10 vezes para direita e 10 vezes para esquerda apoiado na bancada, suspender o erlenmeyer e agitar gentilmente 10 vezes para a direita e 10 vezes para esquerda;

- i) Do erlenmeyer com diluição 4+4 e inocular 0,1 mL usando Handy Step em cada um dos 5 tubos da estante com LJ conforme Figura 8.1;
- j) Do erlenmeyer com diluição 2+6 e inocular 0,1 mL usando Handy Step em cada um dos 5 tubos da estante com LJ conforme Figura 8.1;
- k) Do erlenmeyer com diluição 2+14 e inocular 0,1 mL usando Handy Step em cada um dos 5 tubos da estante com LJ conforme Figura 8.1;
- l) Realizar a diluição e as inoculações em no máximo 15 minutos;
- m) Somente as reconstituições das amostras podem ser guardadas na geladeira, as diluições não;
- o) Após a inoculação espalhar o inoculo sobre a superfície do meio. Deixar os tubos “deitados” por 24 horas. No dia seguinte trocar as rolhas de algodão por de cortiça, esterilizadas por parafina;
- p) Colocar os tubos na estufa a 37°C, na posição vertical durante 4 semanas.

5. Cálculo:

Definições das situações em que os testes são aplicados:

Suponha que obtemos n tubos contendo colônias de bactérias. Observamos então o número de colônias de cada tubo que contém o meio inoculado com as amostras em particular, a uma diluição determinada. Se este tubo for superior a um limite (100 colonias) pré-estabelecido, denotamos a observação por “+”.

Por definição o conteúdo do tubo é legível se não houver contaminação ou estiver quebrado.

Se todos os tubos na mesma diluição são contáveis podemos obter:

- a) O total do número de colônias para esse nível onde S é a soma do nº de colônias contadas em cada tubo x , então Sx soma de todos os valores de x ;
- b) Sx^2 é a soma de todos os valores de x ao quadrado;

Podemos investigar se houve algum fator experimental interferindo na contagem em um determinado nível de análise de variância.

Análise de variância para cada nível de diluição:

O teste do qui-quadrado (χ^2) proposto indicará se ocorreu uma dispersão excessiva de dados, no nível de diluição considerado, e consiste em comparar o

resultado obtido pela aplicação da fórmula apresentada a seguir com os valores críticos tabulados.

$$\chi^2(n-1) = nSx^2 - Sx/Sx$$

Onde cada termo já foi calculado no item anterior.

Se o valor crítico encontrado através desta fórmula for maior que o valor crítico χ^2 apresentado na tabela abaixo, para o número de graus de liberdade (**n-1**) especificado, devemos suspeitar de algum fator experimental está interferindo nos valores observados e a hipótese de que as variações sejam puramente de erro amostral é rejeitada, nesse caso o teste deve ser repetido e as causas possíveis da variação devem ser investigadas (tabela A.4).

Tabela 8.4 - Distribuição do χ^2 com valores críticos para até n=12. Nível de significância = 0,05

N	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
n-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
χ^2 (p=0,05)	3,8	6,0	7,8	9,5	11,1	12,6	14,1	15,5	16,9	18,3	19,7

Exemplo numérico:

Suponha que dez tubos inoculados com uma determinada diluição tenham a seguinte contagem:

$$33, 22, 27, 18, 26, 26, 37, \text{ct}, 24, 22, 20$$

Dos dez tubos inoculados 9 são legíveis e contáveis um deles está contaminado (ct). Portanto n=9. O número de colônias $Sx=241$. A soma dos quadrados:

$$Sx^2 = 24^2 + 27^2 + 18^2 + 26^2 + 37^2 + 24^2 + 22^2 + 20^2 = 6723$$

$$S(x + 1) = 25^2 + 34^2 + 28^2 + \dots + 31^2 = 7214$$

Calculando:

$$Sx^2 + 25x + n = 6723 + 2241 + 9 = 7214$$

Concluimos que os cálculos estão corretos.

Calculamos então:

$$\chi^2 = Sx^2 - Sx/Sx = 10,07$$

Sendo que $n-1=8$, da tabela podemos obter $\chi^2 = 15,5$

Portanto, o χ^2 calculado é menor que o valor crítico, tabelado, e a variação não é significativa ao nível de 5% devendo ser proveniente de erro amostral simplesmente.

Cálculo do número médio de colônias (por nível de diluição):

Chamamos de nível de diluição (d) ao inverso da concentração. Por exemplo, se a concentração é $\frac{1}{2} \cdot 10^4$, d é 20×10^3 .

a) Se para uma diluição determinada todos os tubos são contáveis obtemos Sx , e a média é dada por:

$$\bar{x} = Sx/n$$

b) Se um ou mais tubos (menos que a metade) apresentar um número excessivo de colônias, crescimento confluyente ou contaminação, calcula-se a mediana (m).

Observando-se as contagens e colocando-se em ordem crescente a mediana é o número central (no caso do número total ser ímpar), ou média aritmética entre os dois valores centrais (no caso de se ímpar).

Neste exemplo, 2 tubos são excluídos por contaminação e o restante ordenado, temos:

80, 85, 93, 98, 99, 100+, 100+, 100+

A mediana de acordo com a convenção acima é dada por:

$$m = 98 + 99/2 = 98,5$$

Para facilitar, o resultado pode ser arredondado para o número inteiro par mais próximo, neste caso 98.

- c) Se exatamente a metade dos tubos é contável supõe-se como mediana o valor limite.
 d) Se mais da metade dos tubos é incontável, a média é denotada simbolicamente por “+” e os cálculos abandonados para este nível de diluição.

Cálculo do Número de Unidades Formadoras de Colônias:

O número de Unidades Formadoras de Colônias será calculado em função do número ótimo para leitura ω .

ω corresponde a 40% do limite da contagem 100 definido por cada laboratório em função de suas condições de trabalho (tipo de tubo utilizado e superfície do meio de cultura) principalmente.

Para estimar o número de Unidades Formadoras de Colônias calcula-se o valor acumulado, ou seja:

$$C_1 = \bar{x}_1 + \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3$$

$$C_2 = \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3$$

$$C_3 = 2\bar{x}_3$$

E comparam-se estes valores com ω .

Para	O n° de UFC/mL
$2\omega \geq \bar{x}_1 + \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 (C_1)$	$d_1/v. 1/2. (\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3)$
$(C_1) \bar{x}_1 + \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 \geq 2\omega \geq \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 (C_2)$	$d_2/v. \omega. \bar{x}_1/2\omega + \bar{x}_1 - (\bar{x}_2 + 2\bar{x}_3)$
$(C_2) \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 \geq 2\omega \geq 2\bar{x}_3 (C_3)$	$d_3/v. \omega. \bar{x}_2/2\omega + \bar{x}_2 - 2\bar{x}_3$
$(C_3) 2\bar{x}_3 \geq 2\omega$	$d_1/v. \bar{x}_3$

*v é o volume de suspensão inoculado em cada tubo

Exemplo numérico:

Para uma série de diluições foram obtidas:

MÉDIAS	VALORES ACUMULADOS

$\bar{x}_1 = 69$	$\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 = 140(C_1)$
$\bar{x}_2 = 69$	$\bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 = 71(C_2)$
$\bar{x}_3 = 69$	$2\bar{x}_3 = 40(C_3)$

Como $(C_1) 140 \geq 80 \geq 71 (C_2)$, usamos a fórmula da segunda linha da tabela acima sendo $2\omega = 80$.

$$d_2/v \cdot \omega \cdot \bar{x}_1/2\omega + \bar{x}_1 - (\bar{x}_2 + 2\bar{x}_3) = d_2/v \cdot 40 \cdot 69/80 + 69 - 71 =$$

$$d_2/v \cdot 35,4 \quad \rightarrow 20000/0,1 \cdot 35,4 = 7080000 = 7,08 \times 10^6$$

Observações:

1. Resultados

O resultado deve ser expresso em UFC/mL $\times 10^6$.

2. Limites de tolerância

2.1. Viabilidade

O valor GEL deve estar entre 2×10^6 a 10×10^6 .

2.2. Termoestabilidade

Não deve ser menor que 20% da contagem inicial.

GEL

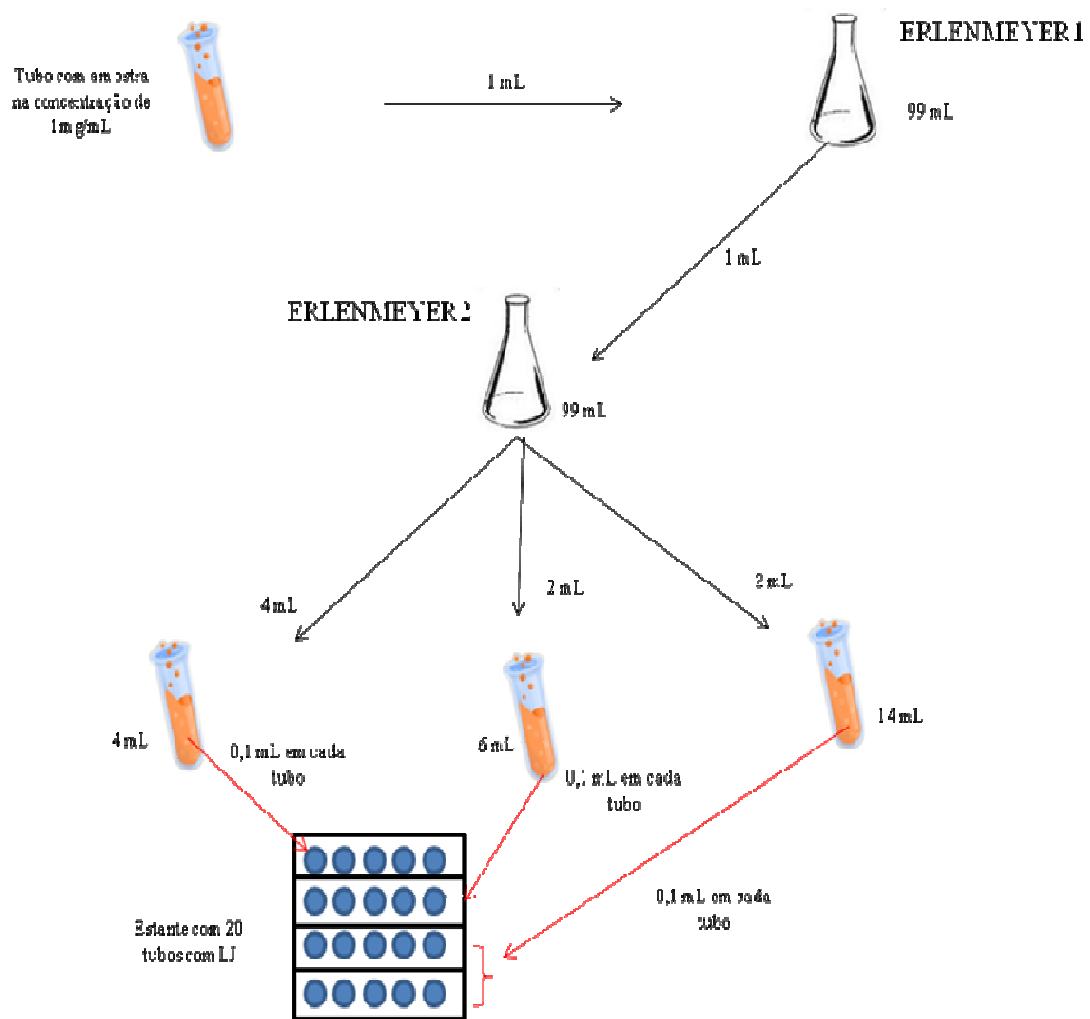


Figura 8.1 - Procedimento de diluição das amostras de vacina em meio Sauton 1/4.