

MARIA ESTHER DE MAGALHÃES MACHADO TONUS

Avaliação da Técnica de Redução do Sal de Tetrazol XTT  
para a Determinação da Viabilidade do BCG Moreau - RJ em  
Amostras de Vacina

MESTRADO PROFISSIONAL  
PPGVS/INCQS  
FIOCRUZ  
2008

Avaliação da Técnica de Redução do Sal de Tetrazol XTT  
para a Determinação da Viabilidade do BCG Moreau – RJ em  
Amostras de Vacina

MARIA ESTHER DE MAGALHÃES MACHADO TONUS

Mestrado Profissional  
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão

Rio de Janeiro  
2008

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação da Técnica de Redução do Sal de Tetrazol XTT para a Determinação da Viabilidade do BCG Moreau – RJ em Amostras de Vacina.

Autor: Maria Esther de Magalhães Machado Tonus

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

---

Prof. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

---

Profa. Helena Pereira da Silva Zamith  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

---

Profa. Leila de Souza Fonseca  
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Orientador: \_\_\_\_\_  
Prof. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde /  
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro  
2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Tonus, Maria Esther de Magalhães Machado

Avaliação da técnica de redução do sal de tetrazol XTT para a determinação da viabilidade do BCG Moreau – RJ em amostras de vacina. / Maria Esther de Magalhães Machado Tonus. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2008.

xvii, 80p., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde, Programa de Pós-Graduação em vigilância sanitária, Rio de Janeiro, 2008.

Orientador: Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão

1.Vacina 2.BCG 3.Viabilidade 4.Sal de Tetrazol 5. XTT. I. Título.

Evaluation of the tetrazolium salt XTT reduction technique to determine the BCG Moreau – RJ viability in vaccine samples.

À Deus

Ao meu filho Pedro e ao meu marido Rodrigo

Aos meus pais Murillo e Violeta

*Ó Criador Inefável que, dos tesouros de Vossa sabedoria,  
designastes as três hierarquias dos anjos  
e as colocastes em admirável ordem nos páramos celestes  
e que harmoniosamente dispusestes as partes do universo,  
Vós que sois a verdadeira fonte e o princípio supereminente  
da luz e da sabedoria,  
dignai-Vos infundir os raios de Vossa claridade  
sobre as trevas de minha inteligência,  
removendo de mim essas trevas em que nasci:  
o pecado e a ignorância.  
Vós, que desembaraçais a língua das crianças,  
ilustrai a minha palavra  
e infundi em meus lábios a graça de vossa bênção.  
Dai-me fineza para compreender,  
capacidade para reter,  
método e facilidade para aprender,  
sutileza para interpretar,  
graça e precisão para falar.  
Iluminai-me a introdução,  
orientai-me o progresso e  
e coroi-me a conclusão.  
Vós, que sois Deus e homem verdadeiro,  
que viveis e reinais pelos séculos dos séculos.  
Amém.*

Santo Agostinho

## AGRADECIMENTOS

À Célia pela orientação, pelos importantes conhecimentos transmitidos durante a realização desta dissertação e pela confiança em meu trabalho.

À Maria Regina, pelo apoio e importante participação na elaboração deste trabalho.

À Eliana e ao Antonio Carlos, pela amizade, apoio e participação como membros da equipe do controle da vacina BCG.

Ao INCQS, pela oportunidade de treinamento realizado no Instituto Dr. Carlos G. Malbrán – Buenos Aires, Argentina.

Ao Eduardo Leal, vice-diretor do INCQS por apoiar o enriquecimento desta dissertação.

Ao Dr. André Gemal, diretor do INCQS pelo incentivo ao estudo e aprimoramento da força de trabalho do Instituto.

Ao Will Robson e demais membros das equipes dos Setores de Meios de Cultura e de Esterilização, pela colaboração permanente.

À equipe do Setor de Esterilidade, pela análise da presença de elementos contaminantes nas vacinas empregadas no estudo.

À Dra. Cláudia Argüelles e demais membros da equipe do Instituto Dr. Carlos G. Malbrán (Buenos Aires – Argentina), por terem me acolhido muito bem e por terem fornecido informações importantes ao enriquecimento deste trabalho.

À Vera Machado da Coordenação do Programa da Qualidade do INCQS, pela disponibilização de recursos para análise da linearidade do método.

À Dra. Helena Wohlers e ao Dr. Márcio Labastie, pela atenção especial nos assuntos referentes à estatística.

Àqueles colegas do Departamento de Microbiologia e do INCQS que indiretamente contribuíram com este trabalho.

À equipe da Coordenação de Pós-Graduação do INCQS, pelo apoio na realização desta dissertação.

À Biblioteca do INCQS, pela atenção e pelos serviços prestados.

À minha amiga Yara, pelo incentivo e apoio especial e permanente.

## RESUMO

A quantidade de bacilos viáveis presente na vacina BCG é um importante requisito de qualidade deste produto, pois permite avaliar a consistência de produção. A contagem de colônias em meio sólido é o método oficial recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Farmacopéia Brasileira para a determinação da viabilidade do BCG. A difícil dispersão do BCG e seu crescimento lento conferem limitações ao método oficial, como a variabilidade dos resultados, a baixa reprodutibilidade e o prolongado tempo de análise. Este trabalho avaliou a aplicabilidade da técnica de redução do sal de tetrazol XTT como método alternativo para a determinação do número de viáveis em vacinas produzidas com o BCG Moreau-RJ. Foi demonstrada a linearidade das técnicas de redução do XTT realizadas com base em Kairo et al. (1999) e em Argüelles et al (2005) em 3, 24 e 48 horas de incubação. Os ajustes lineares foram obtidos pela técnica de redução do XTT a 1 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999), com coeficiente de determinação ( $R^2=0,99$ ), em conformidade com a Resolução N° 899/2003 da ANVISA referente à validação de métodos bioanalíticos. O melhor ajuste abrangeu as concentrações de vacina de 2,0 a 16,0 x 10<sup>6</sup> UFC/mL após 24 e 48 horas de incubação a 37°C. Nestas condições de ensaio os números de viáveis obtidos preliminarmente para cinco lotes de vacina BCG intradérmica empregados na rotina de imunização do país e para três amostras da vacina de referência BRABCG003 foram fortemente correlacionados ( $r=0,96$ ) àqueles fornecidos pelo método tradicional de cultivo em meio de Lowenstein-Jensen. Com base nos valores de referência preconizados pela Farmacopéia Brasileira, observou-se 100% de concordância na interpretação final dos resultados fornecidos pelos dois métodos para os cinco lotes de vacina avaliados. Portanto, além da forte correlação com o método oficial, a obtenção de resultados em 48 horas, o relativo baixo custo e a facilidade de execução dos ensaios são fortes incentivos aos estudos de validação da redução do XTT para a determinação da viabilidade do BCG em substituição ao método de contagem de colônias em Lowenstein-Jensen.

Palavras-chave: vacina – BCG – viabilidade – Sal de tetrazol - XTT



## ABSTRACT

The number of culturable particles in the BCG vaccine is an important requirement of quality control, therefore it allows to evaluate the production consistency. The colony counting on solid medium is the official method recommended by the World Health Organization and by the Brazilian Pharmacopeia to determine the viability of the BCG on final lots. The nature of the organism (difficult dispersion and slow growth) confers inter-laboratory variation of results and time consuming characteristics to the current test. The present work evaluated the applicability of the reduction of the salt of tetrazol XTT as an alternative method to determine the number of viable units in vaccines produced with the BCG Moreau-RJ. The method was linear by the techniques of reduction of the XTT based on Kairo et. (1999) and on Argüelles (2005) after 3, 24 and 48 hours of incubation. The linear adjustment was obtained by assays of reduction of XTT at 1 mg/mL based on Kairo et al. (1999), with coefficient of determination ( $R^2=0,99$ ) required by the Resolution N° 899/2003 / ANVISA concernem to the validation of bioanalytical assays. Optimal calibration curves enclosed vaccine concentrations from  $2,0 \times 10^6$  to  $16,0 \times 10^6$  CFU/mL after 24 and 48 hours of incubation at 37 °C. With these conditions the numbers of viable units obtained from five lots of intradermal vaccines used in the Brazilian routine of immunization and from three samples of the reference vaccine BRABCG003 had been strongly correlated ( $r=0,96$ ) to those provided by the current method of culture in Lowenstein-Jensen. Thus, we observed 100% of agreement between the final interpretations of the two methods of analysis considering the range of values referred by the Brazilian Pharmacopeia to BCG vaccine. Therefore, beyond the strong correlation with the official method, the reduction length of assay from 4 weeks to 48 hours, the relative low cost and the easiness of execution represent strong incentives to the validation of the reduction of XTT as an alternative method to replace the counting of colonies in Lowenstein-Jensen.

Keywords: vaccine – BCG – viability – Tetrazolium salts - XTT

## LISTA DE SIGLAS

TB – Tuberculose

Sida – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

OMS – Organização Mundial da Saúde

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

CGPNI – Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações

PNI - Programa Nacional de Imunizações

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INPPAZ – Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis

SFSTP – *Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

BCG – Bacilo de Calmette e Guérin

RJ – Rio de Janeiro

ID - Intradérmico

RD – Região de deleção

WHO – EPI – *World Health Organization – Expanded Programme on Immunization*

XTT - 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

UFC – Unidade Formadora de Colônia

CFU – Colony Forming Unit

CD4 – *Cluster of differentiation 4*

CD8 - *Cluster of differentiation 8*

mL – Mililitro

µm – Micrômetro

µL - Microlitro

mg - Miligrama

nm - Nanômetro

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

PPD – Derivado proteico purificado  
Th1 – Célula T *helper* 1  
NAD<sup>+</sup> -Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
CE – Carreador ou acoplador de elétrons  
BSM – Bissulfato de sódio menadiona  
SR – Solução de reação  
DO – Densidade ótica  
TTC – Cloridrato de Trifeniltetrazol  
NBT – Nitroblue  
NT – Neotetrazol  
INT – Iodonitrofeniltetrazol  
 $R^2$  – Coeficiente de determinação  
 $r$  – Coeficiente de correlação de Pearson  
LJ – Lowenstein-Jensen  
BRABCG003 – Vacina de referência de trabalho lote 003  
T3 – 3 horas de incubação  
T24 – 24 horas de incubação  
T48 – 48 horas de incubação

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Reação de redução do sal de tetrazol no sistema oxido – redutor NAD/NADH com participação de um agente acoplador ou carreador de elétrons (CE).....	11
FIGURA 2.	Estruturas do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) do XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) e das formazanas correspondentes.....	13
FIGURA 3.	Fluxograma do estudo de avaliação da técnica de redução do sal de tetrazol XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) como ensaio alternativo para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina.....	17
FIGURA 4.	Fluxograma de avaliação da linearidade do método de redução do sal de tetrazol XTT.....	27
FIGURA 5.	Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pela redução do XTT a 1 mg/mL pela técnica baseada em Kairo et al. (1999) para as concentrações da vacina BRABCG003 (2mg/mL), após 3 (T3), 24 (T24) e 48 (T48) horas de incubação.....	30
FIGURA 6.	Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pela redução do XTT a 2 mg/mL pela técnica baseada em Kairo et al. (1999) para as concentrações da vacina BRABCG003 (2mg/mL), após 3 (T3), 24 (T24) e 48 (T48) horas.....	31
FIGURA 7.	Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pela redução do XTT a 3 mg/mL pela técnica baseada em Kairo et al. (1999) para as concentrações da vacina BRABCG003 (2mg/mL), após 3 (T3), 24 (T24) e 48 (T48) horas de incubação.....	31
FIGURA 8.	Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelo branco e pelos controles negativo e de opacidade durante avaliação de linearidade da técnica de redução do XTT a 1 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) após 3, 24, e 48 horas de incubação.....	32
FIGURA 9.	Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelo branco e pelos controles negativo e de opacidade durante avaliação de linearidade da técnica de redução do XTT a 2 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) após 3, 24, e 48 horas de incubação.....	33
FIGURA 10.	Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelo branco e pelos controles negativo e de opacidade durante avaliação de linearidade da técnica de redução do XTT a 3 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) após 3, 24, e 48 horas de incubação.....	33

FIGURA 11.	Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 3 horas de incubação.....	35
FIGURA 12.	Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 24 horas de incubação.....	36
FIGURA 13.	Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 48 horas de incubação.....	36
FIGURA 14.	Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 3 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003.....	37
FIGURA 15.	Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 24 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003.....	37
FIGURA 16.	Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 48 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003.....	38
FIGURA 17.	Visualização da reação em microplaca da redução do XTT a 1 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999).....	39
FIGURA 18.	Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pela redução do XTT a 3 mg/mL pela técnica baseada em Argüelles et al.(2005) para concentrações da vacina BRABCG003 (2 mg/mL), após 3 (T3), 24 (T24) e 48 (T48) horas.....	40
FIGURA 19.	Controles de opacidade das diferentes concentrações da vacina BRABCG003 durante os períodos de incubação de 3, 24 e 48 horas em ensaios de redução do XTT a 3 mg/mL baseados em Argüelles et al.(2005).....	40
FIGURA 20.	Densidades óticas (DO) obtidas para o controle do meio líquido Sauton acrescido de solução de reação nos ensaios de redução do XTT a 3mg/mL baseados em Argüelles et al.(2005) realizados para construção das curvas analíticas.....	41
FIGURA 21.	Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 3 horas de incubação.....	42
FIGURA 22.	Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 24 horas de incubação.....	43

FIGURA 23.	Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 48 horas de incubação.....	43
FIGURA 24.	Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 3 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003....	44
FIGURA 25.	Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 24 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003.....	44
FIGURA 26.	Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 48 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003.....	45
FIGURA 27.	Visualização da reação em microplaca da redução do XTT a 3 mg/mL baseada em Argüelles et al. (2005).....	46

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Resumo do ajuste das retas de regressão nas diferentes condições avaliadas em ensaios de redução do XTT baseados em Kairo et al. (1999).....	35
TABELA 2.	Resumo do ajuste das retas de regressão nas diferentes condições avaliadas em ensaios de redução do XTT baseados em Argüelles et al. (2005).....	42
TABELA 3.	Correlação dos resultados obtidos por redução do XTT (1 mg/mL) com base em Kairo et al. (1999) e por contagem em LJ para lotes de vacina BCG-ID avaliados simultaneamente pelos dois métodos.....	47
TABELA 4.	Correlação dos resultados obtidos por redução do XTT (3 mg/mL) com base em Argüelles et al. (2005) e por contagem em LJ para lotes de vacina BCG-ID.....	48
TABELA 5.	Correlação dos resultados obtidos por redução do XTT com base em Kairo et al.(1999) e em Argüelles et al. (2005) para amostras de vacina BCG-ID.....	49

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.	Descrição dos controles realizados no estudo da linearidade da técnica baseada em Kairo et al. (1999).....	24
QUADRO 2.	Concentrações da vacina BRABCG003 analisadas para a construção das curvas analíticas pela técnica baseada em Kairo et al. (1999).....	25
QUADRO 3.	Concentrações da vacina BRABCG003 analisadas para a construção das curvas analíticas pela técnica baseada em Argüelles et al. (2005).....	27



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Tuberculose: a persistência de uma grave ameaça à saúde pública.....	1
1.2. A história do BCG.....	3
1.3. A vacina BCG e os requisitos de qualidade.....	5
1.4. Técnicas aplicadas à determinação da viabilidade do BCG.....	7
1.5. A técnica de redução de sais de tetrazol.....	10
1.5.1. Fundamento bioquímico da técnica.....	10
1.6. O controle da vacina BCG no Brasil.....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	17
3.1. Local de realização do estudo.....	17
3.2. Fluxograma do estudo.....	18
3.3. Vacinas.....	18
3.3.1. Vacina de referência de trabalho – BRABCG003.....	18
3.3.2. Vacina BCG – ID empregada na rotina de imunização do PNI.....	18
3.4. Ensaio de redução do sal de tetrazol XTT.....	19
3.4.1. Descrição da técnica baseada em Kairo e colaboradores (1999).....	19
3.4.1.1. Sal de tetrazol XTT.....	19
3.4.1.2. Carreador de elétrons (CE).....	19
3.4.1.3. Solução de reação (SR).....	20
3.4.1.4. Branco.....	20
3.4.1.5. Execução do ensaio.....	20
3.4.1.6. Leitura e cálculo.....	20
3.4.2. Descrição da técnica baseada em Argüelles e colaboradores (2005).....	21
3.4.2.1. Sal de tetrazol XTT.....	21
3.4.2.2. Carreador de elétrons (CE).....	21
3.4.2.3. Solução de reação (SR).....	21
3.4.2.4. Controle de opacidade.....	21
3.4.2.5. Execução do ensaio.....	22
3.4.2.6. Leitura e cálculo.....	22
3.5. Ensaio de contagem em meio sólido.....	22
3.5.1. Meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ).....	22
3.5.2. Meio líquido Sauton.....	23
3.5.3. Descrição geral do ensaio.....	23
3.6. Descrição das etapas do estudo.....	24

3.6.1. 1ª etapa: avaliação das condições de ensaio.....	24
3.6.1.1. Avaliação da linearidade do método baseado em Kairo e colaboradores (1999).....	24
3.6.1.2. Avaliação da linearidade do método baseado em Argüelles e colaboradores (2005).....	26
3.6.1.3. Tratamento estatístico dos dados.....	27
3.6.2. 2ª etapa: análise de amostras de vacina BCG – ID usadas na rotina de Imunização do PNI.....	28
3.6.2.1. Estudo da correlação entre resultados fornecidos pelas técnicas de redução do XTT e por ensaios de contagem em meio sólido de Lowenstein-Jensen.....	28
3.6.2.2. Estudo da correlação entre resultados fornecidos pelas técnicas de redução do XTT baseada em Kairo et al. (1999) e em Argüelles et al. (2005)....	29
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. Avaliação do método de redução do sal de tetrazol XTT baseado em Kairo et al.(1999).....	30
4.1.1. A redução do XTT nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL.....	30
4.1.2. Avaliação dos controles e do branco nas três concentrações do XTT.....	32
4.1.3. Estudo da linearidade da técnica de redução do sal de tetrazol XTT baseado em Kairo et al.(1999).....	34
4.2. Avaliação do método de redução do sal de tetrazol XTT baseado em Argüelles et al. (2005).....	40
4.3. Análise de vacinas BCG – ID usadas na rotina de imunização do PNI.....	47
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO</b>	

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Tuberculose: a persistência de uma grave ameaça à saúde pública

A tuberculose (TB) persiste no mundo como um importante problema de saúde pública gerando, conforme estimado em 2005, 1,6 milhões de mortes por tuberculose a cada ano. Cerca de 8,8 milhões de novos casos são registrados anualmente, estando 85% destes concentrados principalmente em países da África e da Ásia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2007a). No Brasil surgem por ano aproximadamente 85 mil novos casos da doença com seis mil mortes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Como uma doença infecto-contagiosa historicamente associada à pobreza, ao longo dos anos os investimentos nas áreas de desenvolvimento de drogas, vacinas e diagnóstico foram insuficientes, tendo permanecido lacunas na busca de recursos ao combate mundial da TB, que permaneceu como uma doença negligenciada e restrita aos países carentes (HUSSEY; HAWKRIDGE; HANEKOM, 2007).

Com o surgimento, na década de 80, da síndrome de imunodeficiência adquirida (Sida) e da sua evolução à pandemia, os países industrializados considerados, até então, livres ou com baixos índices de TB, foram obrigados a encarar a doença como uma realidade próxima e crescente. Após décadas de declínio, a incidência da TB aumentou nesses países, acometendo indivíduos suscetíveis em face da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida – HIV (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004a). Foi assim renovado o interesse mundial pelo risco representado pela TB, incrementado ainda pela imigração dos povos e pela crescente problemática da multirresistência às drogas (GRIFFIN et al., 1998).

As estratégias de controle da TB variam em função da situação de cada país. A disponibilidade de recursos, a prevalência da infecção por *M. tuberculosis*, a incidência da doença e a taxa de infecção concomitante pelo HIV constituem fatores avaliados para a implementação das ações de combate à TB, pois caracterizam diferentes contextos epidemiológicos (FROTHINGHAM; STOUT; HAMILTON, 2005).

Nos países com baixos índices populacionais da doença, a identificação de casos e o tratamento supervisionado, sobretudo de indivíduos considerados como grupo de risco, têm sido as medidas adotadas preferencialmente. Já nos países com

alta prevalência da TB, além de medidas como o controle da infecção, o incremento do diagnóstico, a pesquisa de multirresistência às drogas, o tratamento adequado e o acompanhamento de sua evolução, recomenda-se a administração da vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) logo após o nascimento, exceto em recém-nascidos portadores do HIV, mesmo que assintomáticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004a; 2007b; GIRARD; FRUTH; KIENY, 2005).

A vacina BCG é ainda a única medida preventiva contra as formas mais graves da doença - TB miliar ou disseminada e TB meníngea - quando aplicada em crianças logo após o nascimento, sendo a proteção conferida em pelo menos 80% dos vacinados (HUSSEY; HAWKRIDGE; HANEKON, 2007). Como estas formas da doença, quando não devidamente tratadas, levam à morte, o BCG já salvou milhares de vidas ao longo dos anos e permanece sendo uma medida importante no controle da TB na maior parte dos países onde a doença é endêmica. No entanto, os relatos não permitem afirmar que exista a prevenção da infecção primária e da reativação da TB latente, não sendo assim comprovada a eficácia da vacina na prevenção da principal fonte de dispersão do patógeno na população e, portanto da forma pulmonar da TB. Assim apesar de sua ação controversa, em face dos resultados conflitantes quanto à sua eficácia protetora, o BCG permanece como a vacina mais antiga ainda em uso, sendo aplicada em cerca de 100 milhões de crianças anualmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1999; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004a).

No Brasil, como em outros países, observa-se melhor eficácia protetora da vacina contra as formas mais graves da doença (TB miliar e meníngea), sobretudo em crianças vacinadas logo após nascimento (FILHO et al., 1990; JANEIRO, 2003; BRICKS, 2004; AZAMBUJA et al., 2006).

Atualmente em nosso país, o BCG intradérmico (BCG-ID) é aplicado obrigatoriamente em recém nascidos (BRASIL, 2004), sendo que a dose de reforço dos 6 aos 10 anos idade foi suspensa conforme Nota Técnica Nº. 66 do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). De fato, não foi demonstrado, até o presente, aumento de eficácia em resposta a revacinação com o BCG (HUSSEY; HAWKRIDGE; HANEKON, 2007). A imunidade protetora conferida pelo BCG requer a replicação do bacilo no organismo, não podendo assim haver a ação bloqueadora de uma resposta imune preexistente e que, portanto ocasiona a falha do BCG em indivíduos já

sensibilizados por outras micobactérias ou por vacinação anterior com o próprio BCG (DIETRICH; LUNDBERG; ANDERSEN, 2006).

## 1.2. A história do BCG

Em 1921, Albert Calmette e Camilla Guérin descreveram o BCG como uma cepa atenuada obtida a partir de *Mycobacterium bovis* infeccioso isolado de seu hospedeiro (DUCATI et al., 2006).

Atualmente sabe-se que o BCG foi originado mais propriamente de uma mutação ocorrida acidentalmente ao longo das passagens realizadas no decorrer de 13 anos para a obtenção de suspensões com maior dispersão do bacilo em meio batata biliada. Associada à alteração na morfologia das colônias, os pesquisadores observaram perda gradual da virulência original do *M. bovis*, uma vez que animais inoculados com o BCG desenvolviam sensibilidade tuberculínica e permaneciam livres de lesões tuberculosas. Desta forma Calmette e Guérin demonstraram, por meio de sucessivos experimentos em animais, que o BCG atendia aos critérios de cepa vacinal, pois ao mesmo tempo em que não produzia tuberculose progressiva, guardava a sua propriedade imunogênica, viabilidade e nível apropriado de virulência residual. Assim ao se multiplicar no indivíduo vacinado o BCG provia ao mesmo proteção contra infecções subseqüentes ou a “premunição” como foi denominada na época a ação protetora conferida pelo microrganismo (LUGOSI, 1992).

Essas constatações encorajaram Calmette, ainda no ano de 1921 em Paris, a administrar oralmente o BCG em uma criança com alto risco de desenvolver a TB, visto que sua mãe havia morrido da doença e que teria ainda que conviver com sua avó que também sofria da doença. Depois de vacinada, a criança permaneceu livre da TB por toda a vida. Naquele mesmo ano, em Paris, quando a tuberculose constituía-se um problema de saúde pública, foi feita a primeira vacinação com o BCG em centenas de recém-nascidos que não desenvolveram a tuberculose, mesmo tendo contato com pessoas doentes. A denominada “premunição”, foi traduzida como a redução da mortalidade pela TB de 25 para dois em 100 recém-nascidos de mães afetadas pela doença, o que gerou a expansão da vacinação para cerca de 5000 crianças na França (HAWGOOD, 1999).

Em 1928 o BCG foi reconhecido como cepa vacinal. Prevendo a expansão do

seu uso a outros países, Calmette e Guérin descreveram os procedimentos de cultivo do bacilo com o intuito de manter a inocuidade de sua recente descoberta, mesmo não tendo sido verificada a reversão da virulência original do microrganismo após experimentos em diferentes animais. No entanto, após o cultivo em diferentes laboratórios, contrariamente ao que temiam Calmette e Guérin, o que se observou foi a redução dos níveis de virulência residual com relação ao BCG original da cepa Pasteur. Estas observações foram resultantes de variações genéticas sofridas pelo BCG ao longo das passagens realizadas em diferentes países, tendo assim surgido diferentes cepas, com características variadas como taxa de crescimento, morfologia, expressão de antígenos e viabilidade. A associação destas variações aos diferentes processos de produção gerou vacinas cuja eficácia e reatogenicidade são de difícil avaliação, sobretudo quando aplicadas em países e grupos populacionais de características distintas (BLOOM; FINE, 1994; BEDWELL et al., 2001).

A adoção, em 1956, do sistema de lote semente para a manutenção do BCG constituiu a primeira medida adotada pela OMS objetivando o controle da produção da vacina a partir de um número limitado de cepas, com números limitados de passagens para a prevenção de variações genéticas capazes de modificar o poder protetor original do BCG (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; 1966; 2003; 2004a; MILSTIEN; GIBSON, 1990).

Atualmente, com base em avaliações moleculares do genoma, pode-se diferenciar o *M. tuberculosis* e o *M. bovis* das cepas do BCG pela ausência, nestas últimas, de um segmento de DNA denominado RD1 (região de deleção primária). Outras regiões de deleção, como RD2 e RD16, e números de cópias da sequência de inserção IS1986 e a presença e expressão de genes permitem a diferenciação entre as cepas do BCG, sendo atualmente sugerida a existência de dois principais grupos: BCG Pasteur; Copenhagen; Glaxo; Tice e BCG Tóquio; Moreau; Rússia; Sweden (BENÉVOLO et al., 2005).

Segundo a OMS, em termos de eficácia protetora não foi demonstrada até o presente, a existência de diferenças entre as cepas do BCG, não havendo consenso global quanto ao uso preferencial de uma determinada cepa em detrimento de outra (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004a).

O BCG chegou ao Rio de Janeiro em 1925, quando o médico uruguaio Dr. Julio Elvio Moreau entregou ao pesquisador brasileiro Arlindo de Assis uma amostra da cepa

vacinal que havia sido distribuída pelo Instituto Pasteur de Paris. Foi assim que a cepa empregada até hoje em nosso país recebeu a denominação BCG Moreau – RJ (BENÉVOLO et al., 2005). Desta forma, a administração do BCG foi introduzida no Brasil por Arlindo de Assis em 1927, quando recém-nascidos foram vacinados por via oral, tendo a vacinação intradérmica sido iniciada em 1973 (DUCATI et al., 2006).

### **1.3. A vacina BCG e os requisitos de qualidade**

A vacina BCG é uma suspensão liofilizada do Bacilo de Calmette e Guérin. O método clássico de produção deste imunobiológico consiste basicamente no cultivo do deste microrganismo em película na superfície de meio de cultura líquido Sauton, coleta dos véus após seis a nove dias de incubação a 37 °C, filtração, pesagem da massa bacilar, adição do diluente glutamato de sódio, homogeneização por meio de esferas de vidro ou de aço inoxidável, preparo da suspensão final, envasamento e liofilização (BLOOM; FINE, 1994).

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

A vacinação com o BCG constitui-se em uma infecção artificial que, como outras micobactérias, é capaz de induzir alguma proteção contra a TB. Uma vez administrado, o BCG fagocitado por macrófagos é transportado para linfonodos sendo desencadeada resposta imune de natureza celular aos antígenos micobacterianos. Assim, linfócitos T *helper* (CD4 e CD8) secretam citocinas e fatores macrófago-estimulantes importantes ao desenvolvimento do processo granulomatoso e à contenção do patógeno evitando a sua dispersão. Desta forma, o efeito protetor da vacinação consiste na prevenção da dispersão do bacilo por via hematogena a partir do local da infecção primária, sendo esta ação mediada por linfócitos T induzidos pela primeira exposição ao BCG. O risco do desenvolvimento das formas graves da doença é assim reduzido (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993).

Portanto, a necessidade de multiplicação e permanência do BCG no organismo explica a razão da quantidade de bacilos viáveis presente na vacina ser um fator essencial à intensidade e duração da proteção conferida pelo produto e assim um requisito de qualidade essencial no controle da qualidade do mesmo.

De fato, estudos já demonstraram que a viabilidade do BCG na vacina pode influenciar a sua habilidade em conferir proteção à TB. Bacilos mortos são capazes de produzir hipersensibilidade tuberculínica, porém não produzem imunidade protetora. A imunidade celular do tipo Th1 envolve tanto células T como macrófagos, e requer bacilos vivos para a indução de proteção contra patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* (GRIFFIN et al., 1998; KAWAMURA, et al., 1994; ORME, 1988).

Como em outras micobactérias, a parede celular rica em lipídeos confere hidrofobicidade ao BCG dificultando a sua dispersão em soluções, devido à sua tendência natural à formação de grumos. Este aspecto característico do microrganismo, aliado às etapas críticas do processo de produção da vacina, como a precisão na pesagem da massa bacilar, stress mecânico da homogeneização e a liofilização, são fatores essenciais à manutenção dos níveis de viabilidade do BCG e a homogeneidade do produto final. Desta forma, a proporção de bacilos que permanecem viáveis no produto final reflete o efeito de etapas importantes do processo de produção na qualidade deste imunobiológico. Isso faz da viabilidade do BCG um importante indicador de uniformidade e consistência de produção da vacina, que visa verificar a manutenção das características originais do produto conforme declarado pelo fabricante por ocasião do registro do produto junto à autoridade nacional de controle (LUGOSI, 1992; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987; 1993).

A adoção do sistema de lote semente e o desenvolvimento das técnicas de liofilização para melhor preservação da vacina possibilitaram à OMS formular em 1966 a primeira série de especificações de qualidade para a vacina BCG (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1966).

Em 1974, com a introdução do BCG em seu programa de imunizações – *World Health Organization - Expanded Programme on Immunization* (WHO-EPI) - e, portanto com a ampla utilização do produto de diferentes origens, a OMS reforçou a importância da realização de controles visando garantir, com certa margem de segurança, a imunogenicidade das vacinas sem o aumento de sua reatogenicidade, ou seja, do risco da ocorrência de lesões cutâneas acentuadas e de outras reações adversas aos recém-nascidos e crianças vacinadas. Assim, a Associação Internacional de Padronização de Biológicos promoveu no ano de 1976, em Bilthoven, uma ampla discussão com base em estudos colaborativos que objetivaram comparar os resultados de análises de lotes de vacina de diferentes origens. Naquela ocasião foram avaliados dados referentes às



análises de determinação de peso seco, viabilidade do BCG, termoestabilidade (degradação acelerada) e reatividade cutânea. Estas avaliações permitiram o melhor delineamento dos controles realizados durante a produção e no produto final, demonstrando-se o grau de importância de cada parâmetro analisado para a garantia da qualidade da vacina (SEKHUIS; FREUDENSTEIN; SIRKS, 1977).

A série vigente de requerimentos técnicos da OMS para a vacina BCG liofilizada reúne critérios mínimos necessários para a produção e controle do produto. Indicam-se avaliações de viabilidade do bacilo, termoestabilidade, sensibilidade tuberculínica, pesquisa de micobactéria virulenta e esterilidade bacteriana e fúngica para o controle do produto final (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

#### **1.4. Técnicas aplicadas à determinação da viabilidade do BCG**

Dentre os controles preconizados para o produto final, a contagem de unidades formadoras de colônias em meio sólido é a técnica oficialmente recomendada pela Farmacopéia Brasileira e pela OMS para a determinação da viabilidade do BCG e da termoestabilidade da vacina. Em linhas gerais, a técnica consiste basicamente no preparo de diluições da vacina em meio de cultura líquido, inoculação de volumes destas diluições na superfície de meio sólido de sensibilidade comprovada (Lowenstein-Jensen, Ogawa e Middlebrook 7H11) incubação a  $37 \pm 1$  °C por quatro a cinco semanas e contagem das colônias, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) do produto reconstituído conforme orientação do fabricante (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977; BRASIL, 2002).

Até a sua introdução oficial pela OMS em 1967, essa técnica foi aplicada durante vários anos apesar de indefinições quanto a sua eficiência e ocorrência de erros experimentais. Estudos colaborativos realizados posteriormente revelaram que o erro experimental associado à diluição das vacinas era bem maior do que o demonstrado nas primeiras avaliações da técnica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977).

Análises interlaboratoriais permitiram constatar a existência de diferenças significativas entre os números de unidades viáveis obtidos nos laboratórios que avaliaram os mesmos lotes de vacina aplicando a técnica de contagem em meio sólido recomendada pela OMS. Na ocasião, os autores atribuíram as variações observadas, em grande parte, à necessidade de avaliações criteriosas por meio de experimentos

preliminares para a escolha das diluições adequadas a serem usadas no teste final, de forma a obter contagens aceitáveis para a análise estatística. Dentre outros fatores, o tamanho dos grumos presentes na vacina e o meio de cultura empregado foram citados como capazes de induzir as diferenças observadas entre os laboratórios (SEKHUIS; FREUDENSTEIN; SIRKS, 1977).

De fato, as condições experimentais para a realização dessa técnica requerem cuidadosa padronização, para que o tratamento estatístico demonstre a inexistência de variações que ultrapassem àquelas previstas pela distribuição de Poisson, e que são atribuídas a erros experimentais. Desta forma visando facilitar a padronização das condições de ensaio e a obtenção de contagens de colônias possíveis de serem avaliadas estatisticamente, a OMS forneceu instruções e recomendações mais detalhadas da técnica e que ainda permanecem em vigor (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977).

Apesar da disponibilidade dessas recomendações oficiais vários autores ainda se referem à técnica como de grande variabilidade e baixa reprodutibilidade, sobretudo para a vacina preparada por meio da técnica tradicional de cultivo na superfície de meio líquido. A massa bacilar triturada adquire heterogeneidade com elevada frequência de grumos de dimensões variáveis, de difícil dispersão em suspensões, podendo inclusive gerar resultados subestimados. Assim a ocorrência de grumos após a reconstituição da vacina pode indicar baixa viabilidade, uma vez que a semeadura de um grumo ou agregado de bacilos fornece apenas uma colônia ou unidade formadora de colônia (STAVRI et al., 1974; GHEORGHIU; LAGRANGE; FILLASTRE, 1988; GHEORGHIU; LAGRANDERIE; BALAZUC, 1996).

Tendo em vista todas as limitações oferecidas pela técnica convencional de cultivo em meio sólido, a OMS incluiu, em sua última série de requerimentos técnicos, a técnica de dosagem de adenosina trifosfato (ATP) por reação de bioluminescência como método alternativo para determinação rápida da viabilidade do BCG (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

A técnica de dosagem do ATP é fundamentada na reprodução *in vitro* da reação de bioluminescência observada em insetos que emitem luminosidade. A emissão de bioluminescência ocorre como produto da reação que depende da presença de ATP, das enzimas luciferina e luciferase, de oxigênio e de íons magnésio. A intensidade da luminescência é dada em função da concentração de ATP quando os demais

componentes da reação são adicionados em excesso. Assim, quando aplicada à determinação do número de viáveis presentes na vacina BCG, o ATP presente em bacilos vivos é extraído e dosado. O resultado corresponde assim à quantidade de ATP extraído e é calculado pela diferença entre o ATP total e o ATP livre presentes na suspensão. A luminescência emitida é assim proporcional à quantidade de ATP presente na amostra, sendo medida em bioluminômetro e expressa em unidades de luminescência (GHEORGHIU; LAGRANDERIE, 1979).

Existem relatos de que a aplicação deste método oferece algumas limitações como a dosagem equivocada do ATP retido em células mortas incapazes de formar colônias, além da escolha e padronização criteriosas dos métodos de extração, e ainda relatos de que as dosagens seriam afetadas pelo nível de agregação das células (PRIOLI; TANNA; BROWN, 1985; ASKGAARD et al., 1995).

Mesmo reconhecendo as vantagens oferecidas pela dosagem do ATP com relação à contagem em meio sólido, como a rapidez e níveis adequados de precisão e baixo custo operacional, a OMS, com base na existência de fraca correlação entre os resultados de viabilidade e cultivo, continua buscando métodos alternativos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004c).

Dentre outras técnicas, a determinação de viabilidade por redução de sais de tetrazol deverá, segundo a OMS, ser em breve incluída em estudos de validação quando seus resultados serão comparados àqueles fornecidos pela técnica convencional (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006).

Publicações relatando a aplicabilidade desses sais no estudo de microrganismos de crescimento lento, inclusive na avaliação de concentrações mínimas inibitórias de antibióticos contra micobactérias patogênicas (THOM et al., 1993; GOMEZ-FLORES et al., 1995; MSHANA et al., 1998), antecederam o desenvolvimento do ensaio de determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina liofilizada utilizando os sais de tetrazol 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) e 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (KAIRO et al., 1999).

## 1.5. A técnica de redução de sais de tetrazol

Na busca de um meio rápido de quantificar a capacidade proliferativa de células eucarióticas, foi desenvolvido um método capaz de medir o número de células viáveis com base na utilização dos sais de tetrazol como substratos que uma vez metabolizados geram produtos dotados de coloração, podendo ser medidos por colorimetria. Assim, tendo como base a capacidade destes sais indicarem a atividade de enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias, Mosmann (1983) os empregou como indicadores de atividade metabólica.

Desta forma, vários autores relataram a utilização dos sais de tetrazol em estudos relacionados à viabilidade, toxicidade e proliferação de células animais expostas a drogas, hormônios e toxinas (DENIZOT; LANG, 1986; HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989; ROEHM et al., 1991; SLADOWSKI et al., 1993), e em outros estudos na área microbiológica (PECK, 1985; STEVENS; OLSEN, 1993; ROSLEV; KING, 1993; MA; NICHOLL, 1996).

O estudo da influência de variáveis, adequação e a padronização das condições de ensaio têm permitido a continuidade da aplicação desta técnica a diferentes fins nas áreas de microbiologia médica e ambiental, como o controle da atividade biológica de lodo ativado e controle de biomassa (TABOR; NEIHOF, 1982; BENSALD; THIERIE; PENNINGX, 2000; McCLUSKEY; QUINN; McGRATH, 2005; KUHN et al., 2003; HONRAET; GOETGHEBEUR; NELIS; 2005), estudos de suscetibilidade e multirresistência a drogas (HAWSER et al., 1998; DE LOGU et al., 2001; DE LOGU et al., 2003; SANDE et al., 2005); pesquisa da presença de micobactéria em derivado proteico purificado (PPD) (BEDWELL; KAIRO; CORBEL, 2001) e desenvolvimento de drogas (WILLIAMS et al., 2003; GOMEZ-FLORES et al., 1995; MORIARTY; ELBORN; TUNNEY, 2005; AL-BAKRI; AFIFI, 2007).

### 1.5.1. Fundamento bioquímico da técnica

Os sais de tetrazol constituem um grupo de compostos orgânicos heterocíclicos que vêm sendo empregados como indicadores de reações de oxido-redução em sistemas vivos desde 1894 (LIU et al., 1997).

Como receptores de elétrons, estes compostos catiônicos são reduzidos por ação enzimática, gerando sinais de coloração intensa detectáveis espectrofotometricamente e expressos em densidade ótica.

Assim, na medida em que ocorre a reação, o sal é convertido de sua forma oxidada para a forma reduzida denominada formazana, sendo este, portanto, o produto da reação e cuja dosagem é feita com base na alteração de coloração e intensidade do substrato original da reação (ALTMAN, 1974; LIU, et al., 1997).

A taxa de respiração celular é considerada uma medida de atividade microbiológica e pode ser estimada indiretamente pela atividade do sistema transportador de elétrons empregando-se os sais de tetrazol como receptores artificiais que competem com o oxigênio na captura de elétrons (McCLUSKEY; QUINN; McGRATH, 2005). Estudos bioquímicos demonstraram que a clivagem do anel tetrazol e a conseqüente produção de cristais de formazana ocorrem por ação de enzimas pertencentes à cadeia respiratória, como desidrogenases ou flavoproteínas, o que caracteriza esta reação como exclusiva de células metabolicamente ativas. Assim, conforme ilustrado na FIGURA 1, a redução dos sais de tetrazol ocorre pela ação de coenzimas doadoras de elétrons, como o NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) (SLATER, 1959; CESARI; RIEBER, IMAEDA, 1969; HATZINGER et al., 2003).

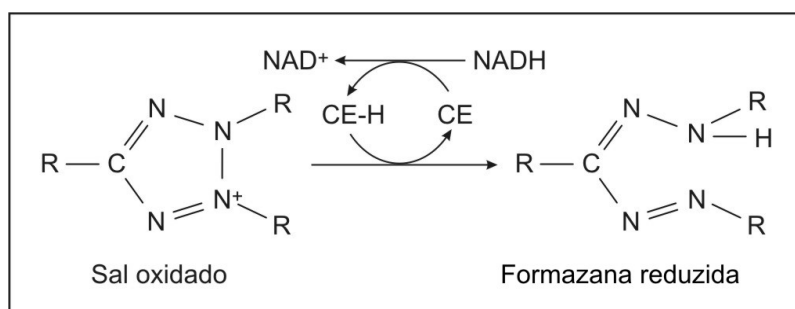


FIGURA 1. Reação de redução do sal de tetrazol no sistema oxido - redutor NAD/NADH com participação de um agente acoplador ou carreador de elétrons (CE).

À medida que o emprego desses compostos, inicialmente restrito aos estudos qualitativos, evoluiu para fins quantitativos, houve a necessidade da melhor caracterização das propriedades dos reagentes e dos produtos da reação buscando a sua adequação aos objetivos da pesquisa (ALTMAN, 1974).

Os sais de tetrazol disponíveis diferem quanto à solubilidade em soluções aquosas e às formazanas produzidas, que por sua vez também apresentam variações quanto à solubilidade e coloração dos cristais. A insolubilidade da formazana é vantajosa em pesquisas que objetivam a identificação do local de biorredução no sistema estudado, pois o depósito do produto da reação é restrito ao local da reação (ALLEN, 1965). Por outro lado, em ensaios que objetivam a medição de efeitos correlacionados à quantidade de formazana produzida por células, como na avaliação de viabilidade ou proliferação celular sob condições pré-estabelecidas, é indicada a utilização de sais de tetrazol que geram formazanas solúveis em soluções aquosas (PAULL et al., 1988).

O MTT requer a utilização de solventes orgânicos anteriormente à análise espectrofotométrica em leitor de microplacas. Esta etapa prolonga o tempo de incubação, confere variabilidade aos resultados devido à dissolução incompleta dos cristais de formazana além de favorecer a formação de aerossóis no momento da aplicação do solvente, implicando em questões de biossegurança (ROSLEV; KING, 1993).

Já o XTT, sintetizado em 1988, é diferenciado dos demais sais de tetrazol pela presença de dois grupos sulfônicos ionizados carregados negativamente e que conferem hidrossolubilidade ao sal. Quando reduzido, a carga positiva do núcleo tetrazol é extinta pela clivagem do anel, sendo, no entanto mantida a carga duplamente negativa dos grupos sulfonados, o que proporciona solubilidade a formazana produzida na reação e, portanto sua difusão facilitada a partir da célula ou local de redução (FIGURA 2) (PAULL et al., 1988).

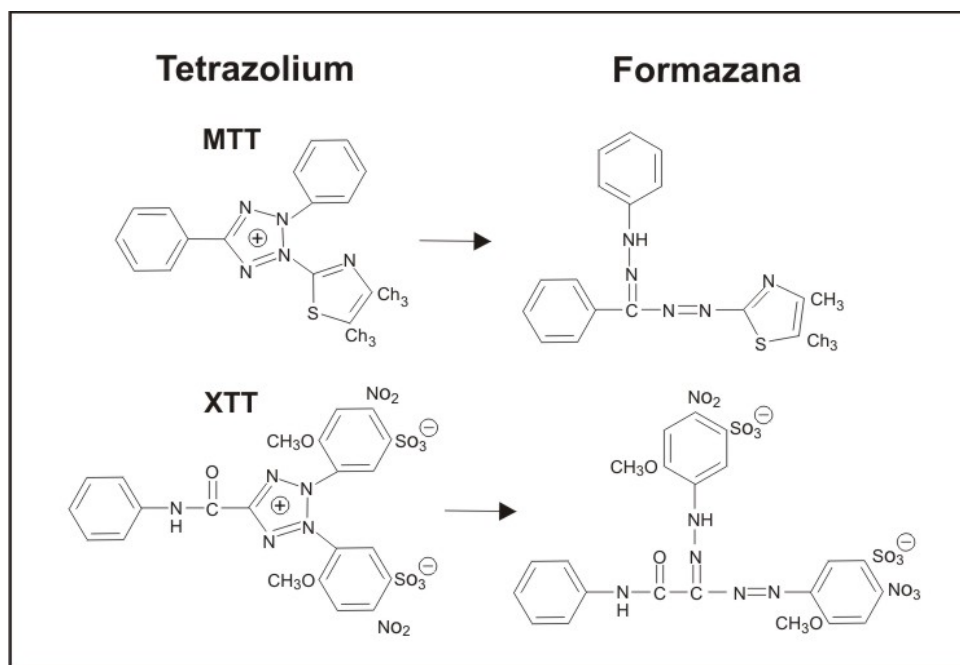


FIGURA 2. Estruturas do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) do XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) e das formazanas correspondentes. Fonte: SCUDIERO et al., 1988.

Apesar de dispensar o uso de solventes orgânicos, a reação de redução do XTT requer a utilização de um agente acoplador de elétrons que acelera a reação (SCUDIERO et al., 1988; GARN et al., 1994).

O local da reação de redução na célula tem sido extensivamente investigado, sobretudo em células eucarióticas e, apesar de normalmente associada à cadeia respiratória em mitocôndrias e atribuída à ação da ubiquinona (Q) e ao citocromo *c*, tal exclusividade é bastante discutida (SLATER, 1959, BERRIDGE; TAN, 1993; LIU et al., 1997). Já em células procarióticas, a reação de redução de sais como o XTT, MTT e WST-1 (4-(3-4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazol-5-yl)-1,3-benzenedisulfonate) tem sido associada a vesículas localizadas na membrana celular no nível de atividade das enzimas que fazem parte da cadeia respiratória (McCLUSKEY; QUINN; McGRATH, 2005).

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

Diversas publicações apontam o uso dos sais de tetrazol como o MTT, o

cloridrato de trifeniltetrazol (TTC), o nitroblue (NBT), o neotetrazol (NT), e o iodonitrofeniltetrazol (INT), em estudos referentes às micobactérias (GOMEZ-FLORES, 1995; MSHANA et al., 1998; THOM et al., 1993; BEDWELL; KAIRO; CORBEL, 2001). Dentre outros sais, o MTT é mais frequentemente citado, tendo o sistema oxido-reductase NADH-MTT sido avaliado em frações obtidas de *Mycobacterium smegmatis* e sua atividade mais associada aos fragmentos de membrana plasmática e mesossomal (CESARI, RIEBER; IMAEDA, 1969).

Mais recentemente, estudos comparativos demonstraram a equivalência entre a redução do MTT e do XTT por *M. tuberculosis* quando a técnica foi usada para avaliar do crescimento de cepas padrão após exposição à rifampicina, estreptomicina e isoniazida (DE LOGU et al., 2001). O uso do XTT forneceu resultados equivalentes e foi considerado vantajoso, uma vez que requer apenas três a oito dias de ensaio ao invés de três semanas como prevê o método clássico de avaliação da suscetibilidade de *M. tuberculosis* a diferentes antibióticos e que consiste em diluição e cultivos em ágar (DE LOGU et al., 2003).

A adequação do sistema microrganismo - sal de tetrazol foi também demonstrada em estudos da aplicabilidade da técnica de redução dos sais de tetrazol MTT e XTT para a determinação de viáveis em amostras de vacina BCG preparadas com as cepas Japonesa, Glaxo, Tice, Sofia, Moreau e Pasteur 1173P2. Por meio de estudos comparativos entre esta técnica e a convencional em cultivo de meio sólido, pesquisas demonstraram que os resultados fornecidos pela redução dos sais de tetrazol, sobretudo o XTT, são bem mais precisos e desprovidos de tendências, o que confere à técnica melhor repetitividade (KAIRO et al., 1999; STEFANOVA; ZHELEV, 2003; JANASZEK-SEYDLITZ, 2004; ARGÜELLES et al., 2004; 2005). Deve ser mencionada a inexistência, até o presente, de publicações referentes à aplicação da técnica de redução do XTT na determinação da viabilidade do BCG na vacina produzida no Brasil com a cepa Moreau – RJ.

## **1.6. O controle da vacina BCG no Brasil**

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro – RJ, vem realizando desde



1984, o controle da qualidade dos lotes de vacina BCG de uso intradérmico (BCG-ID) empregados no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde. Com este propósito são analisados, de rotina, em média 250 lotes do produto a cada ano, atendendo à demanda da Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações (CGPNI) à qual são fornecidos subsídios técnicos que garantam a utilização de lotes do produto de acordo com especificações mínimas previstas pela Farmacopéia Brasileira e pela OMS (BRASIL, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

Os lotes de vacina BCG são avaliados quanto à esterilidade bacteriana e fúngica, determinação de unidades viáveis do BCG, termoestabilidade, homogeneidade, identidade para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), pesquisa de micobactérias virulentas e pH.

Conforme abordado anteriormente, análise de viabilidade e termoestabilidade da vacina BCG é realizada pela técnica de contagem em meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ), que apesar das suas limitações, ainda é utilizada no INCQS conforme recomendação da OMS e da Farmacopéia Brasileira (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987; BRASIL, 2002). Os esforços que objetivam o aprimoramento do controle e a melhoria dos resultados são justificáveis, implicando na avaliação de métodos alternativos que ofereçam maior precisão. De fato, existe a necessidade da revisão dos requerimentos de qualidade da vacina BCG em vigor visando a atualização de metodologias e padrões empregados no controle, conforme abordado em recentes encontros de especialistas da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2003; 2004c; 2006).

Dentre outras técnicas, a determinação da viabilidade por redução de sais de tetrazol deverá, segundo a OMS, ser em breve incluída em estudos de validação quando será avaliada e seus resultados comparados àqueles fornecidos pela técnica convencional (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). Os países interessados deverão estar aptos a participar do estudo.

Desta forma, torna-se imprescindível ao INCQS, como laboratório oficial de controle no Brasil, o domínio de métodos alternativos, visando a sua participação em estudos interlaboratoriais e a possível implantação de uma nova metodologia no Instituto.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Contribuir para o aprimoramento do controle da qualidade da vacina BCG-ID no INCQS avaliando a aplicabilidade da técnica de redução do sal de tetrazol XTT como ensaio alternativo para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina preparadas com a cepa BCG Moreau - RJ.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Padronizar a técnica de redução do sal de tetrazol XTT na contagem de BCG viáveis avaliando a linearidade frente a diferentes concentrações do sal e tempos de incubação.
- Correlacionar os resultados obtidos por redução do sal de tetrazol XTT utilizando a técnica baseada em Kairo e colaboradores (1999) com aqueles obtidos pela técnica de contagem em meio de Lowenstein-Jensen para lotes de vacina usados na rotina de imunização da CGPNI.
- Correlacionar os resultados obtidos por redução do sal de tetrazol XTT utilizando a técnica baseada em Argüelles e colaboradores (2005) com aqueles obtidos pela técnica de contagem em meio de Lowenstein-Jensen para lotes de vacina usados na rotina de imunização da CGPNI.
- Correlacionar os resultados obtidos por redução do sal de tetrazol XTT utilizando as técnicas baseadas em Kairo e colaboradores (1999) e Argüelles e colaboradores (2005) para lotes de vacina usados na rotina de imunização da CGPNI.
- Criar condições para que o INCQS possa participar de estudos interlaboratoriais que objetivem a avaliação dessa técnica como ensaio alternativo para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Local de realização do estudo

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

#### 3.2. Fluxograma do estudo

O estudo foi desenvolvido conforme fluxograma apresentado na FIGURA 3.

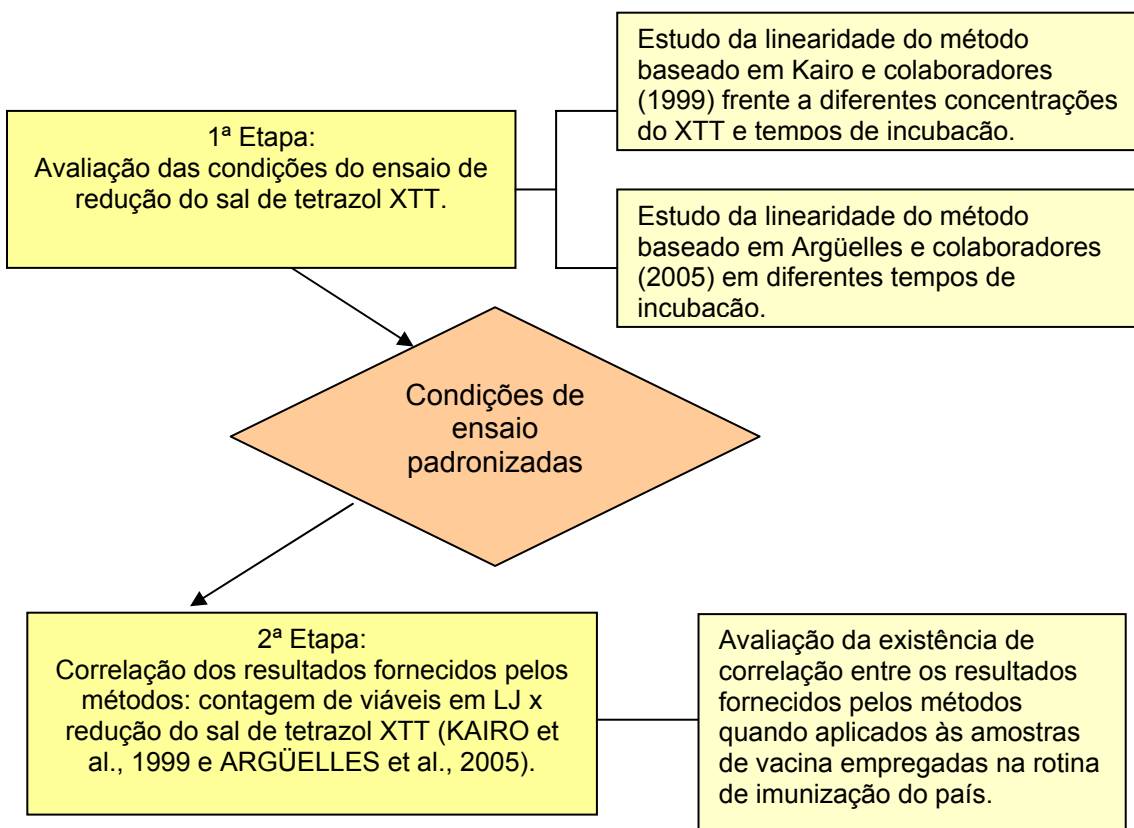


FIGURA 3. Fluxograma do estudo de avaliação da técnica de redução do sal de tetrazol XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) como ensaio alternativo para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina. LJ – Lowenstein-Jensen.

### **3.3. Vacinas:**

#### **3.3.1. Vacina de referência de trabalho - BRABCG003**

Nos ensaios de avaliação de linearidade do método e correlação dos resultados foi empregado, como vacina de referência de trabalho, o lote de vacina BCG BRABCG003 (cepa Moreau - RJ) produzido pela Fundação Atauípho de Paiva em 1996.

Este lote vem sendo utilizado regularmente como referência nacional de trabalho na rotina do controle do INCQS e dos fabricantes nacionais da vacina BCG desde 1998, após ter sido avaliado no fabricante, no INCQS e no Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ). Nessa ocasião o lote foi avaliado quanto à esterilidade bacteriana e fúngica, vácuo, hipersensibilidade tuberculínica, pesquisa de micobactéria virulenta em cobaias, homogeneidade e identidade para bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR), viabilidade e termoestabilidade.

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

Nos ensaios convencionais de contagem de unidades viáveis de BCG em meio de cultura sólido de LJ, esta vacina fornece contagem média de  $8 \times 10^6$  UFC/mL, com desvio padrão de  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL, conforme gráfico de controle de Shewhart mantido no Setor de Vacinas / BCG do Departamento de Microbiologia para monitoramento dos procedimentos de ensaio (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004b).

#### **3.3.2. Vacina BCG-ID empregada na rotina de imunização do PNI**

Foram empregados 06 lotes de vacina BCG-ID (cepa Moreau - RJ) recebidos no Setor de Vacinas / BCG para análises de rotina, incluindo contagens de viáveis e termoestabilidade. Os lotes de vacina incluídos nas análises foram avaliados e considerados satisfatórios quanto à presença exclusiva de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e ausência de contaminantes de origem bacteriana e fúngica foram

incluídas no estudo (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2004; 2007)

Cada ampola contém 10 doses (1 mg) de uma suspensão liofilizada de BCG preparada em glutamato de sódio a 2%. As ampolas são mantidas no laboratório conforme orientação do fabricante, entre 2 e 8 °C e são reconstituídas com 1 mL solução de cloreto de sódio 0,9%.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2002) o número de unidades viáveis de BCG na vacina BCG-ID mantida entre 2 e 8 °C deve estar compreendido entre 2 a  $10 \times 10^6$  UFC/mL. Já na análise de termoestabilidade, quando é avaliada a sobrevivência do BCG na vacina após incubação a 37 +/- 1 por 28 dias, a viabilidade deve corresponder a no mínimo 20% do conteúdo de BCG unidades viáveis presentes na vacina mantida entre 2 e 8 °C.

### **3.4. Ensaio de redução do sal de tetrazol XTT**

3.4.1. Descrição da técnica baseada em Kairo e colaboradores (1999):

3.4.1.1. Sal de tetrazol XTT:

As soluções do sal de tetrazol XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) Sigma® (95% de pureza) foram preparadas no momento de uso, utilizando-se caldo Middlebrook 7H9 (ANEXO) e aquecimento em banho termostático a 60 °C durante 30 minutos para a solubilização do sal de tetrazol e posterior esterilização por filtração em membrana de 0,22 µm.

Durante o estudo de padronização do método foram avaliadas soluções de XTT nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL.

3.4.1.2. Carreador de elétrons (CE):

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

#### 3.4.1.3. Solução de reação (SR):

As soluções de reação foram preparadas no momento de uso adicionando-se 10 µL da solução de CE (3.4.1.2) a cada mL das soluções de XTT (3.4.1.1).

#### 3.4.1.4. Branco:

Como branco foram utilizados 100 µL de caldo Middlebrook 7H9 acrescido de 25 µL de solução de reação (3.4.1.3), em triplicatas preparadas em microplaca de 96 poços de fundo plano.

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

#### 3.4.1.5. Execução do ensaio:

Volumes de 100 µL da vacina reconstituída foram depositados, em triplicata, em placas de 96 poços de fundo plano e foram acrescentados 25 µL de solução de reação (3.4.1.3).

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

#### 3.4.1.6. Leitura e cálculo:

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

O desconto do branco foi realizado através da subtração da densidade ótica média do branco (3.4.1.4) das densidades óticas obtidas para as misturas de vacina e solução de reação (3.4.1.5).

Após o desconto do branco, o cálculo da concentração da vacina em análise foi realizado por aplicação da densidade ótica média produzida pela formazana nas misturas de vacina e solução de reação na equação da reta conforme segue:

$$y = a + bx,$$

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

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

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

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

Para a expressão do resultado em UFC/mL, a concentração medida (x) foi multiplicada pela concentração média de viáveis da vacina de referência de trabalho BRABCG003 ( $8 \times 10^6$  UFC/mL) (3.3.1). Os desvios padrão foram calculados com base nos resultados das triplicatas tratadas individualmente.

#### 3.4.2. Descrição da técnica baseada em Argüelles e colaboradores (2005).

##### 3.4.2.1. Sal de tetrazol XTT:

A solução do sal de tetrazol XTT Sigma® (95% de pureza) a 3 mg/mL foi preparada no momento de uso, utilizando-se solução tampão fosfato 0,005M pH 7,4 (ANEXO) e aquecimento em banho termostático a 60 °C durante 30 minutos para a solubilização do sal de tetrazol e posterior esterilização por filtração em membrana de 0,22 µm.

##### 3.4.2.2. Carreador de elétrons (CE):

Foi utilizado bissulfato de sódio menadiona (BSM) Sigma® a 10 mg/mL em solução tampão fosfato 0,005M pH 7,4 (ANEXO). A solução foi preparada, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

##### 3.4.2.3. Solução de reação (SR):

As soluções de reação foram preparadas no momento de uso adicionando-se 10 µL da solução de carreador de elétrons (3.4.2.2) a cada mL da solução de XTT (3.4.2.1).

##### 3.4.2.4. Controle de opacidade:

Para o controle de opacidade foram preparados em paralelo e em triplicata volumes de 100 µL da vacina em teste na mesma concentração analisada acrescida de mais 25 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9%.

#### 3.4.2.5. Execução do ensaio:

Volumes de 100 µL da vacina reconstituída foram depositados, em triplicata, em microplacas de 96 poços de fundo plano, e foram acrescentados 25 µL de solução de reação (3.4.2.3).

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

#### 3.4.2.6. Leitura e cálculo:

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

O desconto da opacidade foi realizado através da subtração da densidade ótica média da opacidade (3.4.2.4) das densidades óticas obtidas para as misturas de vacina e solução de reação (3.4.2.5).

Após o desconto da opacidade, o cálculo da concentração da vacina em análise foi realizado por aplicação da densidade ótica média produzida pela formazana nas misturas de vacina e solução de reação na equação da reta conforme segue:

$$y = a + bx,$$

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

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

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

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

Para a expressão do resultado em UFC/mL, a concentração medida (x) foi multiplicada pela concentração média de viáveis da vacina de referência de trabalho BRABCG003 ( $8 \times 10^6$  UFC/mL) (3.3.1). Os desvios padrão foram calculados com base nos resultados das triplicatas tratadas individualmente.

### **3.5. Ensaio de contagem em meio sólido (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1977; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2005):**

#### 3.5.1. Meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ) (ANEXO):



O meio de LJ foi preparado utilizando-se base comercial Merck®, glicerol 87% e suspensão de ovos frescos certificados de galinhas da raça Leghron isentas de tratamentos a base de antibióticos ou de outro antimicrobiano. O envase foi feito em tubos 25 x 200 mm providos de rolhas de gaze, para posterior coagulação a 85 °C durante 45 minutos em equipamento coagulador Esterilizacion Longhi HNOS. O meio de LJ foi mantido em estoque entre 2 e 8 °C por no máximo 60 dias.

### 3.5.2. Meio Líquido Sauton ¼ (ANEXO):

O meio Líquido Sauton ¼ foi mantido entre 2 e 8 °C por no máximo 60 dias.

### 3.5.3. Descrição geral do ensaio

O líófilo de cada ampola de vacina foi reconstituído (3.3) e três diluições foram preparadas a partir da suspensão a 1mg/mL, utilizando-se como diluente meio líquido Sauton ¼ e fator de diluição 2.

Para cada amostra foram utilizados 20 tubos codificados (segundo TABELA de números aleatórios) contendo 15 mL de LJ. As duas primeiras diluições foram inoculadas em cinco desses tubos e a terceira nos 10 tubos restantes. Cada tubo contendo LJ foi inoculado com 100 µL de cada uma das diluições.

O volume de inóculo foi distribuído uniformemente por toda a superfície do meio, e os tubos, ainda tampados com rolha de gaze, permaneceram em posição horizontal, ao abrigo da luz e ligeiramente inclinados durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Após esse período, os tubos foram colocados na posição vertical, vedados com rolhas de silicone parafinadas e incubados a 37 +/- 1 °C ao abrigo da luz durante quatro semanas.

As colônias características do BCG, de aspecto rugoso, espreiadas e esbranquiçadas (sem pigmentação) foram contadas com o auxílio de lente de aumento. As contagens superiores a 100 colônias foram desprezadas. Foram igualmente desconsiderados os tubos que apresentaram confluência das colônias, ressecamento do meio de cultura, vedação inadequada, rachaduras ou presença de contaminantes.

Cada ensaio foi avaliado estatisticamente quanto ao qui-quadrado (5%) para a verificação da presença de *outliers* e pelo teste *t* de Student (5%) para o controle da proporcionalidade entre as diluições conforme fator de diluição empregado.

Posteriormente o número de UFC/mL foi calculado com base nas médias de UFC/mL obtidas por diluição da amostra de vacina testada. Para a realização dos cálculos foi utilizada a pasta de cálculo BCGCALCVAl, desenvolvida no Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia do INCQS em 2005, e validada por reprodução manual dos cálculos.

### 3.6. Descrição das etapas do estudo

#### 3.6.1. 1ª etapa: avaliação das condições de ensaio.

A avaliação do efeito dose-resposta fornecido pelo método de redução do sal de tetrazol XTT, ou seja, da relação entre as quantidades de formazana produzidas em função das diferentes diluições da vacina foi realizada através do estudo de curvas analíticas baseadas nas densidades óticas fornecidas por cada diluição da vacina de referência de trabalho BRABCG003.

##### 3.6.1.1. Avaliação da linearidade do método baseado em Kairo e colaboradores (1999):

As curvas analíticas foram construídas empregando-se o XTT a 1, 2 e 3 mg/mL em ensaios de redução do XTT (3.4.1) com 3, 24 e 48 horas de incubação a 37 +/- 1 °C realizados em dias diferentes. Os controles e o branco foram realizados a cada ensaio conforme QUADRO 1.

QUADRO 1. Descrição dos controles realizados no estudo da linearidade da técnica baseada em Kairo et al. (1999).

Controles e branco	
Controle de opacidade para a verificação da densidade ótica fornecida na ausência de solução de reação	100 µL da vacina a 2mg/mL + 25 µL de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido
Controle negativo para a verificação de inespecificidade produzida pela matriz da vacina *	100 µL da vacina BRABCG003 a 2mg/mL reconstituída com solução de cloreto de sódio a 0,9% e inativada (1 hora a 70 °C) + 25µL de solução de reação
Branco para desconto do <i>background</i> **	100 µL de Caldo Middlebrook 7H9 enriquecido + 25µL de solução de reação

\* Inativação confirmada através de cultivo em meio de LJ.

\*\* Avaliados em triplicata.

- Faixa de trabalho:

A faixa de trabalho foi definida com base nos valores de referência especificados na Farmacopéia Brasileira para a vacina BCG - ID (BRASIL, 2002): 2 a  $10 \times 10^6$  UFC/mL para o produto mantido conforme orientação do fabricante e ao menos 20% do limite mínimo de referência para avaliação da termoestabilidade.

Conforme esquema apresentado no QUADRO 2, a faixa de trabalho se estendeu de  $0,12 \times 10^6$  a  $16 \times 10^6$  UFC/mL com oito diluições espaçadas por fator de diluição 2.

- Reconstituição e diluição da vacina BRABCG003

Para a execução de cada ensaio incluído na construção de cada uma das curvas analíticas foi empregada uma ampola da vacina de referência de trabalho BRABCG003, cujo número médio de unidades viáveis corresponde a  $8 \times 10^6$  UFC/mL (3.3.1) em ensaios de contagem em meio sólido de LJ realizados na rotina do Setor de Vacinas / BCG do Departamento de Microbiologia.

Para a obtenção da maior concentração da faixa de trabalho ( $16 \times 10^6$  UFC/mL), empregou-se a metade do volume de diluente recomendado para a reconstituição de uma ampola da vacina BRABCG003, iniciando-se a diluição com o produto reconstituído a 2 mg/mL e portanto duplamente concentrado (QUADRO 2).

Para o preparo de cada diluição seriada foi utilizado caldo Middlebrook 7H9 enriquecido.

QUADRO 2. Concentrações da vacina BRABCG003 analisadas para a construção das curvas analíticas pela técnica baseada em Kairo et al. (1999).

Concentração (mg/mL)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,01562
Concentração * ( $\times 10^6$ UFC/mL)	16,0	8,0	4,0	2,0	1,0	0,5	0,25	0,12

\* Considerando o valor médio de  $8 \times 10^6$  UFC/mL.  
UFC – Unidade Formadora de Colônias.

- Correspondência entre densidade ótica e UFC/mL

Para cada uma das curvas analíticas construídas com as três concentrações do XTT foi feita a correspondência entre as densidades óticas e as UFC/mL utilizando os parâmetros da equação de regressão conforme descrito no item em 3.4.1.6.

### 3.6.1.2. Avaliação da linearidade do método baseado em Argüelles et al.(2005):

As curvas analíticas foram construídas empregando-se o XTT a 3 mg/mL em ensaios de redução (3.4.2) com 3, 24 e 48 horas de incubação a 37 +/- 1 °C realizados em dias diferentes.

- Faixa de trabalho:

A faixa de trabalho foi definida com base nos valores de referência especificados na Farmacopéia Brasileira para a vacina BCG-ID: 2 a  $10 \times 10^6$  UFC/mL para o produto mantido conforme orientação do fabricante e ao menos 20% do limite mínimo de referência para análise de termoestabilidade (BRASIL, 2002).

Dessa forma, conforme esquema apresentado no QUADRO 3, a faixa de trabalho se entendeu de  $0,37 \times 10^6$  a  $16 \times 10^6$  UFC/mL com 12 diluições intercaladas com fator de diluição 2.

- Reconstituição e diluição da vacina BRABCG003

Para a execução de cada ensaio incluído na construção de cada uma das curvas analíticas foi empregada uma ampola da vacina de referência de trabalho BRABCG003, cujo número médio de unidades viáveis corresponde a  $8 \times 10^6$  UFC/mL (3.3.1).

A maior concentração da faixa de trabalho ( $16 \times 10^6$  UFC/mL) foi obtida empregando-se a metade do volume de diluente recomendado para a reconstituição de uma ampola da vacina BRABCG003, iniciando-se a diluição com o produto reconstituído a 2 mg/mL e portanto duplamente concentrado.

As diluições seriadas (QUADRO 3) foram preparadas com meio líquido Sauton não diluído (ANEXO). Dessa forma, para a correção dos valores de densidade ótica, a partir da segunda diluição, além do desconto de opacidade já descrito em 3.4.2.4, foi subtraída também a densidade ótica média obtida de triplicatas preparadas com 100 µL de meio Sauton não diluído acrescido de 25 µL de solução de reação.

QUADRO 3. Concentrações da vacina BRABCG003 analisadas para a construção das curvas analíticas pela técnica baseada em Argüelles et al. (2005).

Concentração (mg/mL)	2	1,5	1	,75	,5	,375	,25	,187	,125	,093	,062	,046
Concentração* (x 10 <sup>6</sup> UFC/mL)	16,0	12,0	8,0	6,0	4,0	3,0	2,0	1,5	1,0	0,75	0,5	0,37

\* Considerando o valor médio de  $8 \times 10^6$  UFC/mL. UFC – Unidade formadora de colônia

### 3.6.1.3. Tratamento estatístico dos dados:

A avaliação da linearidade do método foi realizada a partir dos valores médios de densidade ótica obtidos conforme 3.4.1 e 3.4.2 para cada concentração da vacina de referência de trabalho BRABCG003. Foi utilizado fluxograma adaptado a partir de orientações descritas pela *Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques* (2002) (FIGURA 4):

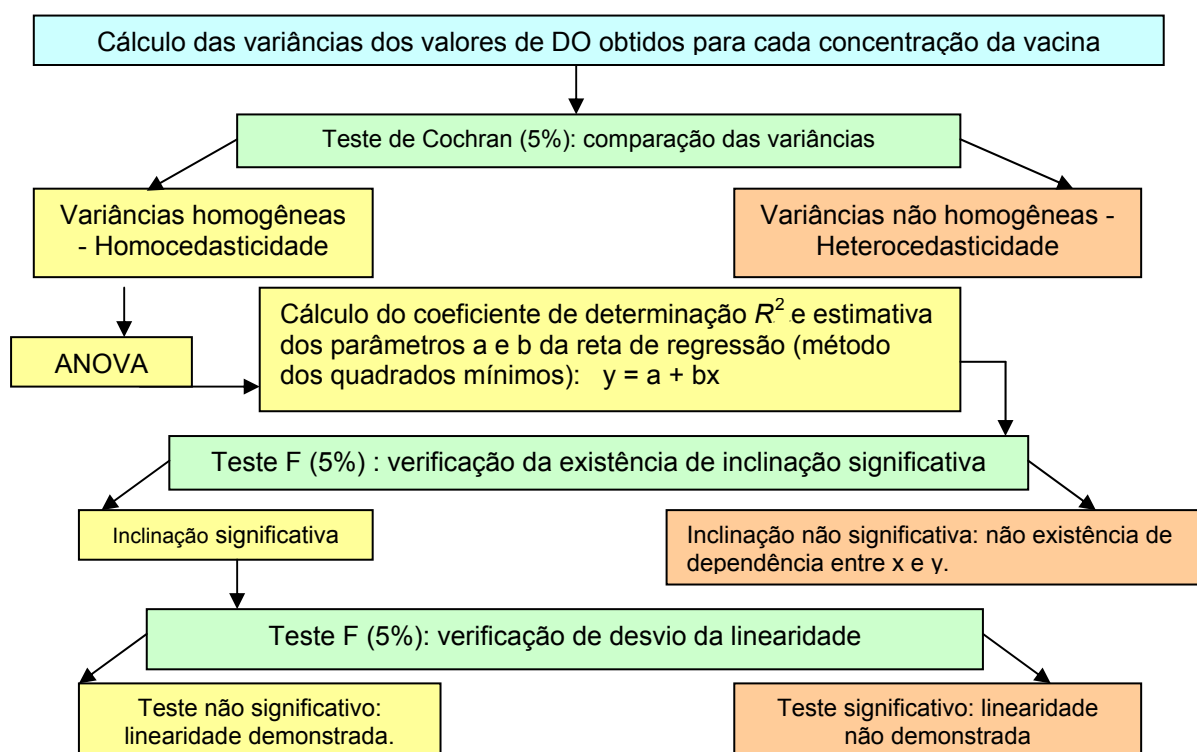


FIGURA 4. Fluxograma de avaliação da linearidade do método de redução do sal de tetrazol XTT. DO – densidade ótica. ANOVA – análise de variância Adaptado de SFSTP (2002).

As seguintes pastas de cálculos foram empregadas na análise da linearidade:

- Pasta Cochran: desenvolvida no Setor de Vacinas do Departamento de Microbiologia por meio do Microsoft Excel e avaliada previamente por reprodução

dos resultados apresentados em exemplificações fornecidas pela *Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques* (2002). Foi utilizada na aplicação do Teste de Cochran (5%) para avaliação da homogeneidade entre as variâncias das diferentes concentrações de vacina.

- Pasta de Avaliação da Linearidade / ANOVA: desenvolvida pela Coordenação do Programa da Qualidade do INCQS por meio do Microsoft Excel e validada por reprodução manual dos resultados. A aplicabilidade desta pasta ao presente estudo foi avaliada pela reprodução dos resultados apresentados em exemplificações fornecidas pela *Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques* (2002). Foi utilizada para a estimativa dos parâmetros da reta de regressão: cálculo dos coeficientes angular e linear, coeficiente de determinação  $R^2$ , testes  $F$  para avaliação da existência de inclinação significativa (5%) e cálculo de desvio significativo de linearidade - *lack-of-fit* (5%).

3.6.2. 2ª etapa: análise de amostras de vacina BCG-ID usadas na rotina de imunização do PNI:

3.6.2.1. Estudo da correlação entre resultados fornecidos pelas técnicas de redução do XTT e por ensaios de contagem em meio sólido de LJ:

Seis lotes de vacina BCG-ID empregados na rotina de vacinação do PNI e identificados por A, B, C, D, E e F, foram analisados pelo método de redução do XTT a 1 mg/mL pela técnica baseada em Kairo et al. (1999) (3.4.1) e a 3 mg/mL pela técnica baseada em Argüelles et al. (2005) (3.4.2) e pelo método oficial de contagens de colônias em meio de LJ (3.5), buscando avaliar a existência de correlação entre os resultados fornecidos pelos dois métodos.

A amostragem de cada lote consistiu em um *pool* de cinco ampolas de vacina. Para o preparo do *pool*, cada ampola de vacina analisada foi reconstituída com solução de cloreto de sódio a 0,9% na concentração de 1 mg/mL conforme orientação do fabricante.

A técnica baseada em Kairo et al. (1999) e o método de contagem em LJ foram realizados simultaneamente, partindo-se do mesmo *pool* de ampolas. Já a técnica

baseada em Argüelles et al. (2005) (3.4.2), foi realizada posteriormente a partir de *pools* diferentes preparados com outras ampolas dos lotes A, B, C, D, E e F.

O lote de vacina BRABCG003 foi usado como referência de trabalho e, portanto o número médio de  $8 \times 10^6$  UFC/mL como base para o cálculo do número de unidades viáveis do BCG nas vacinas em análise por interpolação na equação da reta.

A existência de correlação foi avaliada pela análise do coeficiente de correlação de Pearson (MOORE, 2005) calculado por meio do Microsoft Excel.

3.6.2.2. Estudo da correlação entre resultados fornecidos pelas técnicas de redução do XTT baseada em Kairo et al. (1999) e em Argüelles et al.(2005).

Os lotes A, B, C, D, E e F foram analisados pelas técnicas de redução do XTT a 1 mg/mL pela técnica baseada em Kairo et al. (1999) (3.4.1) e a 3 mg/mL pela técnica baseada em Argüelles (2005) (3.4.2) buscando avaliar a existência de correlação entre os resultados fornecidos pelas duas técnicas.

A amostragem de cada lote consistiu em um *pool* de cinco ampolas de vacina. Para o preparo do *pool*, cada ampola de vacina analisada foi reconstituída com solução de cloreto de sódio a 0,9% na concentração de 1 mg/mL conforme orientação do fabricante.

As técnicas baseada em Kairo et al. (1999) (3.4.1) e em Argüelles et al. (2005) (3.4.2), não foram realizadas simultaneamente, sendo empregados *pools* diferentes dos lotes A, B, C, D, E e F.

O lote de vacina BRABCG003 foi usado como referência de trabalho e, portanto o número médio de  $8 \times 10^6$  UFC/mL como base para o cálculo do número de unidades viáveis do BCG nas vacinas em análise por interpolação na equação da reta.

A existência de correlação foi avaliada pela análise do coeficiente de correlação de Pearson (MOORE, 2005) calculado por meio do Microsoft Excel.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação do método de redução do sal de tetrazol XTT baseado em Kairo et al. (1999):

#### 4.1.1. A redução do XTT nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL:

Os dados dos ensaios de redução do XTT nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL estão apresentados nas FIGURAS 5, 6 e 7.

Observa-se que nos ensaios realizados com o XTT a 1 mg/mL foi possível o estudo de toda a faixa de concentrações da vacina BRABCG003 nos três períodos de incubação.

Ao se empregar o XTT a 2 mg/mL, a formazana forneceu densidades óticas máximas somente após 48 de incubação. Com o uso do XTT a 3 mg/mL foi visualizado um *plateau* nas maiores concentrações analisadas da vacina BRABCG003 após 24 e 48 horas de incubação.

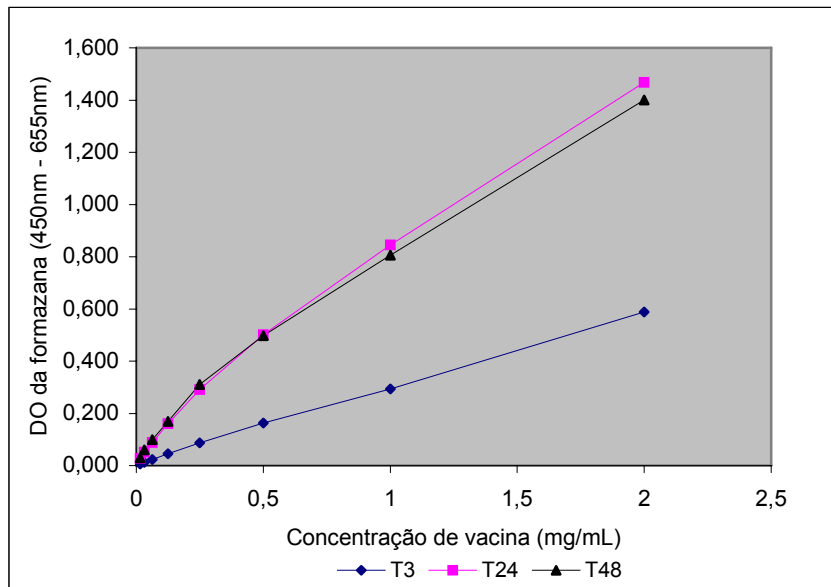


Figura 5. Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pela redução do XTT a 1 mg/mL pela técnica baseada em Kairo et al. (1999) para as concentrações da vacina BRABCG003 (2mg/mL), após 3 (T3), 24 (T24) e 48 (T48) horas de incubação.



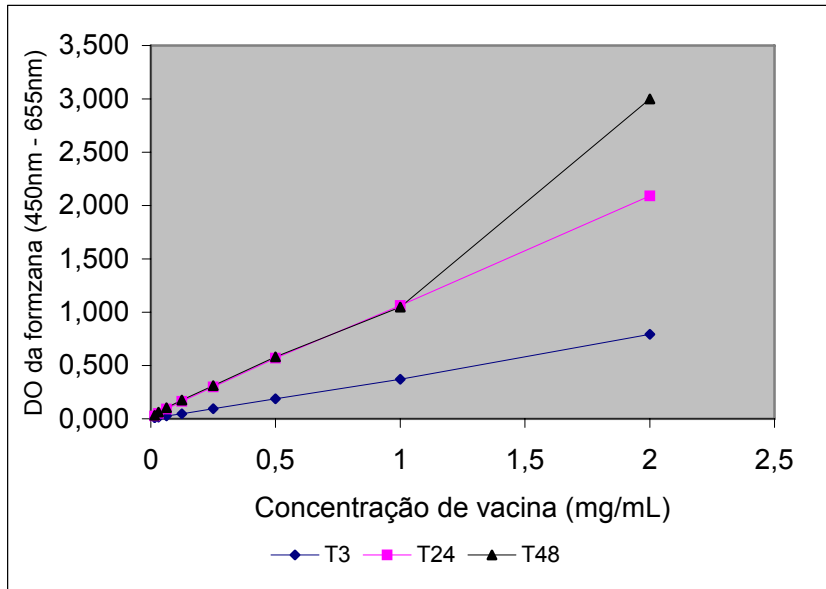


FIGURA 6. Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pela redução do XTT a 2 mg/mL pela técnica baseada em Kairo et al. (1999) para as concentrações da vacina BRABCG003 (2mg/mL), após 3 (T3), 24 (T24) e 48 (T48) horas.

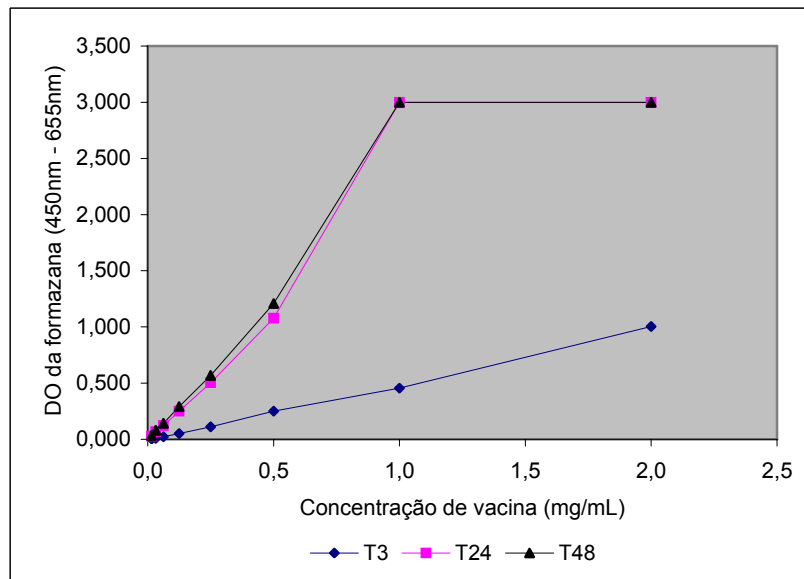


FIGURA 7. Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pela redução do XTT a 3 mg/mL pela técnica baseada em Kairo et al. (1999) para as concentrações da vacina BRABCG003 (2mg/mL), após 3 (T3), 24 (T24) e 48 (T48) horas de incubação.

#### 4.1.2. Avaliação dos controles e do branco nas três concentrações do XTT.

As FIGURAS 8, 9 e 10 apresentam os resultados da avaliação do branco e dos controles realizada durante o estudo da linearidade da técnica baseada em Kairo et al. (1999).

Através da leitura do branco pode ser observado que o efeito *background* decresce à medida que a concentração do XTT foi reduzida.

Verifica-se que nos ensaios realizados com as diferentes concentrações de XTT as densidades óticas fornecidas pelos controles de opacidade mantiveram-se praticamente inalteradas nos períodos de incubação avaliados e nas diferentes concentrações do XTT.

Já os controles negativos forneceram densidades óticas que se elevaram em função da concentração do XTT e dos tempos de incubação, porém em menor grau quando comparadas aos brancos.

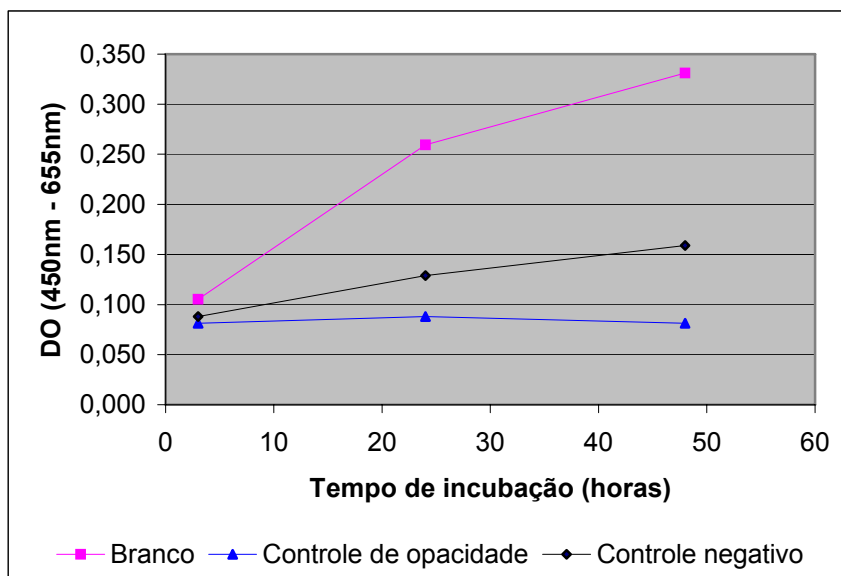


FIGURA 8. Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelo branco e pelos controles negativo e de opacidade durante avaliação de linearidade da técnica de redução do XTT a 1 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) após 3, 24, e 48 horas de incubação.

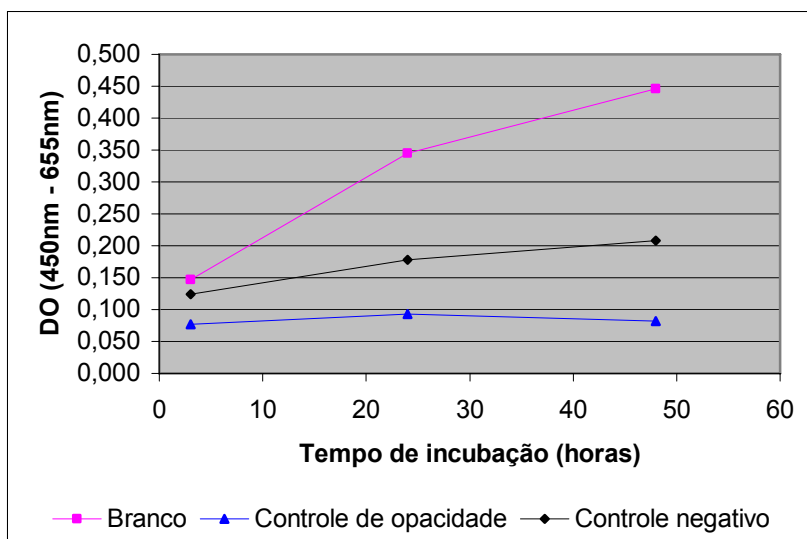


FIGURA 9. Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelo branco e pelos controles negativo e de opacidade durante avaliação de linearidade da técnica de redução do XTT a 2 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) após 3, 24, e 48 horas de incubação.

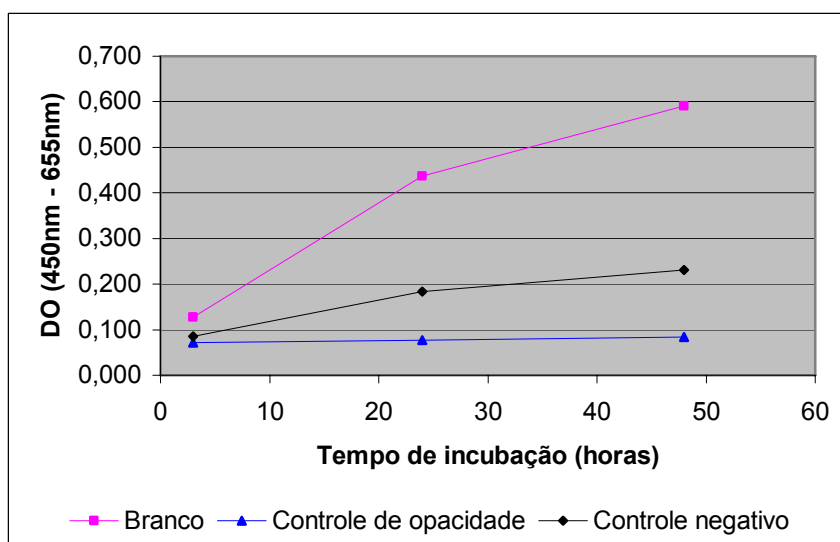


FIGURA 10. Valores de densidade ótica (DO) fornecidos pelo branco e pelos controles negativo e de opacidade durante avaliação de linearidade da técnica de redução do XTT a 3 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) após 3, 24, e 48 horas de incubação.

#### 4.1.3. Estudo da linearidade da técnica de redução do XTT baseada em Kairo et al. (1999):

Como demonstrado na TABELA 1, o ajuste da regressão linear foi obtido em todas as condições experimentais avaliadas, porém com variações relacionadas às faixas de concentrações da vacina BRABCG003 abrangidas de acordo com a concentração do sal de tetrazol XTT e o período de incubação. Foram incluídas nos ajustes somente as concentrações que se mostraram homocedásticas, ou seja, que tiveram variâncias homogêneas segundo o teste de Cochran (5%). Em todos os casos se observou a adequação da reta aos parâmetros avaliados. Os coeficientes angulares significativos indicaram a existência de sensibilidade no método, e a aplicação do teste *F* (5%) demonstrou que os ajustes da regressão não apresentaram desvios significativos sendo demonstrada a linearidade do método na faixa avaliada.

A proporcionalidade entre as variáveis concentração e densidade ótica foi demonstrada através dos coeficientes de determinação que se mantiveram entre 0,96 e 0,99, sempre superiores a 0,90 como requerido pelo INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003).

A TABELA 1 reúne as densidades óticas fornecidas pelas concentrações dos extremos das retas de regressão obtidas para cada condição experimental avaliada. A aplicação destes valores às equações das retas possibilitaram o cálculo das concentrações medidas e a sua expressão em UFC/mL por correspondência ao valor médio de  $8 \times 10^6$  UFC/mL da vacina BRABCG003 em ensaios de contagem em LJ. Pode ser observada a proximidade entre os valores teóricos e aqueles fornecidos pela técnica de redução do XTT baseada em Kairo et al. (1999).

Com o uso do XTT a 1 mg/mL o ajuste linear abrangeu concentrações importantes da faixa de trabalho avaliada. Os coeficientes de determinação de 0,99 nos três períodos de incubação indicaram adequação das condições experimentais (BRASIL, 2003) empregadas nos ensaios que de fato forneceram resultados bem próximos aos teóricos.

TABELA 1. Resumo do ajuste das retas de regressão nas diferentes condições avaliadas em ensaios de redução do XTT baseados em Kairo et al. (1999).

Concentração XTT (mg/mL)	Tempo de incubação (horas)	$R^2$	Faixas abrangidas pelo ajuste			
			mg/mL	Densidade ótica	Concentração de viáveis ( $\times 10^6$ UFC/mL)	
					Teória	Medida *
1,0	3	0,9950	0,125 a 2,0	0,046 a 0,588	1,0 a 16,0	1,0 a 15,99
	24	0,9912	0,250 a 2,0	0,291 a 1,468	2,0 a 16,0	1,65 a 15,83
	48	0,9900	0,250 a 2,0	0,310 a 1,401	2,0 a 16,0	1,74 a 15,90
2,0	3	0,9633	0,062 a 1,0	0,026 a 0,371	0,5 a 8,0	0,64 a 8,13
	24	0,9611	0,031 a 0,5	0,050 a 0,568	0,25 a 4,0	0,18 a 4,33
	48	0,9601	0,031 a 1,0	0,064 a 1,049	0,25 a 8,0	0,17 a 7,86
3,0	3	0,9733	0,125 a 1,0	0,051 a 0,456	1,0 a 8,0	0,89 a 7,86
	24	0,9768	0,031 a 0,5	0,069 a 1,077	0,25 a 4,0	0,20 a 3,94
	48	0,9823	0,015 a 0,5	0,038 a 1,213	0,12 a 4,0	0,11 a 4,02

XTT - 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide. UFC - Unidade Formadora de Colônias.  $R^2$  - Coeficiente de determinação. \* Valores calculados pela equação da reta fornecida pelo ajuste da regressão e convertidos com base no valor médio de  $8 \times 10^6$  UFC/mL da vacina de referência de trabalho BRABCG003.

As FIGURAS 11, 12 e 13 ilustram os ajustes obtidos nas avaliações de linearidade da técnica de redução do XTT a 1mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) nos três períodos de incubação estudados e as equações empregadas para o cálculo das concentrações medidas (TABELA 1).

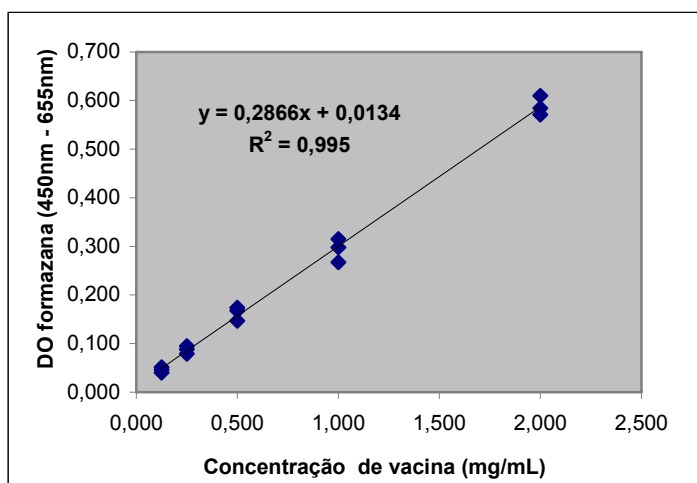


FIGURA 11. Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 3 horas de incubação. DO - Densidade ótica. y = densidade ótica da formazana presente na vacina em análise. x = concentração (mg/mL) conhecida ou teórica da vacina.

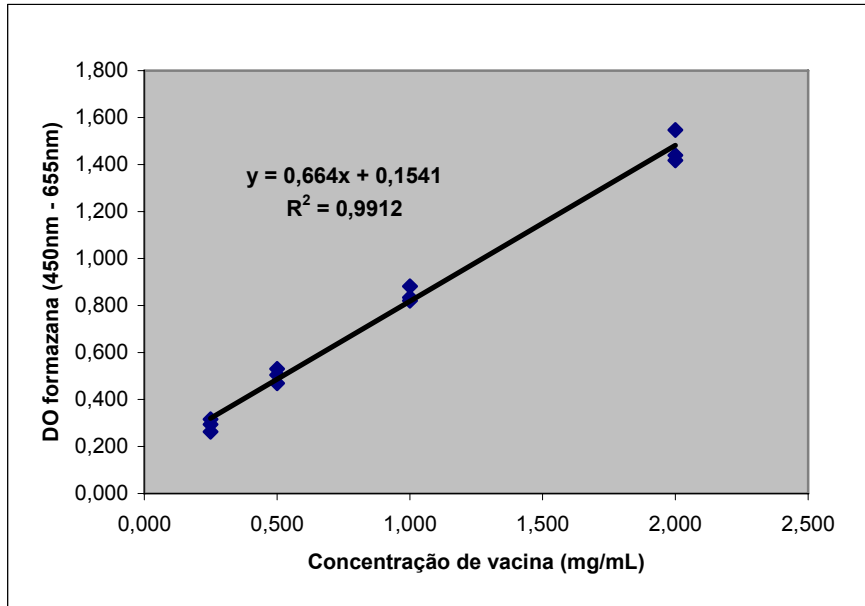


FIGURA 12. Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 24 horas de incubação. DO – Densidade ótica.  $y$  = densidade ótica da formazana presente na vacina em análise.  $x$  = concentração (mg/mL) conhecida ou teórica da vacina.

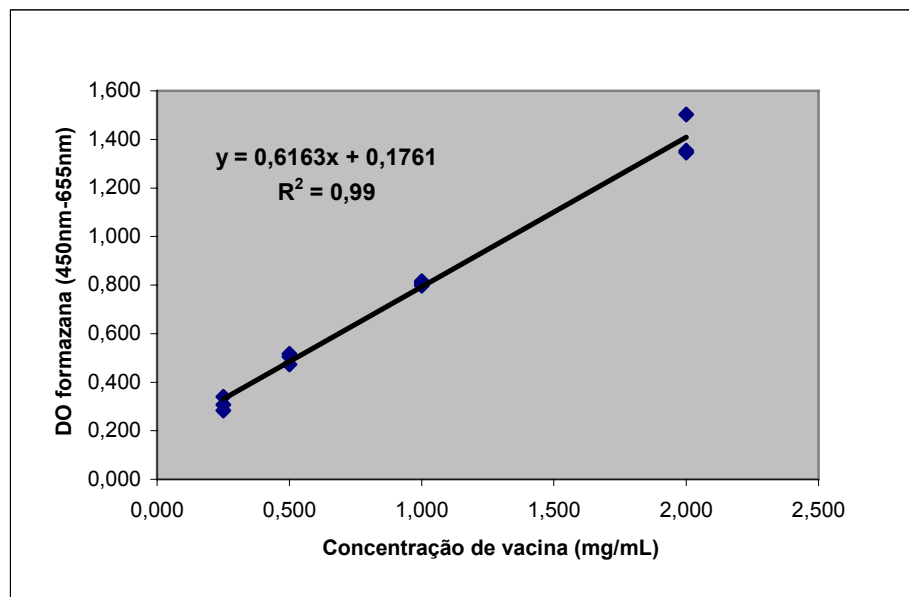


FIGURA 13. Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 48 horas de incubação. DO – Densidade ótica.  $y$  = densidade ótica da formazana presente na vacina em análise.  $x$  = concentração (mg/mL) conhecida ou teórica da vacina.

Nas FIGURAS 14, 15 e 16 podem ser visualizadas as correspondências entre as densidades óticas e as UFC/mL fornecidas por cada concentração medida da vacina BRABCG003 e calculadas pelas equações da regressão obtidas nos ajustes dos ensaios de redução do XTT a 1 mg/mL baseados em Kairo et al. (1999).

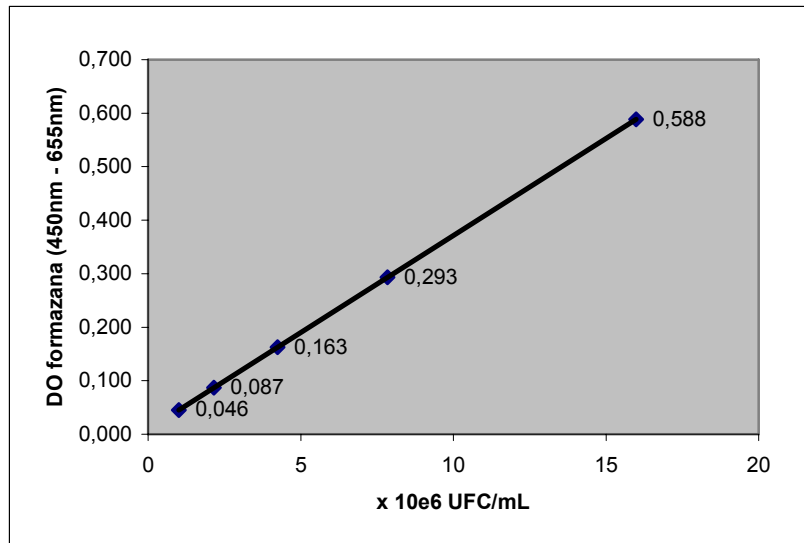


FIGURA 14. Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 3 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003. DO – Densidade ótica. UFC – unidades formadoras de colônias.

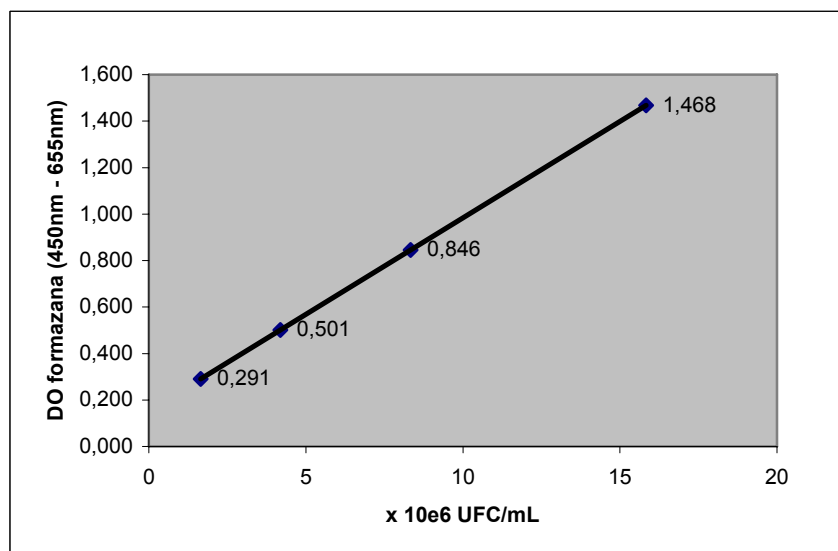


FIGURA 15. Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 24 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003. DO – Densidade ótica. UFC – unidades formadoras de colônias.

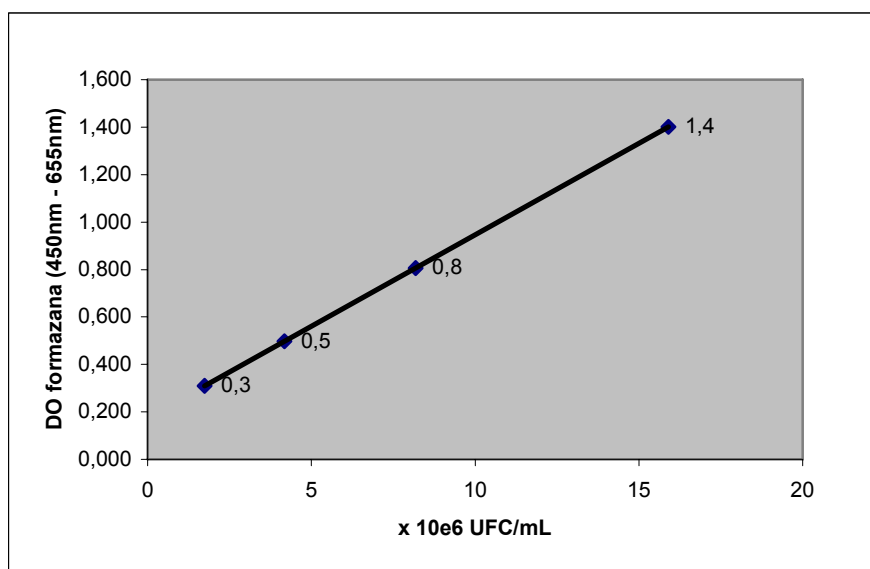


FIGURA 16. Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 1 mg/mL com base em Kairo et al. (1999) após 48 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003. DO – Densidade ótica. UFC – unidades formadoras de colônias.



A FIGURA 17 ilustra a reação de redução do XTT a 1 mg/mL em microplaca durante ensaio realizado para o preparo da curva de calibração da técnica baseada em Kairo et al. (1999). Podem ser observadas as diferentes intensidades de coloração da formazana obtida como produto da redução do sal de tetrazol nas diluições seriadas da vacina BRABCG003 nos três tempos de incubação estudados. É possível verificar também as intensidades de coloração fornecidas pelo controle negativo, pelo controle de opacidade e pelo caldo Middlebrook 7H9 usado para o preparo do branco.

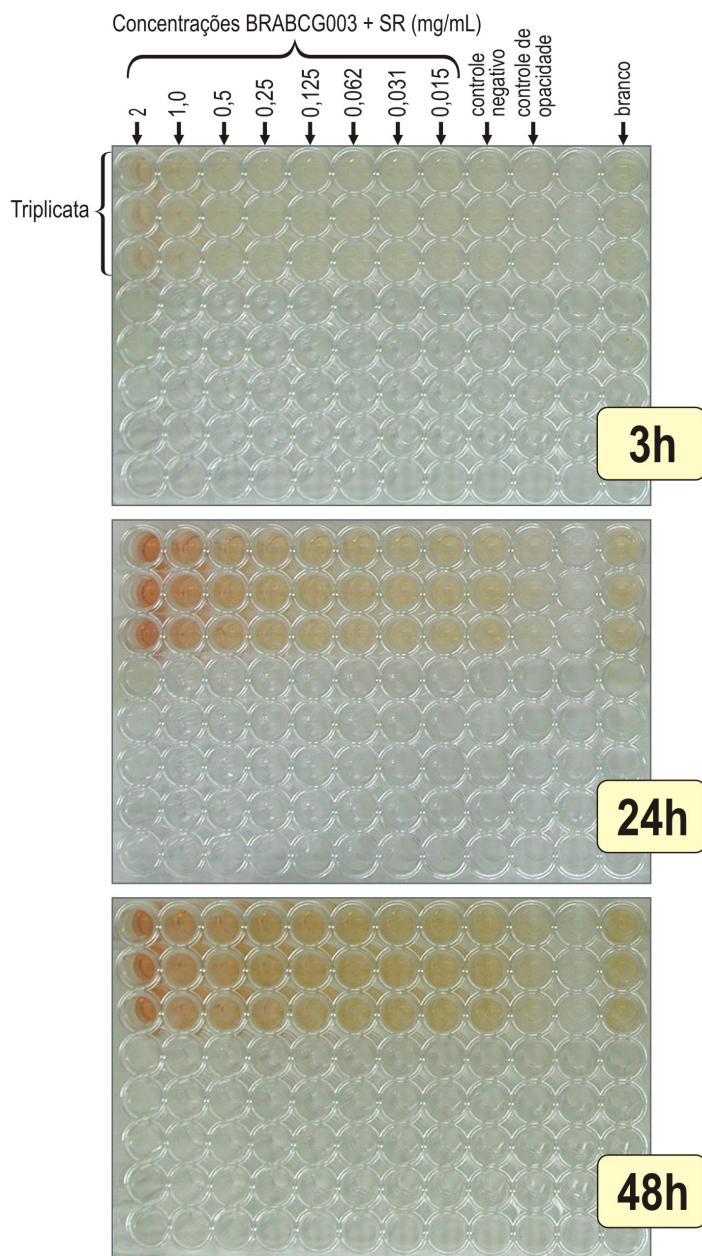


FIGURA 17. Visualização da reação em microplaca da redução do XTT a 1 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999). BRABCG003 – Vacina de referência de trabalho. SR – Solução de reação.

## 4.2. Avaliação do método de redução do sal de tetrazol XTT baseado em Argüelles et al.(2005):

Os dados dos ensaios de redução do XTT a 3 mg/mL pela técnica baseada em Argüelles et al.(2005) estão apresentados na FIGURA 18. Neste caso, o *plateau* foi atingido para as duas maiores concentrações da vacina BCGBCG003 após 24 e 48 horas de incubação, sendo inviabilizada a utilização destes dois pontos nas avaliações.

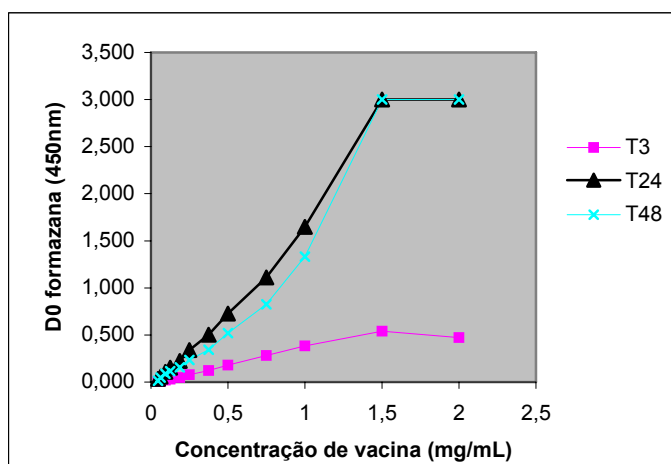


FIGURA 18. Valores de densidade óptica (DO) fornecidos pela redução do XTT a 3 mg/mL pela técnica baseada em Argüelles et al.(2005) para concentrações da vacina BRABCG003 (2 mg/mL), após 3 (T3), 24 (T24) e 48 (T48) horas.

As opacidades obtidas para cada concentração da vacina BRABCG003 foram subtraídas das densidades ópticas utilizadas para a construção das curvas e mantiveram-se bem próximas nos três tempos de incubação, variando em cerca de 0,05 entre os pontos extremos avaliados conforme ilustrado na FIGURA 19.

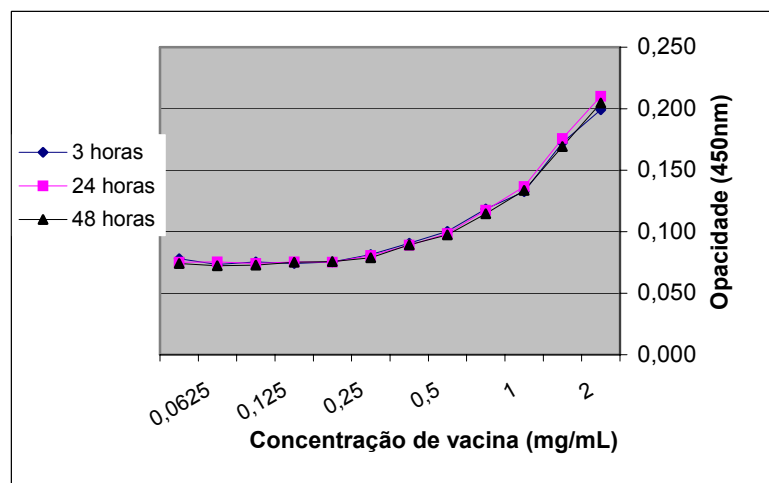


FIGURA 19. Controles de opacidade das diferentes concentrações da vacina BRABCG003 durante os períodos de incubação de 3, 24 e 48 horas em ensaios de redução do XTT a 3 mg/mL baseados em Argüelles et al.(2005).

A FIGURA 20 ilustra o controle das densidades óticas fornecidas pelo meio líquido Sauton acrescido de solução de reação e cujos valores foram igualmente descontados das densidades óticas fornecidas pelas concentrações da vacina BRABCG003 utilizadas na construção das curvas analíticas.

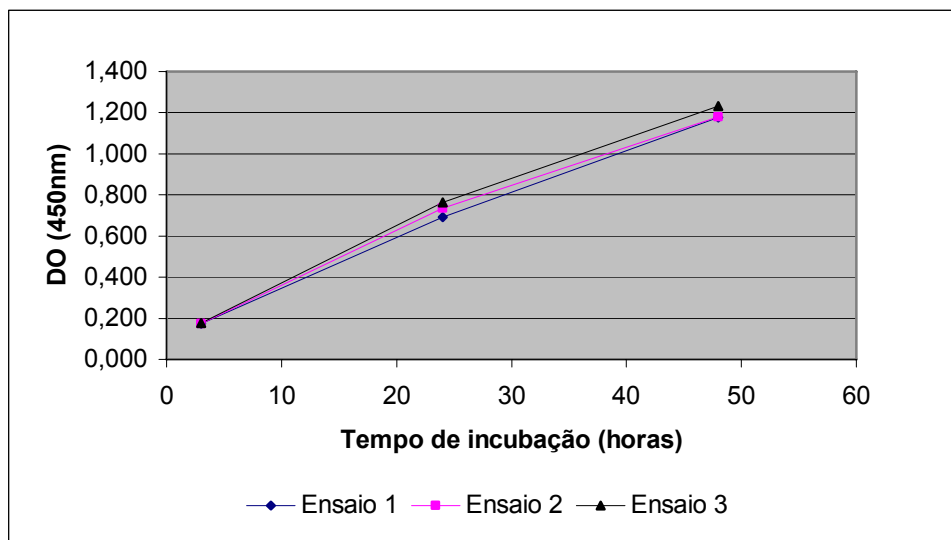


FIGURA 20. Densidades óticas (DO) obtidas para o controle do meio líquido Sauton acrescido de solução de reação nos ensaios de redução do XTT a 3mg/mL baseados em Argüelles et al.(2005) realizados para construção das curvas analíticas.

As condições de ensaio baseadas em Argüelles et al. (2005) permitiram o ajuste da reta de regressão entre as concentrações consideradas homocedásticas (5%) para os três tempos de incubação como demonstra a TABELA 2.

As densidades óticas fornecidas pela formazana após 3, 24 e 48 de incubação permitiram ajustes da regressão, com coeficientes de determinação superiores a 0,90 que indicaram a existência de adequada correlação entre as variáveis concentração e densidade ótica (INMETRO, 2003). A linearidade do método foi também demonstrada conforme indicado pelo teste *F* (5%) que não evidenciou desvio significativo de linearidade na faixa estudada. Os coeficientes angulares significativos mostraram a existência de sensibilidade do método nas condições experimentais avaliadas.

A TABELA 2 reúne as densidades óticas fornecidas pelas concentrações dos extremos das retas de regressão obtidas para cada tempo de incubação estudado. A aplicação destes valores às equações das retas possibilitaram o cálculo das concentrações medidas e a sua expressão em UFC/mL por correspondência ao valor médio de  $8 \times 10^6$  UFC/mL da vacina BRABCG003 em ensaios de contagem em LJ.

Pode ser observada a proximidade entre os valores teóricos e aqueles medidos pela técnica de redução do XTT baseada em Argüelles et al. (2005).

TABELA 2. Resumo do ajuste das retas de regressão nas diferentes condições avaliadas em ensaios de redução do XTT baseados em Argüelles et al. (2005).

Tempo de incubação (horas)	$R^2$	Faixas abrangidas pelo ajuste			
		mg/mL	Densidade ótica	Concentração de viáveis ( $\times 10^6$ UFC/mL)	
				Teórica	Medida *
3	0,9424	0,375 a 1,5	0,083 a 0,557	3,0 a 12,0	2,85 a 11,80
24	0,9809	0,187 a 1,0	0,160 a 1,590	1,5 a 8,0	1,62 a 8,24
48	0,9505	0,187 a 1,0	0,097 a 1,215	1,5 a 8,0	1,74 a 8,42

XTT - 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide. UFC - Unidade Formadora de Colônias.  $R^2$  - Coeficiente de determinação. \* Valores calculados pela equação da reta fornecida pelo ajuste da regressão e convertidos com base no valor médio de  $8 \times 10^6$  UFC/mL da vacina de referência de trabalho BRABCG003.

As FIGURAS 21, 22 e 23 ilustram os ajustes obtidos nas avaliações de linearidade da técnica de redução do XTT a 3mg/mL baseada em Argüelles et al. (2005) nos três períodos de incubação estudados e as equações empregadas para o cálculo das concentrações medidas (TABELA 2).

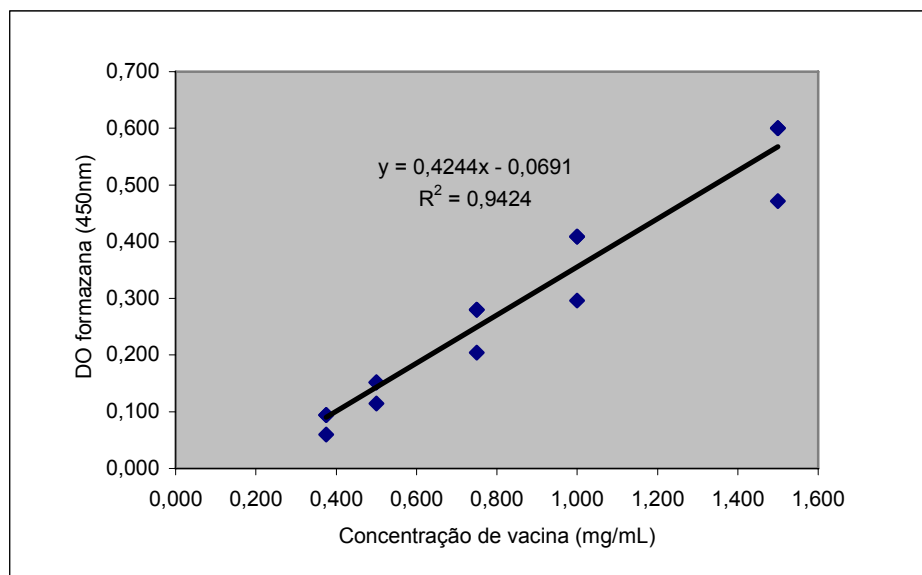


FIGURA 21. Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 3 horas de incubação. DO - Densidade ótica. y = densidade ótica da formazana presente na vacina em análise. x = concentração (mg/mL) conhecida ou teórica da vacina.

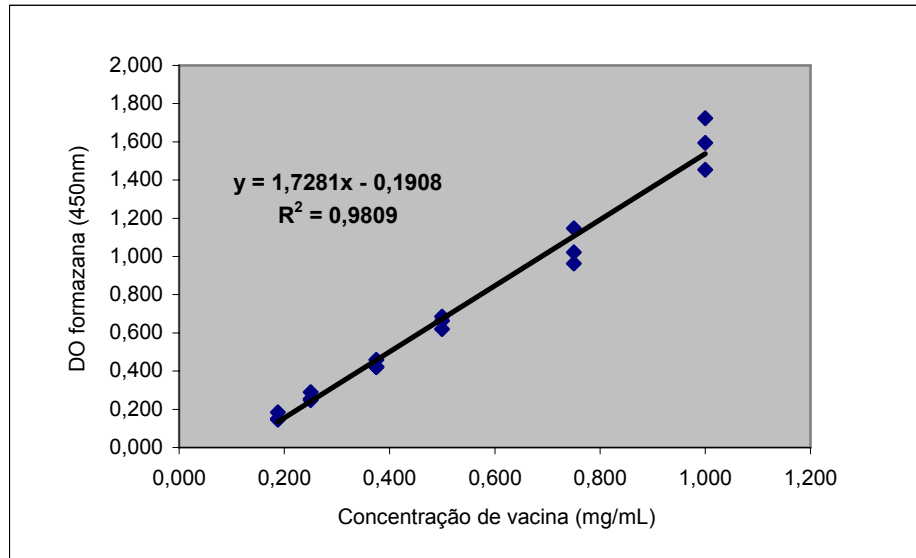


FIGURA 22. Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 24 horas de incubação. DO – Densidade ótica.  $y$  = densidade ótica da formazana presente na vacina em análise.  $x$  = concentração (mg/mL) conhecida ou teórica da vacina.

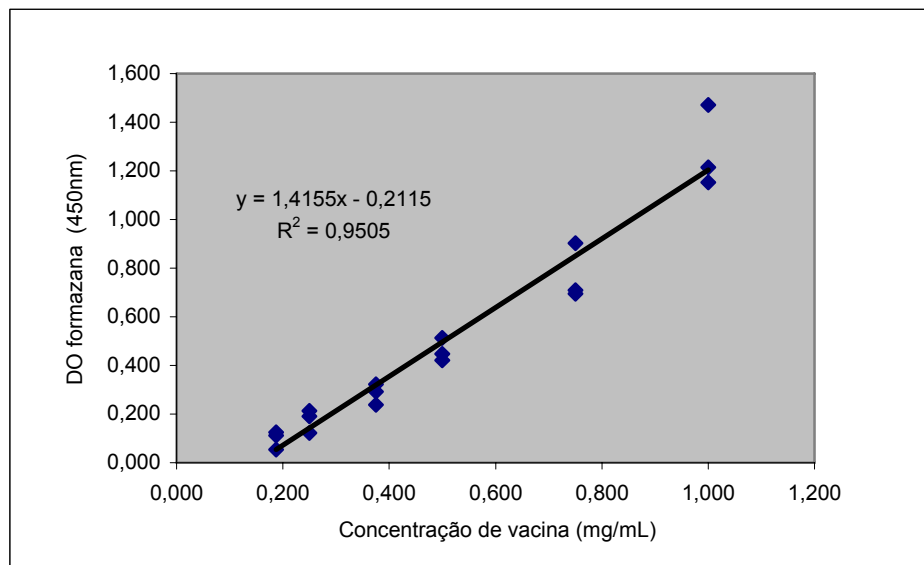


FIGURA 23. Ajuste da reta de regressão entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 48 horas de incubação. DO – Densidade ótica.  $y$  = densidade ótica da formazana presente na vacina em análise.  $x$  = concentração (mg/mL) conhecida ou teórica da vacina.

As FIGURAS 24, 25 e 26 ilustram a correspondência entre as densidades óticas e as UFC/mL fornecidas por cada concentração medida da vacina BRABCG003 e calculadas pelas equações da regressão obtidas nos ajustes dos ensaios de redução do XTT a 3 mg/mL baseados em Argüelles et al. (2005).

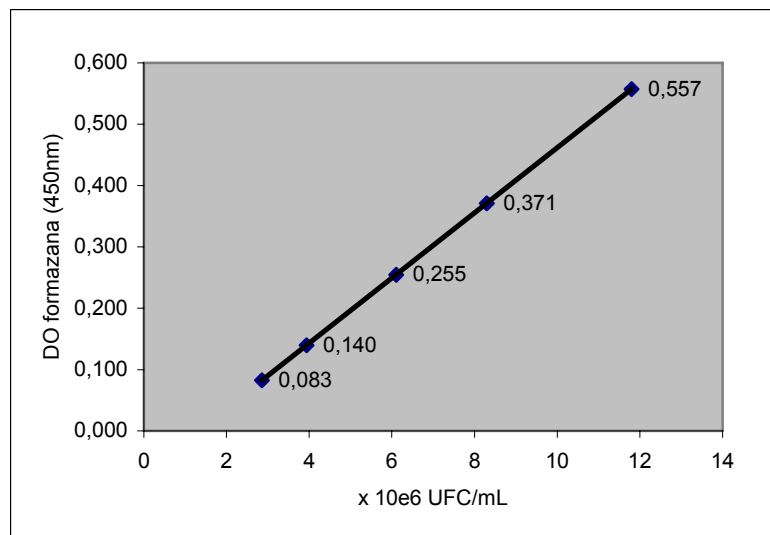


FIGURA 24. Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 3 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003. DO – Densidade ótica. UFC – unidades formadoras de colônias.

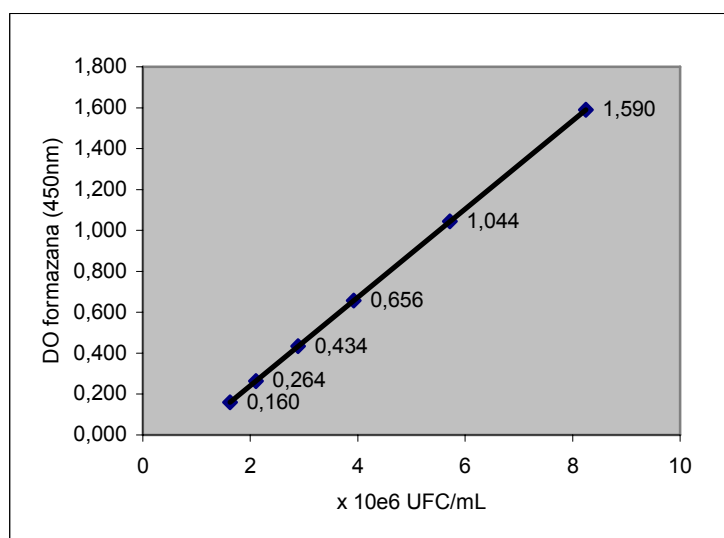


FIGURA 25. Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 24 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003. DO – Densidade ótica. UFC – unidades formadoras de colônias.

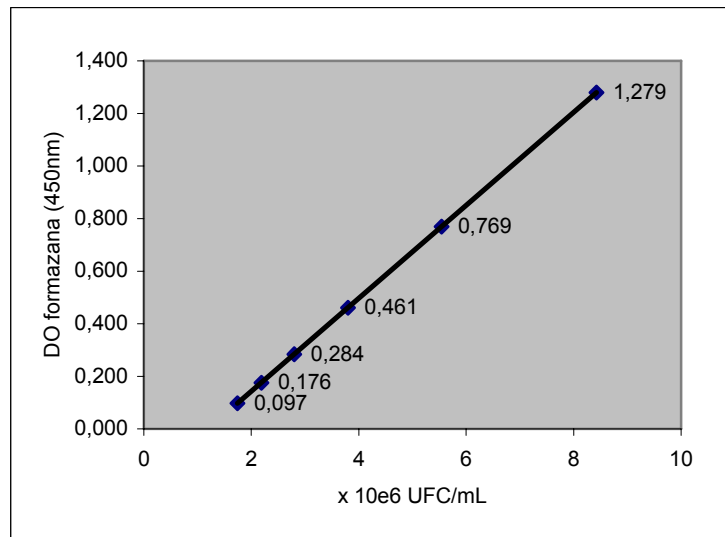


FIGURA 26. Correspondência entre as densidades óticas resultantes da redução do XTT a 3 mg/mL com base em Argüelles et al. (2005) após 48 horas de incubação e as concentrações medidas da vacina BRABCG003. DO – Densidade ótica. UFC – unidades formadoras de colônias.



A FIGURA 27 ilustra a reação de redução do XTT a 3 mg/mL em microplaca durante ensaio realizado para o preparo da curva de calibração da técnica baseada em Argüelles et al. (2005). Podem ser observadas as diferentes intensidades de coloração da formazana obtida como produto da redução do sal de tetrazol nas diluições seriadas da vacina BRABCG003 nos três tempos de incubação estudados. É possível verificar também as intensidades de coloração fornecidas pelos controles de opacidade e pelo Sauton utilizado para o preparo do branco.

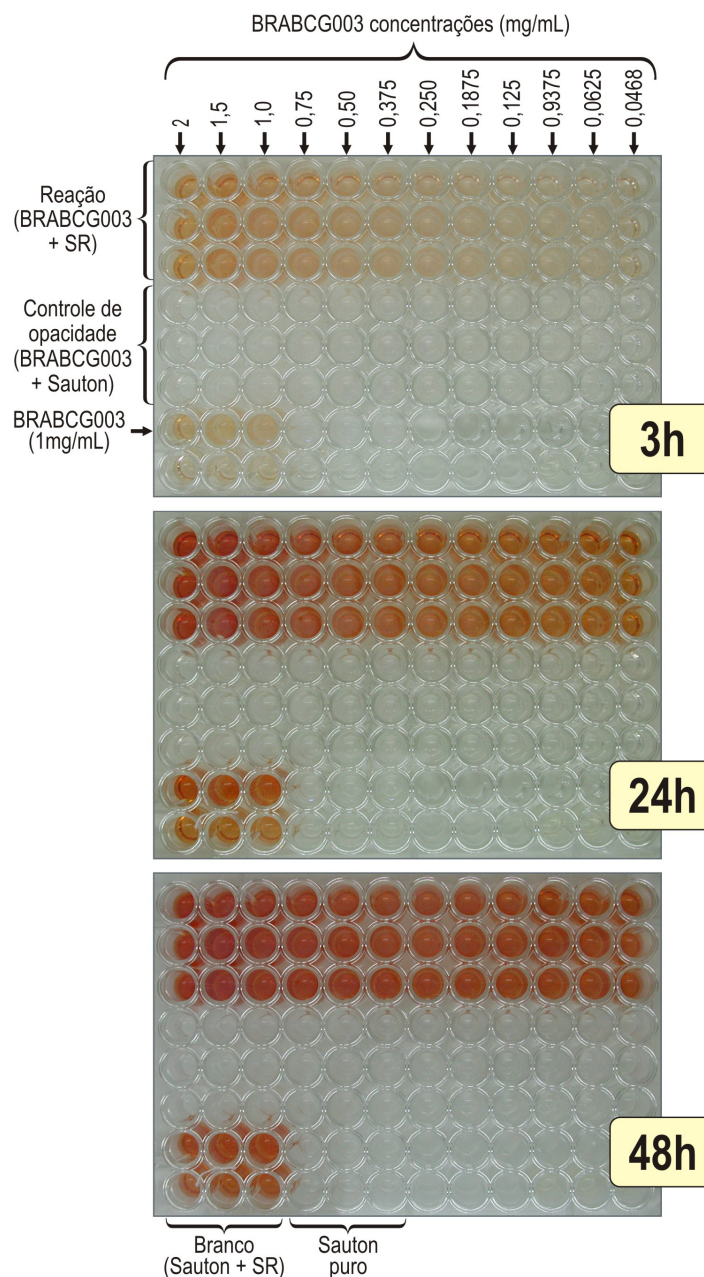


FIGURA 27. Visualização da reação em microplaca da redução do XTT a 3 mg/mL baseada em Argüelles et al. (2005). BRABCG003 – Vacina de referência de trabalho. SR – Solução de reação.



### 4.3. Análise de vacinas BCG-ID usadas na rotina de imunização do PNI:

A TABELA 3 reúne os dados obtidos no estudo da correlação dos resultados fornecidos pela redução do XTT a 1 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) com aqueles obtidos em ensaios realizados por contagem em LJ para os lotes de vacina usados na rotina de imunização do PNI.

Os coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) de 0,98 e 0,96 apresentados na TABELA 3 demonstram a existência de forte correlação (MOORE, 2005) entre os resultados de viabilidade fornecidos pelos dois métodos para os lotes de vacina nos três períodos de incubação.

Cabe ressaltar que o cálculo do número de viáveis para a amostra A foi inviabilizado uma vez que as densidades óticas obtidas para a vacina a 1 mg/mL foram inferiores àquelas quantificáveis pela reta de regressão para os tempos 24 e 48 horas.

TABELA 3. Correlação dos resultados obtidos por redução do XTT (1 mg/mL) com base em Kairo et al. (1999) e por contagem em LJ para lotes de vacina BCG-ID avaliados simultaneamente pelos dois métodos.

Método	Redução do XTT ( x 10 <sup>6</sup> UFC/mL) *						LJ (x 10 <sup>6</sup> UFC/mL) *		
	3 horas		24 horas		48 horas		Média	DP	
Tempo de Incubação	Média	DP	Média	DP	Média	DP			
Lotes	A	2,07	0,21	**	-	**	-	2,56	0,02
	B	4,57	0,18	4,33	0,14	4,69	0,16	4,70	0,44
	C	3,14	0,09	1,64	0,13	1,35	0,11	0,69	-
	D	5,58	0,10	4,86	0,21	5,07	0,18	3,05	-
	E	2,37	0,22	1,39	0,17	1,04	0,14	1,61	0,12
	F	5,27	0,20	7,87	0,24	8,12	0,22	5,50	0,85
BRABCG003 (2mg/mL)		18,15	0,52	16,74	0,15	16,68	0,26	14,30	-
		22,66	0,42	16,27	0,19	16,51	0,11	16,50	-
		22,39	0,71	15,38	0,24	15,45	0,20	18,60	-
Coefficiente de Pearson ( $r$ )	0,98		0,96		0,96				

XTT - 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide. BRABCG003 – Vacina de referência de trabalho. LJ – Lowenstein-Jensen. UFC – Unidade formadora de colônia. DP – Desvio padrão.

\* Média e desvio padrão de triplicatas, exceto para avaliação dos lotes C e D por contagem em LJ.

\*\* Quantificação inviabilizada. Abaixo do limite mínimo da faixa abrangida pelo ajuste linear.

A TABELA 4 reúne os dados da correlação entre a redução do XTT a 3 mg/mL em ensaios realizados com base em Argüelles et al. (2005) e a contagem em LJ. Foi constatada a existência de correlação moderada (MOORE, 2005) entre os resultados de viabilidade obtidos pelos dois métodos somente para o período de incubação de 3 horas. As leituras realizadas em 24 e 48 horas, não denotaram correlação com a viabilidade fornecida pelo método de contagem em LJ, de acordo com os valores dos coeficientes de Pearson apresentados e que se aproximaram de zero (MOORE, 2005). Deve-se, no entanto considerar que os métodos foram realizados em dias diferentes e que foram utilizadas ampolas diferentes de cada lote para a execução de cada método.

TABELA 4. Correlação dos resultados obtidos por redução do XTT (3 mg/mL) com base em Argüelles et al. (2005) e por contagem em LJ para lotes de vacina BCG-ID.

Método *	Redução do XTT ** ( x 10 <sup>6</sup> UFC/mL)						LJ ** (x 10 <sup>6</sup> UFC/mL)		
	3 horas		24 horas		48 horas		Média	DP	
Tempo de Incubação	Média	DP	Média	DP	Média	DP			
Lotes	A	3,34	0,13	1,76	0,04	2,77	0,10	2,56	0,02
	B	4,27	0,24	2,13	0,04	3,20	0,05	4,70	0,44
	C	4,02	0,16	3,84	0,10	5,43	0,06	0,69	-
	D	5,21	0,10	4,73	0,07	6,65	0,14	3,05	-
	E	4,46	0,25	4,21	0,19	5,97	0,24	1,61	0,12
	F	7,11	0,14	5,76	0,06	7,86	0,07	5,50	0,85
BRABCG003 (1mg/mL)	-	-	7,75	0,11	11,19	0,13	-	-	
	6,51	0,20	7,87	0,12	11,82	0,16	-	-	
	6,15	0,15	7,95	0,12	11,43	0,20	-	-	
Coefficiente de Pearson (r)	0,65		0,17		0,15				

XTT - 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide. BRABCG003 – Vacina de referência de trabalho. LJ – Lowenstein-Jensen. UFC – Unidade formadora de colônia. DP – Desvio padrão.

\* As técnicas foram realizadas em momentos diferentes, partindo-se de *pools* preparados com ampolas diferentes do mesmo lote de vacina.

\*\* Média e desvio padrão de triplicatas, exceto para avaliação dos lotes C e D por contagem em LJ.

Os coeficientes de correlação apresentados na TABELA 5 mostram a existência de correlação entre os resultados fornecidos pelas duas técnicas de redução do XTT para os lotes de vacina, apesar das amostragens analisadas terem diferido. Os graus de correlação entre as técnicas variaram segundo os tempos de incubação, sendo os resultados obtidos em 3 horas mais fortemente correlacionados (MOORE, 2005).

TABELA 5. Correlação dos resultados obtidos por redução do XTT com base em Kairo et al.(1999) e em Argüelles et al. (2005) para amostras de vacina BCG-ID.

Tempo de Incubação	3 horas		24 horas		48 horas		
	Kairo*	Argüelles*	Kairo*	Argüelles*	Kairo*	Argüelles*	
Lotes	A	2,08	3,34	**	1,76	**	2,77
	B	4,57	4,27	4,33	2,13	4,69	3,20
	C	3,15	4,02	1,64	3,84	1,35	5,43
	D	5,59	5,21	4,86	4,73	5,07	6,65
	E	2,37	4,46	1,39	4,21	1,04	5,97
	F	5,27	7,11	7,87	5,76	8,12	7,86
Coeficiente de Pearson (r)		0,73		0,46		0,40	

\* As técnicas foram realizadas em momentos diferentes, partindo-se de *pools* preparados com ampolas diferentes do mesmo lote de vacina.

\*\* Quantificação inviabilizada. Abaixo do limite mínimo da faixa abrangida pelo ajuste linear.

## 5. DISCUSSÃO

As etapas críticas incluídas no processo de produção da vacina BCG, como a pesagem e homogeneização da massa bacilar e a liofilização fazem da quantidade de bacilos viáveis presentes no produto final um importante indicador da consistência de produção deste imunobiológico (MILSTIEN; GIBSON, 1990; LUGOSI, 1992). Portanto, as avaliações da viabilidade do bacilo durante o processo de produção e também no produto final permitem o monitoramento da qualidade da vacina, que deve oferecer quantidades aceitáveis de unidades viáveis de BCG de acordo com os limites estabelecidos na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2002).

A busca por métodos mais precisos para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina tem sido apontada pela OMS como uma necessidade de fundamental importância, considerando as limitações oferecidas pela técnica convencional de contagem de colônias em meio sólido. As dificuldades na padronização das condições de ensaio e as características conferidas à vacina pelas propriedades do microrganismo de difícil dispersão e cultivo limitam a obtenção de resultados com repetitividade e reprodutibilidade adequadas quando se utiliza o método oficial de contagem em meio de cultura sólido (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006).

A literatura especializada, que em geral provem de laboratórios que aplicam a técnica oficial e que reconhecem suas limitações, permite verificar buscas de adequação de métodos objetivando o aumento da precisão e da rapidez na determinação da viabilidade do BCG na vacina (STAVRI et al., 1974; GHEORGHIU; LAGRANDERIE, 1979; KAIRO et al., 1999). Dentre os métodos estudados, a redução dos sais de tetrazol em formazana quantificável por colorimetria, vem sendo avaliada com resultados encorajadores, inicialmente relatados por Kairo e colaboradores (1999).

Com base nos resultados promissores obtidos por diferentes autores (KAIRO et al., 1999; STEFANOVA; ZHELEV, 2004; JANASZEK-SEYDLITZ, 2004; ARGÜELLES et al., 2004; 2005), buscou-se no presente estudo avaliar a técnica aplicando-a ao controle da vacina BCG produzida no Brasil com a cepa Moreau – RJ.

A demonstração da existência de proporcionalidade direta entre os resultados fornecidos e as concentrações do produto em análise é uma das premissas na avaliação de técnicas a serem aplicadas às dosagens biológicas, sendo possibilitada

por meio do estudo da linearidade do método (*Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques*, 2002).

Com este propósito vários autores vêm demonstrando, desde o desenvolvimento da técnica de redução dos sais de tetrazol por Mosmann e colaboradores (1983), que os valores de opacidade fornecidos pela formazana como produto da reação variam diretamente em função das concentrações de células viáveis presentes no sistema estudado e que se encontram metabolicamente aptas a reduzir o substrato (Ma; NICHOLL, 1996; McCLUSKEY; QUINN; Mc GRATH, 2005).

Neste trabalho o estudo das curvas dose-resposta fornecidas pela técnica de redução do XTT para quantificação de BCG viável presente na vacina de referência de trabalho BRABCG003 permitiu constatar a existência de proporcionalidade entre as densidades óticas fornecidas pela formazana à cada concentração analisada da vacina. Assim, o estudo das curvas de calibração forneceu coeficientes de determinação ( $R^2$ ) sempre superiores a 0,90 (TABELA 1) demonstrando a existência de proporcionalidade direta entre as densidades óticas e as concentrações da vacina BRABCG003 em todas as condições avaliadas (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO, E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003). Os coeficientes variaram entre 0,96 e 0,99 em função das condições de ensaio que diferiram quanto à concentração da solução do XTT utilizada na reação e os períodos de incubação das microplacas a  $37 \pm 1$  °C. Estes resultados confirmam relatos anteriores de existência de proporcionalidade entre as variáveis absorvância da formazana e concentração de BCG viável, com coeficientes de determinação de 0,98 (MSHANA et al., 1998) e 0,99 (ARGÜELLES et al., 2005). Já Stefanova & Zhelev (2003) consideraram o coeficiente de determinação de 0,84 adequado à caracterização da proporcionalidade entre as densidades ótica e as concentrações de viáveis em amostras de vacina BCG. Apesar desses coeficientes indicarem sempre a existência de correlação entre as variáveis, a sua intensidade mostra-se variável, provavelmente em função das condições experimentais empregadas em cada caso e das cepas utilizadas no preparo das diferentes vacinas analisadas.

Os experimentos realizados com diferentes concentrações do XTT permitiram verificar que quando o sal foi empregado a 3 mg/mL o *plateau* foi atingido nas duas últimas concentrações da vacina BRABCG003, não permitindo que o estudo de linearidade fosse estendido a toda a faixa de trabalho prevista ( $0,12$  a  $16 \times 10^6$  UFC/mL)

após 24 e 48 de incubação (FIGURA 7). Por outro lado quando as soluções de reação foram preparadas com o XTT a 1 e a 2 mg/mL o estudo dos ajustes pôde ser expandido facilitando a avaliação de concentrações alvo contidas na faixa de trabalho (FIGURAS 5 e 6). Assim diferentemente aos achados de Kairo et al. (1999) que obtiveram curva de calibração ótima com o uso do XTT a 3 mg/mL e incubação por 48 horas, constatamos em nossas avaliações que os ajustes ideais mantiveram-se sempre nos ensaios realizados com o XTT a 1 mg/mL. Com esta concentração do substrato, as curvas foram avaliadas em toda a sua extensão e os ajustes da regressão abrangeram faixas de 1,0 a  $16,0 \times 10^6$  UFC/mL após 3 horas de incubação e 2,0 a  $16 \times 10^6$  UFC/mL para 24 e 48 de reação (FIGURAS 11, 12 e 13). Deve-se, no entanto notar que o uso do XTT concentrado a 3 mg/mL permitiu a análise de menores concentrações da vacina após 24 e 48 horas de incubação (TABELA 1). Esta observação pode indicar a adequação destas condições à análise de vacinas com menores teores de viáveis, como àquelas avaliadas nos ensaios de termoestabilidade. De forma semelhante, as faixas de trabalho em que outros autores obtiveram linearidade também variaram. Enquanto Kairo e colaboradores (1999) obtiveram ajuste aparentemente entre 0,4 e  $16,0 \times 10^6$  UFC/mL após 48 horas de incubação, Janaszek-Seydlitz (2004) obteve linearidade entre  $0,4 \times 10^5$  e  $16 \times 10^6$  UFC/mL e Mshana e colaboradores (1998) entre as concentrações de BCG de  $2,0 \times 10^7$  e  $1,0 \times 10^9$  bactérias/poço, porém este último, em curvas resultantes de ensaios de redução do MTT.

Dentre as variações de condições experimentais encontradas na literatura para as dosagens de BCG e de *M. tuberculosis* pelo método de redução de tetrazóis, podemos citar, além da utilização de diferentes sais, o uso de diferentes veículos na reconstituição, na diluição das células e no preparo das soluções de sais, e ainda diferentes tempos de incubação. Assim, enquanto Kairo e colaboradores (1999) empregaram caldo Middlebrook 7H9 na reconstituição, diluição das vacinas e também no preparo das soluções do sal, outros estudos incluem o uso de solução tampão fosfato para o preparo do XTT (BEDWELL, KAIRO, CORBEL, 2001; DE LOGU et al., 2001; 2003) e meio líquido Sauton para a reconstituição e diluição de vacinas (ARGÜELLES et al., 2004; 2005).

Tendo em vista a possível interferência de substâncias químicas que podem mascarar os resultados obtidos pela técnica de redução do sal de tetrazol, a natureza dos controles e as densidades óticas fornecidas pelos mesmos devem ser

cuidadosamente estudadas, adaptadas e padronizadas como itens essenciais em protocolos de ensaios específicos (SCUDIERO, 1988; BEDWELL, KAIRO, CORBEL, 2001; ALBAKRI; AFIFI, 2007). No entanto as publicações mostram variações entre os controles utilizados, além de raramente apresentarem objetivamente a contribuição quantitativa destes nas densidades óticas fornecidas pela técnica ou mesmo o sistema adotado para o desconto das opacidades fornecidas pelos brancos.

Assim, como em outras publicações, os trabalhos divulgados por Argüelles et al. (2005) não incluem detalhamento quanto à natureza do branco e dos controles incluídos nos ensaios. Contudo, o treinamento que tivemos oportunidade de realizar junto à equipe da Dra. Argüelles no mês de dezembro de 2007, possibilitou o conhecimento mais aprofundado da técnica de redução do XTT utilizada no Instituto Dr. Carlos Malbrán (Buenos Aires – Argentina) como controle alternativo de viabilidade do BCG em amostras de vacina BCG-ID e do BCG para uso intravesical. Desta forma, foi possibilitada a reprodução dos controles realizados durante os ensaios com a técnica baseada em Argüelles et al. (2005).

No sistema estudado neste trabalho, considerou-se necessário o monitoramento das variáveis capazes de produzir a quantificação de inespecificidade oriunda do próprio produto ou do sistema utilizado para a reação e que consiste em BCG viável somado à matriz da vacina e ao diluente utilizado no preparo das diluições de vacina. Cabe mencionar que as vacinas estudadas no presente trabalho foram reconstituídas com solução de cloreto de sódio a 0,9% conforme orientação do fabricante. Este fato exigiu a avaliação quanto ao desconto do branco da maior concentração da vacina (2 mg/mL), visto que a mesma não incluiu o meio de cultura empregado no preparo do branco.

O fato dos sais de tetrazol serem reduzidos por qualquer célula viva, faz da redução do XTT uma técnica de quantificação não seletiva, exigindo a garantia quanto à presença exclusiva do microrganismo alvo no produto a ser analisado. Desta forma, as vacinas incluídas no presente estudo foram previamente avaliadas quanto à esterilidade que garantiu a ausência de elementos contaminantes de origem bacteriana e fúngica e também à prova de identidade para a certificação quanto à presença exclusiva de bacilos álcool-ácido resistentes (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE NACIONAL EM SAÚDE, 2007; 2004).

Os controles, negativo e de opacidade, e o branco incluídos nos ensaios baseados em Kairo et al. (1999) para a construção das curvas de calibração propiciaram o conhecimento de possíveis interferências. Como demonstrado nas FIGURAS 8, 9 e 10, ao se empregar como branco a mistura de caldo Middlebrook 7H9 e solução de reação foi possibilitado o desconto do *background* produzido pelo meio de cultura utilizado no preparo da solução do XTT e nas diluições da vacina. Já o controle de opacidade que consistiu na suspensão da vacina BRABCG003 acrescida somente de caldo Middlebrook 7H9 permitiu a verificação da existência de absorvância independentemente da adição do reagente XTT. Por fim, a análise da vacina inativada, por meio do controle negativo, objetivou verificar a redução do sal por componentes da matriz da vacina e que identificamos por inespecificidade.

As opacidades fornecidas pelo branco evidenciaram que a utilização do caldo Middlebrook 7H9 para o preparo das soluções de XTT e para a diluição das vacinas resultou em elevados níveis de *background*, sobretudo com o XTT a 3 mg/mL. Este fato pode ter favorecido a obtenção de densidades óticas superiores a 3,0 para a vacina BRABCG003 nas concentrações de 2 e 1 mg/mL após incubação por 24 e 48 horas, conforme visualizado na FIGURA 7. Mesmo assim, o ajuste linear indicou a adequação do desconto da densidade ótica do branco a cada diluição analisada da vacina BRABCG003. Apesar de Kairo et al. (1999) terem utilizado estas mesmas condições não relataram a interferência do *background* em seus resultados, além de não fornecerem detalhes quanto ao tratamento dado aos controles.

Nos ensaios realizados com base em Kairo et al. (1999) a modificação de coloração da solução de XTT, do amarelo citrino ao alaranjado, foi observada ainda durante o aquecimento da solução do sal para dissolução e, portanto antes da adição do carreador de elétrons e de sua mistura às diluições da vacina, sugerindo a ação de interferentes presentes no caldo Middlebrook 7H9 empregado já no preparo da solução.

As faixas de linearidade obtidas com o XTT a 1 mg/mL incluíram a maior concentração da vacina BRABCG003 (2 mg/mL). Cabe mencionar que esta concentração da vacina incluiu somente o caldo Middlebrook 7H9 presente na solução de reação. Mesmo assim, a subtração do branco de sua densidade ótica não alterou o ajuste da regressão. Contrariamente, ao se tentar o ajuste sem o desconto do branco para esta concentração da vacina, não foi obtido o ajuste, o que exigiria a eliminação



deste ponto da faixa de trabalho. Esta observação sugere ser grande parte do *background* atribuído ao caldo Middlebrook 7H9 usado já no preparo da solução do XTT, independentemente da concentração deste último. A redução das concentrações do XTT empregado nas reações baseadas em Kairo et al. (1999) possibilitou a diminuição deste efeito, porém não completamente (FIGURAS 9 e 10).

Já na técnica baseada em Argüelles et al. (2005), como o XTT foi dissolvido em solução tampão fosfato, a solução de reação não apresentou *background* perceptível. Entretanto, o branco preparado com meio líquido Sauton produziu níveis elevados de *background* (FIGURA 20), superiores àqueles obtidos quando empregou-se o XTT a 3 mg/mL em reações realizadas com base em Kairo et al. (1999) (FIGURA 10) e também maiores do que àqueles observados durante os ensaios realizados junto à equipe da Dra. Argüelles, quando foi usado o meio Sauton produzido no Instituto Dr. C. G. Malbrán. O sistema de desconto do branco adotado por Argüelles et al. (2005) foi igualmente favorável aos ajustes lineares obtidos no presente estudo. Ressalta-se o fato de não terem sido feitos os descontos do branco na maior concentração da vacina BRABCG003, uma vez que esta mistura não foi acrescida de meio líquido Sauton, mas somente de solução de cloreto de sódio a 0,9% e de solução de reação igualmente isenta de Sauton.

Os coeficientes de determinação obtidos nos ensaios realizados com base em Argüelles et al. (2005) também indicaram a existência de proporção entre as densidades óticas e as concentrações da vacina BRABCG003 (TABELA 2). A linearidade do método foi igualmente demonstrada após 3, 24 e 48 horas com ajustes lineares de abrangência variada (FIGURAS 21, 22 e 23), porém não incluíram a maior concentração da vacina BRABCG003.

Componentes da solução de enriquecimento adicionada ao caldo Middlebrook 7H9, como a albumina e a catalase e outros presentes no meio líquido Sauton, como o ácido cítrico e a asparagina, podem ter promovido redução abiótica do XTT contribuindo para a elevação do *background*. Como o sucesso de um sistema tetrazol-formazana requer que o substrato apresente muito pouca coloração em relação ao produto de sua redução, que deve prover coloração intensa sob comprimento de onda apropriado, deve-se buscar alternativas para que seja reduzido o *background* (PAULL et al., 1988). Portanto, a utilização de solução tampão fosfato para o preparo da solução de XTT mostrou-se mais adequada quanto à redução do *background* conferido

à reação, como observado nos ensaios baseados em Argüelles et al. (2005). Consideramos importante continuar a investigação sobre outros veículos possíveis para a diluição das vacinas, de forma que a reação permaneça isenta de *background* produzido por elementos oxidantes cuja presença gera redução inespecífica do sal de tetrazol.

No presente estudo os controles negativos preparados com vacina inativada e incluídos nos ensaios baseados em Kairo et al. (1999) forneceram densidades óticas superiores àquelas produzidas pelos controles de opacidade preparados com a vacina BRABCG003 sem a adição da solução contendo o XTT (FIGURAS 8, 9, e 10). Este dado sugere a possível interferência de componentes da vacina nas medidas de absorvância, confirmando questões relativas ao *background* produzido pelas matrizes dos produtos analisados (SCUDIERO et al., 1988). Já nos relatos de Kairo et al. (1999) uma amostra de vacina inativada, também a 70 °C por 60 minutos, foi incluída como uma vacina em análise que se mostrou isenta de viáveis quando avaliada por redução do XTT. No entanto, estes autores, assim como Argüelles et al. (2005), não desprezaram a inclusão de controles negativos em seus estudos de linearidade do método. Assim, diferentemente de nossos estudos, os autores não mencionam a possível interferência de componentes da matriz da vacina analisada nos resultados obtidos durante a padronização da técnica.

Em nossos experimentos, os controles negativos mostraram-se fundamentais, sobretudo para a análise de vacinas com menores teores de viáveis que podem ser quantificados de forma equivocada por encontrarem-se próximos ou abaixo de um suposto limite ou *baseline* correspondente às densidades óticas originadas por interferentes presentes nas matrizes das vacinas avaliadas.

Cabe ressaltar que volumes da vacina inativada usada como controle negativo foram inoculados em 10 tubos com LJ não ocorrendo crescimento de colônias no período de quatro semanas. Contudo, deve-se considerar hipoteticamente a possibilidade de inativação incompleta dos bacilos presentes na suspensão e que por encontrarem-se em baixas concentrações não foram detectados por cultivo, porém continuaram capazes de reduzir o XTT produzindo formazana. Observação semelhante foi relatada por Mshana e colaboradores (1998) que ao estudarem a redução do MTT pelo BCG, empregaram suspensões do bacilo que poderiam não ter sido completamente inativadas pelo calor (91°C por 15 minutos) em virtude da maior

resistência dos bacilos contidos nos grumos. Mediante esta possibilidade, a provável existência de um limite mínimo, ou *baseline*, não foi considerada para efeito de interpretação dos resultados incluídos no presente estudo, pois para isto seria necessário o estudo mais aprofundado quanto à eficácia do sistema de inativação do BCG nas concentrações de vacina empregadas nos ensaios. Este é um fator relevante que deve ser cuidadosamente estudado por ocasião do estabelecimento dos limites de detecção e de quantificação da técnica de redução do XTT aplicado ao controle de vacina BCG.

As densidades óticas fornecidas pelo controles de opacidade, preparados com vacina isenta de solução de reação, foram sempre inferiores àquelas obtidas com o controle negativo e com o branco e mantiveram-se praticamente inalteradas durante as 48 horas de observação, não sendo sua influência significativa aos resultados. Apesar de não incluído nos estudos de Kairo et al. (1999), o uso do filtro de referência de 655 nm em nossos ensaios conferiu caráter insignificante aos valores de opacidade fornecidos pela matriz da vacina na ausência do sal de tetrazol. De fato, segundo AlBakri & Afifi (2007) filtros de referência superiores a 625nm reduzem o efeito *background* produzido por células e outros artefatos presentes no sistema estudado.

Já nos procedimentos baseados em Argüelles et al. (2005) cujas leituras foram realizadas sem filtro de referência, foi necessário o preparo dos controles de opacidade e os descontos das densidades óticas de cada diluição da vacina empregada na construção da curva. Como apresentado na FIGURA 19, os valores obtidos nos controles de opacidade de cada diluição de vacina não sofreram alterações significativas com o decorrer do tempo de incubação, o que pode indicar não ter ocorrido, no período de 48 horas, modificação significativa das concentrações originais de bacilos em cada uma das diluições avaliadas.

Todas essas observações relacionadas aos controles evidenciaram a importância do estudo e adequação do método ao produto a ser analisado tendo em vista a detecção de interferentes que podem alterar a sensibilidade do método. Portanto, os protocolos de avaliações futuras desta técnica devem incluir um maior detalhamento dos procedimentos de preparo e tratamento dado aos resultados fornecidos por estes controles.

No entanto, as condições experimentais adotadas no presente estudo para a avaliação das técnicas baseadas em Kairo et al. (1999) e em Argüelles et al. (2005)

aplicadas à análise da vacina preparada com o BCG Moreau-RJ permitiram demonstrar a linearidade entre as densidades óticas produzidas pela formazana e as concentrações de BCG viáveis presentes na vacina de referência de trabalho, confirmando os relatos anteriores destes pesquisadores quanto à existência de proporcionalidade entre estas variáveis.

Para a técnica baseada em Kairo et al. (1999), a melhor adequação das faixas abrangidas pelo ajuste linear com o XTT a 1 mg/mL, com as concentrações de 1,0 a  $16,0 \times 10^6$  e 2,0 a  $16,0 \times 10^6$  UFC/mL após 3 e 24 ou 48 horas respectivamente, fez com que estas condições experimentais fossem escolhidas para a análise dos lotes de vacinas BCG-ID empregadas na rotina de imunização do PNI. Cabe ressaltar que os coeficientes de determinação de 0,99, obtidos nestas condições experimentais, estão em acordo com o previsto na Resolução nº 899 / 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) que dispõe dos requisitos necessários à validação de métodos bioanalíticos.

Já a técnica baseada em Argüelles et al. (2005) exigiria um melhor ajuste das condições de ensaio a fim de adequá-las aos parâmetros previstos na legislação, tendo em vista que os coeficientes de determinação obtidos pelo ajuste linear, apesar de indicarem proporcionalidade entre as variáveis, foram sempre inferiores ao valor mínimo de 0,99 previsto na Resolução nº 899 / 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

Desde que Mosmann (1983) desenvolveu o método de redução dos sais de tetrazol para a quantificação da atividade metabólica de diferentes tipos celulares, vários autores vêm estudando a concordância entre os resultados fornecidos por este método e pelos métodos convencionais. Assim, quando a técnica de redução do XTT foi aplicada ao estudo de proliferação de *Leishmania mexicana*, Willians et al. (2003) obtiveram coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,965 com a quantificação realizada por microscopia. Já Peck (1985) avaliou indiretamente a atividade bactericida de macrófagos, com a quantificação de procariontes pelo uso do MTT, obtendo resultados bastante próximos àqueles fornecidos pela contagem de colônias em meio de cultura.

De forma semelhante, avaliações de atividade metabólica de outras bactérias realizadas mais recentemente com o uso do XTT, têm igualmente permitido a demonstração de forte concordância com os métodos convencionais de estimativa da viabilidade (ROSLEV; KING, 1993; Mc CLUSKEY et al. 2005; MORIARTY et al. 2005).

Al-Bakri & Afifi (2007) ao determinarem a concentração mínima inibitória de extratos de plantas, relataram a inexistência ou fraca correlação entre a redução do

XTT e os métodos de cultivo estabelecidos quando empregaram *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e que somente a dosagem de *Escherichia coli* foi fortemente correlacionada ao método de contagem em meio de cultura. Estes dados demonstram a necessidade de avaliação preliminar cuidadosa da sensibilidade do microrganismo ao sistema e de possíveis fatores que venham a afetar o desenvolvimento da formazana e de sua associação à célula (THOM et al., 1993).

Entretanto, estudos semelhantes realizados com *M. tuberculosis* têm indicado forte correspondência entre os resultados obtidos pela redução do XTT e por diluição em ágar (DE LOGU et al., 2001; 2003).

No presente trabalho a técnica de redução do XTT a 1 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) forneceu resultados correlacionáveis àqueles obtidos para os lotes de vacina BCG-ID preparadas com a cepa Moreau-RJ e avaliados paralelamente por cultivo em LJ. Assim, os coeficientes de Pearson de 0,98 e 0,96 indicaram forte correlação (MOORE, 2005) entre os métodos independentemente do período de incubação da reação de redução do XTT. Estes dados confirmam a forte correlação relatada por Kairo et al. (1999) com coeficiente de Pearson de 0,94, apesar destes autores terem utilizado o XTT a 3 mg/mL para a execução de seus ensaios com vacinas preparadas com outras cepas do BCG. De forma similar, Janaszek-Seydlitz (2004) obteve correlação significativa ( $r \geq 0,82$ ) entre os resultados fornecidos pelos dois métodos para vacinas preparadas com a cepa Moreau utilizada na Polônia.

Ao examinar os resultados fornecidos por cada método para as vacinas BCG-ID (TABELA 3) segundo o critério preconizado pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2002) quanto aos limites de viáveis para que a vacina seja considerada satisfatória ( $2 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  UFC/mL), nota-se 100% de concordância na interpretação final dos resultados fornecidos pelos dois métodos somente para a redução do XTT após 24 e 48 horas incubação. Já para os resultados obtidos com 3 horas de incubação, os lotes C e E seriam considerados satisfatórios pela redução do XTT e insatisfatórios pela contagem em meio sólido. Estes dados indicam a necessidade da permanência das microplacas em incubação durante 48 horas para que se obtenham resultados definitivos em futuras avaliações da técnica de redução do XTT.

Já os números de BCG viáveis obtidos neste trabalho pela técnica baseada em Argüelles et al. (2005) após 3 horas de incubação foram correlacionáveis aos fornecidos pelas contagens em LJ, porém de forma moderada como indicado pelo

coeficiente de Pearson 0,65 (MOORE, 2005). Este grau de correlação difere daquele apresentado por Argüelles et al. (2005) que verificaram relação muito forte entre as técnicas ( $r=0,977$ ). A discrepância entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi de fato refletida na interpretação final dos resultados com base nos valores de referência de  $2 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  UFC/mL preconizados na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2002), em que não se obteve, em nenhum dos períodos de incubação, 100% de correspondência entre as interpretações. Esta divergência pode ser explicada pela utilização, em nossos ensaios, de ampolas diferentes de cada lote de vacina para a análise por cada um dos métodos. Portanto, a realização das técnicas em dias diferentes pode assim ter prejudicado o estabelecimento de correlação entre os dois métodos.

A correlação entre os números de viáveis obtidos para cada lote de vacina analisado pelas técnicas de redução do XTT baseada em Kairo et al. (1999) e em Argüelles et al. (2005) (TABELA 5), mostrou-se mais forte, sobretudo para as leituras realizadas após 3 horas de incubação com coeficiente de Pearson de 0,73 e em menor grau para 24 ( $r = 0,46$ ) e 48 horas ( $r = 0,40$ ) (MOORE, 2005). As leituras realizadas em 3 horas forneceram resultados 100% satisfatórios com relação ao valor de referência mínimo previsto Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2002). Todavia, este quadro se modifica no decorrer do tempo de incubação, indicando diferença entre as cinéticas de redução das duas técnicas avaliadas.

Segundo Hatzinger et al. (2003), além do número de células viáveis outros fatores podem alterar a dosagem de atividade metabólica em microrganismos. Como já mencionado, a inibição da reação ou mesmo a redução abiótica do XTT por substâncias presentes no sistema, variações entre cepas ou mesmo diferentes modos de crescimento podem afetar a produção da formazana (KUHN et al., 2003; HONRAET; GOETGHEBEUR; NELIS, 2005). Portanto, estes fatores devem colaborar para as diferenças entre os valores obtidos por cada pesquisador em suas avaliações, sendo necessárias medidas que uniformizem, sempre que possível, os procedimentos de ensaio e interpretação dos resultados.

Buscando viabilizar os estudos de correlação e a sua comparação aos dados já divulgados por outros autores, os procedimentos aplicados neste estudo para o cálculo e interpretação dos resultados foram realizados de forma similar àqueles utilizados nos trabalhos referentes à aplicação do método de redução do XTT para determinação do

BCG viável em amostras de vacina. No entanto itens fundamentais devem ser considerados em futuras avaliações que objetivem a validação do método.

De acordo com o princípio aplicado por entidades como a OMS e as farmacopéias, a eleição de um método, sua padronização e validação para uso no controle da vacina BCG devem prever avaliações que o caracterizem como adequado ao fim a que se propõe, considerando as características dos produtos a serem controlados. O estudo de características de desempenho do método como a especificidade, intervalos de medição, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação devem estar previstos, bem delineados, e avaliados frente a padrões adequadamente estabelecidos favorecendo o êxito dos estudos interlaboratoriais necessários à validação dos métodos (BRASIL, 2003). Para aprofundar o estudo da correspondência entre as concentrações teórica e medida e a conseqüente expressão dos resultados em UFC/mL deve-se garantir a similaridade entre as curvas dose-resposta produzidas pela vacina de referência e pela vacina em análise, o que caracteriza a existência de paralelismo e, portanto o mesmo padrão de reação frente à exposição da vacina ao substrato (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2002).

O uso de lotes de vacina referência de trabalho estabelecidos internamente é comumente observado nos trabalhos publicados como conseqüência da inexistência de padrões estabelecidos em estudos interlaboratoriais para vacinas preparadas com diferentes cepas. Assim, como no presente estudo, foi necessária a utilização de uma vacina de referência com as mesmas características dos lotes de vacina analisados. É necessário que as matrizes de ambas tenham a mesma composição, que a cepa do BCG seja a mesma e que a reconstituição seja feita com o mesmo tipo de diluente. Esta necessidade limita a disponibilidade de padrões estabelecidos em estudos interlaboratoriais, visto que os mesmos devem ser representativos das várias preparações comerciais em uso e que são produzidas com diferentes cepas do BCG.

De fato, o primeiro padrão de referência internacional para vacina BCG preparado com a cepa Japonesa 172 e estabelecido pela OMS em 1965 ainda encontra-se oficialmente em uso apesar de sua reconhecida falta de representatividade com relação às cepas usadas na produção das vacinas atuais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). No entanto a avaliação de exatidão da técnica de redução do XTT deve ser baseada no uso destes padrões de referência

adequadamente estabelecidos e que permitam expressar resultados isentos de tendências. Desta forma, deve ser incentivada a produção e o estabelecimento adequado de padrões regionais ou internacionais preparados com as diferentes cepas do BCG em uso.

Apesar do caráter preliminar das avaliações realizadas em lotes de vacina BCG-ID produzidos com a cepa Moreau – RJ e utilizados na rotina de imunização do país, os resultados indicaram a existência de correlação direta entre o método oficial de cultivo em LJ e a redução do XTT para a determinação da viabilidade do BCG em amostras de vacina, confirmando as observações Kairo et al. (1999). Esta constatação sugere fortemente a possibilidade da inclusão deste método na rotina laboratorial, inicialmente como uma técnica alternativa e de triagem, que mediante a avaliação de dados acumulados poderá substituir o método convencional cujas limitações podem conferir grande variabilidade aos resultados das análises.

A subestimativa de viáveis na vacina é citada na literatura como o resultado da sensibilidade reduzida do meio de LJ, do volume inadequado de inóculo, do recipiente e da superfície disponível ao cultivo e do sistema de vedação destes recipientes. Por promoverem crescimento reduzido do bacilo ou a confluência de colônias, estes fatores seriam determinantes de resultados subestimados e/ou tendenciosos (LUGOSI, 1992; TONUS, 2005).

Outros aspectos desvantajosos relacionados ao método convencional de avaliação da viabilidade são o alto custo do meio de cultura empregado, a longa duração do ensaio visto tratar-se de um microrganismo de crescimento lento, e os problemas acarretados pelas diferenças entre resultados obtidos pelos fabricantes e pelas autoridades de controle (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004c).

Portanto aspectos vantajosos oferecidos pelo método alternativo de redução do XTT, cuja importância pôde ser constatada no presente estudo, com a obtenção de resultados em 48 horas, correlação com o método oficial, maior precisão nas leituras espectrofométricas, relativo baixo custo e facilidade de execução, são fortes incentivos à escolha da técnica de redução do XTT para a determinação da viabilidade do BCG em substituição ao método de contagens de colônias em LJ.



## 6. CONCLUSÕES

- Foi demonstrada a linearidade da técnica baseada em Kairo et al. (1999) com a redução do XTT a 1, 2 e 3 mg/mL nos períodos de incubação de 3, 24 e 48 horas para a avaliação de vacina preparada com o BCG da cepa Moreau - RJ.

- Os ajustes lineares ideais da técnica baseada em Kairo et al. (1999) foram obtidos com o XTT a 1 mg/mL, com coeficientes de correlação de 0,99 em conformidade com a Resolução nº 899 / 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) que dispõe dos requisitos necessários à validação de métodos bioanalíticos. As faixas de concentrações abrangidas pelos ajustes variaram de acordo com o período de incubação a 37 +/- 1 °C:

- 3 horas:  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL a  $16,0 \times 10^6$  UFC/mL;

- 24 e 48 horas:  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL a  $16,0 \times 10^6$  UFC/mL.

- Foi demonstrada a linearidade da técnica baseada em Argüelles et al. (2005) com a redução do XTT a 3 mg/mL após 3, 24 e 48 horas de incubação para a avaliação de vacina preparada com o BCG da cepa Moreau - RJ, porém com coeficientes de determinação inferiores a 0,99 e portanto em desacordo como o previsto na legislação brasileira (BRASIL, 2003).

- Componentes dos meios de cultura empregados no preparo das soluções do XTT e na diluição das vacinas foram capazes de produzir elevado *background*. Existe a necessidade do estudo da interferência destes componentes para a busca de alternativas capazes de reduzir o efeito *background*.

- Os protocolos de avaliação da técnica de redução do XTT devem incluir maior detalhamento dos procedimentos de preparo e tratamento dado aos resultados fornecidos pelos controles e pelo branco, buscando a adequada neutralização do efeito *background* produzido pelos meios de cultura utilizados ou por interferentes presentes nas matrizes das vacinas em análise.

- Os resultados fornecidos pela técnica de redução do XTT a 1 mg/mL baseada em Kairo et al. (1999) para a avaliação de vacina preparada com o BCG da cepa Moreau - RJ foram fortemente correlacionáveis àqueles obtidos por cultivo em meio de LJ, com coeficientes de Pearson mínimo de 0,96.

- Com base nos valores de referência de  $2 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  UFC/mL preconizados na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2002) para a vacina BCG-ID foi constatado 100% de concordância na interpretação final dos resultados fornecidos pela técnica baseada em Kairo com redução do XTT a 1 mg/mL após 24 e 48 horas de incubação e por contagem em LJ.

- Os resultados fornecidos pela técnica baseada em Argüelles et al. (2005) para a avaliação de vacina preparada com o BCG da cepa Moreau - RJ após 3 horas de incubação foram correlacionáveis aos fornecidos pelas contagens em LJ, porém de forma moderada como indicado pelo coeficiente de Pearson 0,65.

- Os números de viáveis fornecidos pelas técnicas de redução do XTT baseada em Kairo et al. (1999) e em Argüelles et al. (2005) para a avaliação de vacina preparada com o BCG da cepa Moreau - RJ mostraram-se correlacionáveis, sobretudo para as leituras realizadas após 3 horas de incubação com coeficiente de Pearson de 0,73 e em menor grau para 24 ( $r = 0,46$ ) e 48 horas ( $r = 0,40$ ).

- Aspectos vantajosos oferecidos pelo método de redução do XTT e constatados neste estudo, como a forte correlação com o método oficial, a obtenção de resultados em 48 horas, a praticidade das leituras espectrofométricas, relativo baixo custo e facilidade de execução são fortes incentivos à inclusão deste método na rotina laboratorial, inicialmente como uma técnica alternativa e de triagem a ser realizada em paralelo ao método oficial de contagem em LJ.

## 7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados promissores obtidos no presente estudo, consideramos de fundamental importância para o INCQS a continuidade da pesquisa referente ao ensaio de redução do XTT aplicado ao controle da qualidade da vacina BCG.

Ressaltamos alguns pontos a serem investigados:

- Redução do efeito *background* através da avaliação de outros diluentes possíveis para a execução do ensaio.
- Contribuição de componentes da matriz da vacina capazes de interferir diretamente na quantificação.
- Avaliação dos limites de detecção e de quantificação, assim como de outros parâmetros de validação da técnica.

Destacamos ainda como perspectiva a participação em ensaios interlaboratoriais promovidos por organizações internacionais e a possível inclusão futura do ensaio de redução do XTT na rotina laboratorial do Setor de Vacinas – BCG do Departamento de Microbiologia do INCQS.

## REFERÊNCIAS

AL-BAKRI, A.; Afifi, F.U. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. **Journal of Microbiological Methods**, v.68, p.9-25, 2007.

ALLEN, E.G. Use of TS for electron transport studies in meningopneumonitis. reduced nicotinamide adenine dinucleotide system. **Journal of Bacteriology.**, v.90, p. 1505-1512, 1965.

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

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

ASKGAARD, D.S.; Gottschau, A.; Knudsen, K.; Bennedsen, J. Firefly luciferase assay of adenosine triphosphate as a tool of quantification of the viability of BCG vaccines. **Biologicals**, v.23, p.55-60, 1995.

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

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

BEDWELL, J.; Kairo, S.K.; Behr, M.A.; Bygraves, J.A. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. **Vaccine**, v.19, p.2146-2151, 2001.

BEDWELL, J.; Kairo, S.K.; Clorbel, M.J. Evaluation of tetrazolium salt test to determine absence of live mycobacteria in tuberculin purified protein derivative. **Biologicals**, v.29, p. 3-6, 2001.

BENÉVOLO-de-Andrade, T.C.; MONTEIRO, M.R.; COSGROVE, C.; CASTELLO-BRANCO, L.R. BCG Moreau Rio de Janeiro – Na oral vaccine against tuberculosis – Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.5, p.459-465, 2005.

BENSAID, A.; Thierie, J.; Penninckx, M. The use of tetrazolium salt XTT for the estimation of biological activity of activated sludge cultivated under steady-state and transient regimes. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, p.255-263, 2000.

BERRIDGE, M.V.; Tan, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n.2, p.474-482, 1993.

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

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

BRASIL. Resolução N.º 899 da ANVISA, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”: anexo.

**Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 02 de jun. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 13 de maio de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 597 / GM, de 08 de abril de 2004. Institui, em todo território nacional, os calendários de vacinação. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 de outubro de 2006.

BRICKS, L.F. Vacina BCG: via percutânea ou intradérmica? **Jornal de Pediatria**, v.80, n.2, p.93-98, 2004.

CESARI, I.M.; Rieber, M.; Imaeda, T. Localization and properties of enzymes involved with electron transport activity in Mycobacteria. **Journal of Bacteriology**, v.98, n.2, p.767-773, 1969.

DE LOGU, A.; Pellerano, M.L.; Sanna, A.; Pusceddu, M.C.; Uda, P.; Saddi, B. Comparison of the susceptibility listing of clinical isolates of *M. tuberculosis* is by NCCLS standards methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.244-250, 2003.

DE LOGU, A.; Uda, P., Pellerano, M.C.; Pusceddu, M.C.; Saddi, M.L.; Schivo, M.L. Comparison of Two Rapid Colorimetric Methods for Determining Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin, Isoniazid, and Streptomycin in Liquid Medium. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.20, p.33-39, 2001.

DENIZOT, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Dosifications to the terazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunological Methods**., v.89, p.271-277, 1986.

DIETRICH, J.; Lundberg, C.V.; Andersen, P. TB vaccine strategies - What is need to solve a complex problem? **Tuberculosis**, v. 86, p. 163-168, 2006.

DUCATI, R.G.; Ruffino-Netto, A.; Basso, L.A.; Santos, D.S. The resumption of consumption – A review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.7, p.697-714, 2006.

EUROPEAN Pharmacopeia. 4<sup>th</sup> ed., 2002. Chapter 5.3, p.463.

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

FROTHINGHAM, R.; Stout, J.E.; Hamilton, C.D. Current issues in global tuberculosis control. **International Journal of Infectious Diseases**, v.9, p.297-311, 2005.

GARN, H.; Krause, H.; Enzmann, V.; Dröbler, K. An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. **Journal of Immunological Methods**, v.168, p.253-256, 1994.

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

GHEORGHIU, M.; Lagranderie, M.; Balazuc, A.M. Stabilization of BCG Vaccines. **Developments in Biological Standardization**, v.87, p. 251 - 261, 1996.

GHEORGHIU, M., Lagrange, P.H.; Fillastre, C. The stability and immunogenicity of a dispersed-grown freeze-dried Pasteur BCG vaccine. **Journal of Biological Standardization**, v.16, p. 15 -26, 1988.

GIRARD, M.P.; Fruth, U.; Kieny, M.P. A review of vaccine research and development: Tuberculosis. **Vaccine**, v.23, p.5725-5731, 2005.

GOMEZ-FLORES, R.; Gupta, S.; Tamez-Guerra, R.; Mehta, R.T. Determination of MICs for *M. avium* - *M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. **Journal of Clinical Microbiology**, V.33, n.7, p.1842-1846, 1995.

GRIFFIN, J.F.T.; Mackintosh, C.G.; Slobbe, L.; Thomson, A.J.; Buchan, G.S. Vaccine protocols to optimize the protective efficacy of BCG. **Tubercle and Lung Disease**, v.79, n.3, p.135-143, 1998.

HANSEN, M.B.; Nielsen, S.E.; Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v.119, n.2, p.203-210, 1989.

HATZINGER, P.B.; Palmer, P.; Smith, R.L.; Peñarrieta, C.T.; Yoshinari, T. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.52, p.47-58, 2003.

HAWGOOD, B.J. Doctor Albert Calmette 1863 – 1933: founder of antivenomous serotherapy and antituberculous BCG vaccination. **Toxicon**, v.37, p.1241-1258, 1999.

HAWSER, S.P.; Norris, H.; Jessup, C.J.; Ghannoum, M.A. Comparison of a 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(Phenyl-amino)Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydroxide (XTT) Colorimetric Method with the Standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards Method of Testing Clinical Yeast Isolates for Susceptibility to Antifungal Agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p.1450-1452, 1998.

HONRAET, K.; Goetghebeur, E.; Nelis, H.T. Comparison of three Candida biomass in suspension and CDC reactor grown biofilm. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p.287-295, 2005.

HUSSEY, G.; Hawkridge, T.; Hanekon, W. Childhood tuberculosis: old and new vaccines. **Paediatric Respiratory Reviews**, v.8, p.148-154, 2007.

INSTITUTO Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Método confirmatório para avaliação de atividade micobactericida de desinfetantes. Rev. 07. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2008. Seção 4.3. 15 p. (65.3210.004).



INSTITUTO Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica em Imunobiológicos. Rev.10. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2007. Seção 10. 23p. (65.3220.005).

INSTITUTO Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Ensaio de contagem de unidades viáveis de BCG e termoestabilidade da vacina BCG. Rev. 09. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2005. Seção 10. 33p. (65.3210.013).

INSTITUTO Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Ensaio de Identidade para Vacina BCG. Rev. 04. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2004. Seção 10. 07 p. (65.3210.018).

INSTITUTO Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, Revisão 01 – março, 2003.

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

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

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

KAWAMURA, I.; Yang, J.; Takaesu, Y.; Fujita, M.; Nomoto, K.; Mitsuyama, M. Antigen provoking gamma interferon production in response to *Mycobacterim bovis* BCG and functional difference in T-cell responses to this antigen between viable and killed BCG-immunized mice. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 4396-4408, 1994.

KUHN, D.M.; Balkis, M.; Chandra, J.; Mukerjee, P.K.; Ghannoum, M.A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.1, p.506-508, 2003.

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

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

MA. J.; Nicholl, M. W. A simple quantitative assay for the killing of in vitro culture cells by *Ehrlichia canis* infection. **Journal of Microbiological Methods**, v.26, n.1-2, p.205-210, 1996.

McCLUSKEY, C.; Quinn, J.P.; McGrath. An Evolution of Three New-Generation Tetrazolium Salts for the Measurement of respiratory Activity in Activated Sludge Microorganisms. **Microbial Ecology**, v.49, p.379-387, 2005.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Nota Técnica n. 66/CGPNI/DEVEP/SVS/MS, de junho de 2006. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 15 de outubro de 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Tuberculose. In: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 732 – 756.

MOORE, D.S. A estatística básica e a sua prática. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005. 658p.

MORIARTY, F.; Elborn, S.; Tunney, M. Development of a rapid colorimetric time-kill assay for determining the in vitro activity of ceftazidime and tobramycin in combination against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**, v.61, p. 171-179, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MSHANA, R.N.; Tadesse, G.; Abate, G.; Miörner, H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapide detection of rifampin – resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.1214-1219, 1998.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for dried BCG vaccine. **Technical Report Series**. n. 329, 1966.

\_\_\_\_\_. In vitro assays of BCG products. **WHO/TB/Technical Guide/9**, 1977.

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

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

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

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2007. Geneva, World Health Organization. **WHO/HTM/TB/2007.376**, 2007a.

\_\_\_\_\_. Révision des lignes directrices relatives à la vaccination par le BCG des nourissons exposés au risque d'infection par le VIH. **Releve Epidemiologique Hebdomadaire**, v.25, n.21, p.193-196, 2007b.

ORME, I.M. Induction of Nonspecific Acquired Resistance and Delayed-Type Hypersensitivity, but Not Specific Acquired Resistance, in Mice Inoculated with Killed Mycobacterial Vaccines. **Infection and Immunity**, v.56, p. 3310-3312, 1988.

PAULL, K.D.; Shoemaker, R.H.; Boyd, M.R.; Parsons, J.L.; Risbood, P.A.; Barbera, W.A.; Sharma, M.N.; Baker, D.C.; Hand, E.; Scudiero, D.A.; Monks, A.; Alley, M.C.; Grote, M. The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent that is bioreducible to a

water-soluble formazan. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 25, n.3, p. 911-914, 1988.

PECK, R. A one-plate assay for macrophage bactericidal activity. **Journal of Immunological Methods**, v.82, p.131-140, 1985.

PRIOLI, R.P.; Tanna, A.; Brown, I.N. Rapid methods for counting mycobacteria – comparison of methods for extraction of mycobacterial adenosine triphosphate (ATP) determination by firefly luciferase assay. **Tubercle**, v.66, p.99-108, 1985.

ROEHM, N.W.; Rodgers, G.H.; Hatfield, S.M.; Glasebrook, A.L. Na improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of Immunological Methods**, v.142, p.257-265, 1991.

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

SANDE, W.W.J. van de; Luijendijk, A.; Ahmed, A.O.A.; Bakker-Woudenberg, I.A.J.M.; Belkum, A. Testing of the in vitro susceptibility of *Madurella mycetomatis* ti six Antifungal Agents by Using the Sensititre System in Comparison with a Viability-Based 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphenyl)-5-[(Phenylamino)Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydorxide )XTT) Assay and a Modified NCCLS Method. **Antimicrobioal Agents and Chemotheraty**, v.49, n.4, p. 1364-1368, 2005.

SCUDIERO, D.A.; Shoemaker, R.H.; Paull, K.D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T.H.; Currens, M.J.; Seniff, D.; Boyd, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in cultura using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, v.48, p.4827-4833, 1988.

SEKHUIS, V.M.; Freudenstein, H.; Sirks, F.L. Report on results of a collaborative assay of BCG vaccines organized by the International Association of Biological Standardization. **Journal of Biological Standardization**, v.5, p.85-109, 1977.

SFSTP, Comission. Guide de Validation des Méthodes de Dosage Biologique. **STP Pharma Pratiques**, v.12, n.6, p.01-20, 2002.

SLADOWSK, D.; Steer. S.J.; Clothier, R.H.; Balls, M. An improved MTT assay. **Journal of Immunological Methods**, v.157, p.203-207, 1993.

SLATER, T.F. Reduced diphosphopyridine nucleotetrazolium reductase. **Nature**, v.183, p. 1679-1680, 1959.

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

STEVENS, M.G.; Olsen, S.C. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. **Journal of Immunological Methods**, v.157, p. 225-231, 1993.

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

TABOR, P.S.; Neihof, R.A. Improved method for determination of respiring individual microorganisms in natural waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.6, p.1249-1255, 1982.

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

THOM, S.M.; Horobin, R.W.; Seidler, E.; Barer, M.R. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, n.4, p.433-443, 1993.

WILLIAMS, C.; Espinosa, O.A.; Montenegro, H.; Cubilha, L.; Capson, T.L.; Ortega-Barría, E.; Romero, L.I. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for Leishmania. **Journal of Microbiological Methods**, v.55, p. 813-816, 2003.

## ANEXO

### 1. CALDO MIDDLEBROOK 7H9 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2008)

- Meio base:

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

- Solução de enriquecimento:

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



## 2. MEIO DE LOWENSTEIN-JENSEN (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2005)

- Meio base:

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

- Meio completo:

Meio base .....	600 mL
Glicerol 87%.....	12 mL
Suspensão de ovos frescos de galinhas da raça Leghron.....	1000 mL

## 3. MEIO LÍQUIDO SAUTON (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2005)

Sulfato de magnésio heptahidratado.....	0,5 g
Ácido cítrico monohidratado.....	2,2 g
Fosfato dipotássico.....	0,5 g
L-asparagina.....	4,5 g
Citrato férrico de amônio.....	0,05 g
Glicerol 87%.....	60 mL
Água destilada.....	1000,0 mL

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

Cloreto de sódio .....	8,0 g
Cloreto de potássio.....	0,2 g
Fosfato potássio monobásico anidro.....	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico hidratado.....	1,13g
Água purificada.....	1000,0 mL