

George Afonso Vitor Caldeira

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS VIÁVEIS E DO ENSAIO DE ESTABILIDADE
TÉRMICA NO CONTROLE DE VACINAS B19 CONTRA BRUCELOSE
COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Andrey Pereira Lage

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2008**


C146a Caldeira, George Afonso Vitor, 1967-
Avaliação de bactérias viáveis e do ensaio de estabilidade térmica no controle
vacinas B19 contra brucelose comercializadas no Brasil / George Afonso Vitor Caldeira.
– 2008.
36 p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Brucelose em bovino – Vacina – Teses.
3. Vacinas veterinárias – Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692 6

Dissertação defendida e aprovada em 18 de março de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Andrey Pereira Lage
Orientador



Dr. Fernando Padilla Poester



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

À Simone e ao Davi, incentivo para novas conquistas.
Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Andrey Pereira Lage, pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Professor Élvio Carlos Moreira, pela compreensão e apoio incondicional.

À Professora Ângela Lana pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos professores Marcos B. Heinemann e Rômulo Cerqueira Leite pela atenção.

Aos amigos e colegas da Pós-graduação, Priscila Barrios, Sílvia Minharro, Líl JF, Karina Miranda, Daniela Bernardes, Rogério, Antônio, Alessandro, Alan, Rodrigo.

Ao colegiado dos cursos de Pós Graduação da Escola de Veterinária, pela atenção e colaboração.

Aos funcionários da Biblioteca da Escola de Veterinária da UFMG, Márcio Prado e Rosilene Almeida.

Ao amigo Paulo Martins Soares Filho pelo apoio e amizade.

Ao amigo Pedro Moacir Pinto Coelho Mota pelo incentivo e amizade.

Ao Dr. Fernando Poester pelo apoio.

Ao Coordenador do LANAGRO/MG, Dr. Ricardo Aurélio Pinto Nascimento pelo apoio.

Ao Dr. Tomaz de Aquino Porfírio pela colaboração e coleguismo.

À Neuza Rocha, Lílian Faustino e Jairo Silva do Setor de Brucelose do LANAGRO/MG pela colaboração.

Aos amigos do LANAGRO/MG Claudia Serra, Ronnie Assis, Marcelo Camargos, Anapolino Macedo e Ângela Ferreira.

Aos Colegas do Setor de Preparo de Meios de Cultura do LANAGRO/MG.

Ao Dr. José Renaldi Feitosa Brito e Dra. Maria Aparecida Paiva Brito, pelo exemplo profissional e pelo apoio nos momentos difíceis.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar...
As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	10
3 LITERATURA CONSULTADA	11
3.1. Brucelose bovina	11
3.2. Brucelose no Brasil	13
3.3. Controle da brucelose bovina	13
3.4. Vacinação contra brucelose	13
3.5. Vacinas contra a brucelose bovina	14
3.6. Vacina B19	14
3.7. Fatores relacionados à imunidade induzida por vacina B19	15
3.8. Fatores relacionados à estabilidade da vacina B19	16
3.9. Controle de qualidade das vacinas B19.....	16
3.10. Testes de estabilidade térmica	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Local do Experimento.....	18
4.2 Amostragem	18
4.3 Análise das vacinas para aprovação oficial	18
4.4 Contagem de bactérias viáveis nas vacinas ao vencimento	19
4.5 Precauções Analíticas.....	19
4.6 Análises estatísticas.....	20
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÕES	27
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 - Distribuição das partidas de vacinas comerciais B19 aprovadas pelo MAPA, com vencimento entre março e julho de 2007, avaliadas neste estudo.....	18
Tabela 2 - Partidas de vacinas B19 aprovadas pelo MAPA e analisadas ao vencimento para a determinação de bactérias viáveis.	21
Tabela 3 - Concentração de bactérias viáveis (UFC x 10 ¹⁰ / dose) em vacinas B19 comercializadas no Brasil à aprovação, ao vencimento e no ensaio de estabilidade térmica.	22
Tabela 4 - Simulação de três pontos de corte para o teste de estabilidade térmica em partidas de vacina B19 comercializadas no Brasil em relação à aprovação da partida ao vencimento, segundo as recomendações do MAPA (Brasil, 2004b).	23
Tabela 5 - Análise dos três pontos de corte simulados para o ensaio de estabilidade térmica em relação à aprovação das partidas ao vencimento, segundo as recomendações do MAPA (Brasil, 2004b).....	23

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Contagem do número de bactérias viáveis (UFC – Unidades formadoras de colônias)	33
--	----

RESUMO

Foram analisadas à aprovação, ao ensaio de estabilidade térmica (EET) e ao vencimento as concentrações de bactérias viáveis (CBV) de 67 partidas de vacinas comerciais B19 aprovadas pelo MAPA, com vencimento no período de março/2007 a julho/2007. Destas, 74,6 % apresentaram $CBV \geq 4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose ao final do prazo de validade. Houve variação entre o número de partidas com CBV ao vencimento $\geq 4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose em função do prazo de validade, observando-se 93,1%, 60,0% e 66,7% das partidas com prazo de validade de 12, 18 e 24 meses, respectivamente, com CBV igual ou superior ao recomendado. As médias de CBV/dose das vacinas nas análises à aprovação e ao vencimento foram significativamente diferentes nas partidas de vacinas com prazo de validade de 18 meses ($P < 0,01$). Somente nas partidas com prazo de validade de 12 meses houve diferença significativa entre as médias das CBV/dose observadas pelo ensaio de estabilidade térmica (EET) e pela análise da vacina ao vencimento ($P < 0,01$). Para a comparação das CBV das vacinas ao EET e as CBV ao vencimento foram simulados três diferentes pontos de corte: $2,0 \times 10^{10}$ UFC/dose (PC1), $3,0 \times 10^{10}$ UFC/dose (PC2) e $4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose (PC3). Para as vacinas com prazo de validade de 12 meses somente o PC1 e para as com 18 meses somente o PC3 não discordaram dos resultados das vacinas aprovadas ao vencimento; porém demonstraram baixa concordância, o que foi confirmado pelos baixos valores de sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo.

Palavras chave: Brucelose bovina, vacina B19, controle de qualidade, contagem de bactérias viáveis, ensaio de estabilidade térmica

ABSTRACT

Sixty-seven batches of *Brucella abortus* S19 commercial vaccines, approved for release by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) and with expiration dates between March and July 2007, had their viable bacterial counts (VBC) determined at approval, at the expiration month and by the accelerate stability test (AET). Of the tested batches, 74.6% showed $VBC \geq 4.0 \times 10^{10}$ CFU/dose at the expiration date. There were differences in batches with $VBC \geq 4.0 \times 10^{10}$ CFU/dose according to the expiration period: 93.1%, 60.0% and 66.7% of vaccines with expiration periods of 12, 18 and 24 months, respectively, showed VBC values equal or higher than recommended. Mean VBC/dose at approval and at expiration were significantly different for vaccines with 18-month expiration period ($P < 0.01$). Only batches with 12-month expiration period showed significant differences between mean AET and mean VBC/dose at expiration ($P < 0.01$). For comparing AET to the number of batches approved at expiration, three cut-offs were simulated: 2.0×10^{10} CFU/dose (PC1), 3.0×10^{10} CFU/dose (PC2) and 4.0×10^{10} CFU/dose (PC3). To 12-month and 18-month expiration period vaccines, only PC1 and PC3, respectively, agreed with the number of batches approved at expiration. However, both cut-offs showed low agreement values, confirmed by low sensitivity, specificity and negative predictive values.

Key words: Bovine brucellosis, S19 strain vaccine, quality control, viable bacterias count, accelerated stability test.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta destaque mundial na produção de carnes e leite. O agronegócio tem sido o pilar das exportações brasileiras, sendo a carne bovina um dos principais produtos de exportação. Uma das maiores exigências dos mercados importadores é a qualidade sanitária dos produtos.

Assim como o programa de erradicação da febre aftosa, o programa de controle e erradicação da brucelose e tuberculose apresenta um papel de extrema importância, não somente para reduzir perdas econômicas no setor primário, mas também para eliminar barreiras ao comércio internacional de produtos brasileiros. Além do aspecto econômico, o controle da brucelose e tuberculose apresenta papel decisivo na prevenção dessas enfermidades na espécie humana.

Apesar de ações e esforços para o controle da brucelose e tuberculose em alguns estados brasileiros e da iniciativa de algumas cooperativas para o saneamento de rebanhos, não existia uma padronização de ações claramente definidas e com abordagem populacional para o controle dessas doenças. Foi então que, com objetivo de reduzir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) (Brasil, 2004 a).

Entre as medidas com eficácia comprovada na redução da prevalência e da incidência da brucelose, a custo reduzido, destaca-se a vacinação de bezerras contra a brucelose, sendo esta uma prioridade do PNCEBT. O programa preconiza a vacinação de bezerras com idade entre três e oito meses, com a vacina B19 (PROGRAMA..., 2006).

A concentração de bactérias viáveis na vacina B19 presente no momento da aplicação tem uma relação direta com a

imunogenicidade e consequente proteção conferida pela mesma. Desta forma, a vacina deve manter a concentração mínima de bactérias viáveis determinada por lei durante o prazo de validade estabelecido pelo laboratório fabricante.

As vacinas B19 comercializadas no Brasil devem ser aprovadas pelo controle de qualidade oficial do MAPA antes de serem comercializadas. A Instrução Normativa 15 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do MAPA, que regulamenta as normas para a aprovação de vacinas B19, inclui vários itens de avaliação, entre os quais pureza, dissociação e contagem de bactérias viáveis para aprovação, ao ensaio de estabilidade térmica e ao vencimento (Brasil, 2004 b). O MAPA não analisa rotineiramente a concentração de bactérias viáveis em vacinas B19 comerciais ao final do prazo de validade e, dentre os testes preconizados pelo MAPA para todas as partidas de vacinas B19, o ensaio de estabilidade térmica é realizado com o objetivo de estimar o número de bactérias viáveis ao final do prazo de validade. Porém, este teste necessita de validação e não tem poder oficial de reprovação.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

- I. Avaliar, sob os parâmetros da legislação vigente, a concentração de bactérias viáveis ao final do prazo de validade de vacinas B19 contra brucelose bovina comercializadas no Brasil;
- II. Avaliar o ensaio de estabilidade térmica utilizado pelo MAPA como teste capaz de estimar a concentração de bactérias viáveis ao vencimento em vacinas B19 contra brucelose bovina comercializadas no Brasil.

3. LITERATURA CONSULTADA

3.1 Brucelose Bovina

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella*. Acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos (PROGRAMA..., 2006). É uma das principais zoonoses existentes e está distribuída mundialmente, ocorrendo no homem e em diversas espécies animais, principalmente em países em desenvolvimento (THE DEVELOPMENT..., 1997)

O principal agente da brucelose bovina é a *Brucella abortus*. Entretanto, *B. melitensis* e raramente *B. suis* podem infectar bovinos. Estas infecções são particularmente perigosas para o homem devido à alta virulência da maioria das amostras de *B. melitensis* e *B. suis* e pela grande quantidade de bactérias que são eliminadas pelos animais (Corbel, 2006).

Embora a definição clássica das espécies de *Brucella* sp descreva estas bactérias como parasitas intracelulares facultativos, a melhor definição para sua natureza seria parasitas intracelulares facultativamente extracelulares (Gorvel e Moreno, 2002). Isto significa que *Brucella* spp têm como nicho preferencial o ambiente intracelular de seus hospedeiros. Este ambiente sustenta uma extensiva multiplicação, permitindo o aumento do número de bactérias e posterior transmissão para novas células hospedeiras (Gorvel e Moreno, 2002).

Infecções por *Brucella* spp ocorrem geralmente pela inalação ou ingestão dos microrganismos através das cavidades nasal, oral e faríngea (Ko e Splitter, 2003). *Brucella* sp tem a capacidade de invadir as mucosas conjuntiva, oral, faríngea, intestinal, respiratória, vaginal e prepucial (Enright, 1990).

Amostras virulentas de *B. abortus* podem invadir, evitar a fusão lisossoma/fagossoma e se multiplicar em células fagocitárias e não fagocitárias (Detilleux et al., 1990; Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Pizarro-Cerdá et al., 1998b; Celli et al., 2003; Celli et al.,

2005). A maioria das bactérias fagocitadas por macrófagos é rapidamente destruída (Celli et al., 2003). Porém, parte das bactérias sobrevive à destruição inicial e se multiplica (Celli e Gorvel, 2004).

Após a penetração nas mucosas, as bactérias são transportadas livres ou dentro de células fagocitárias para os linfonodos regionais. A multiplicação e propagação de *Brucella* sp nos linfonodos, baço, fígado, medula óssea, glândula mamária e órgãos sexuais ocorre via macrófagos (Ko e Splitter, 2003). Na vaca gestante, *B. abortus* localiza-se inicialmente nos linfonodos e posteriormente infecta o útero gestante (Anderson et al., 1986; Meador e Deyoe, 1989).

Em bovinos, a doença apresenta clinicamente um ou mais dos seguintes sinais: aborto, retenção de placenta, orquite, epididimite e artrite. Há excreção de microrganismos na descarga uterina do pós-parto ou aborto e no leite. A doença é geralmente assintomática em fêmeas não gestantes. Como consequência da infecção por *B. abortus*, fêmeas gestantes desenvolvem uma placentite que geralmente resulta em aborto entre o quinto e nono mês de gestação. Gestações subseqüentes geralmente são levadas a termo, porém mesmo na ausência de aborto ocorre eliminação do microrganismo por descargas vaginais, placenta e leite (Thoen et al., 1993; Nielsen e Ewalt, 2004). O sintoma clínico predominante em fêmeas prenhes é o aborto ou o nascimento de prematuros ou a termo, mortos ou débeis. (Acha e Szyfres, 1986).

Aborto e seus produtos, incluindo o feto, placenta e secreções uterinas que são eliminadas por vários dias após a expulsão do feto representam a principal fonte de infecção para outros animais do rebanho (Crawford et al., 1990; Silva et al., 2005). *B. abortus* pode ser eliminada pelo leite de forma contínua ou intermitente durante a lactação, podendo causar mastite (Ray, 1979). Touros infectados eliminam *B. abortus* pelo sêmen, mas geralmente não transmitem a infecção pela monta natural. A utilização da inseminação artificial com

sêmen contendo *B. abortus* virulentas torna o risco de contaminação próximo de 100% (Nicoletti, 1986; Radostits et al., 2000).

Em bovinos, a brucelose causa perdas diretas principalmente em função da ocorrência de abortos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção de leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas. As propriedades onde a doença está presente têm o valor comercial de seus animais depreciado. Os países ou regiões onde a doença é endêmica encontram-se em posição desvantajosa na disputa de novos mercados, além de sofrerem restrições comerciais impostas por regulamentos veterinários internacionais, o que resulta em grandes perdas econômicas (Godfroid et al., 2005; Brasil, 2006).

Estima-se que ocorra uma redução de 20 a 25% na produção de leite em função da interrupção da lactação por aborto ou período de serviço prolongado e perdas de 15% na produção de carne e bezerros. Em cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril (Acha e Szyfres, 1986; Brasil, 2006).

O estabelecimento da infecção por *Brucella* depende da virulência, do número de bactérias infectantes e da resistência do hospedeiro, determinado por mecanismos imunes inato e adquirido (Thoen et al., 1993).

A imunidade inata é composta por uma resposta imune inespecífica que ocorre nos estágios iniciais da infecção, com o objetivo de reduzir o número inicial de microrganismos infectantes, favorecendo um ambiente para o estabelecimento da resposta adquirida (Ko e Splitter, 2003). A resposta imune inata a bactérias intracelulares consiste principalmente da ação de fagócitos e células NK ("Natural Killer") (Abbas e Lichtman, 2003).

A resposta imune adquirida ou adaptativa fornece uma função de memória contra infecção por *B. abortus* e apresenta papel chave na vacinação (Ko e Splitter, 2003). A imunidade contra brucelose é

principalmente mediada por células, uma vez que este é um patógeno intracelular facultativo que sobrevive em macrófagos (Baldwin, 2002). A indução da resposta imune mediada por células Th1 com produção de IFN- γ e geração de células T citotóxicas ou citolíticas (CTL's) é o ponto central na imunidade contra *B. abortus* (Oliveira et al., 2002).

A resposta por anticorpos contra *B. abortus* em bovinos inclui a produção de IgM, IgG₁, IgG₂ e IgA (Nielsen, 2002). A opsonização, associada ao aumento da destruição intracelular de *Brucella* sp, é considerada o principal papel protetor mediado por anticorpos em infecções por *Brucella* sp (Ko e Splitter, 2003). Porém, anticorpos são pouco efetivos na proteção contra amostras virulentas de *B. abortus* (Baldwin e Parent, 2002). A molécula de lipopolissacarídeo (LPS) de *B. abortus* é o principal indutor da resposta imune por anticorpos, sendo a cadeia "O" do LPS o antígeno imunodominante (Schurig et al., 2002).

Colônias de *B. abortus* apresentam morfologia colonial lisa ao isolamento, mas podem apresentar morfologia colonial rugosa, mucóide ou intermediária em cultivo *in vitro* (Huddleson et al., 1952; Ray, 1979). Esta característica está intimamente ligada à composição do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de *B. abortus*. Colônias com morfologia lisa apresentam a molécula de LPS completo, a "Cadeia O", enquanto bactérias de colônias rugosas não apresentam esta cadeia ou ela é muito curta (Schurig et al., 2002). Colônias lisas podem sofrer dissociação e originar colônias rugosas, mucóides ou intermediárias em cultivo *in vitro* (Huddleson et al., 1952).

A maioria dos testes diagnósticos para brucelose bovina baseia-se na detecção de anticorpos anti cadeia O (Schurig et al., 2002). O Regulamento Técnico do PNCEBT prevê a utilização do teste sorológico do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como teste de rotina e o uso dos testes do 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento como testes confirmatórios. O Teste do Anel em Leite ("TAL") também

poderá ser utilizado para monitoramento de propriedades certificados como livres de brucelose (PROGRAMA..., 2006).

3.2 Brucelose no Brasil

Brucelose bovina causada por *Brucella abortus* é a infecção mais prevalente no Brasil, seguida por *B. suis* em suínos. Além dessas espécies já foram detectadas *B. ovis* e *B. canis* infectando animais domésticos. Até o presente momento, *B. neotomae* e *B. melitensis* não foram isoladas no Brasil (Poester et al, 2002; Brasil, 2006).

Um estudo colaborativo entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP demonstrou elevadas prevalências de brucelose bovina e bubalina na maioria dos estados brasileiros, especialmente nos estados tradicionais produtores de carne da Região Centro-Oeste do país. Nesta região, o estado de Mato Grosso apresentou prevalência de focos de brucelose superior a 40%, com média superior a 10% de fêmeas soropositivas. Prevalências altas também foram encontradas para a maioria dos estados avaliados no estudo. Entretanto, outros estados apresentaram redução na prevalência de focos e de fêmeas soropositivas para brucelose, sendo que Minas Gerais, Bahia e Rio Grande do Sul apresentam prevalências de animais soropositivos próximos a 1%. O Estado de Santa Catarina apresentou índices de prevalência tanto de focos como de animais infectados muito baixos, o que permitiu a suspensão da vacinação com vacina B19 e o início de um programa de erradicação (Ferreira Neto et al., 2006).

3.3 Controle da brucelose bovina

Os programas de controle e erradicação da brucelose em bovinos tem como objetivo reduzir as perdas econômicas e proteger a saúde pública contra a doença (Radostits et al., 2000; Brasil, 2006). O controle da brucelose bovina depende de um planejamento que inclui dois principais fatores no manejo dos rebanhos acometidos: o aumento da resistência da

população bovina à infecção e a prevenção da exposição de animais susceptíveis à *Brucella abortus* (Lage et al., 2005).

O aumento da resistência contra a brucelose pode ser alcançado pelo emprego sistemático da vacinação de fêmeas jovens (Lage et al., 2005) e a redução da exposição é alcançada principalmente pela detecção e remoção de vacas infectadas antes que ocorra o parto, uma vez que o aborto e seus produtos representam a principal fonte de infecção para outros animais do rebanho (Crawford et al., 1990; Silva et al., 2005).

As estratégias de controle da doença incluem a vacinação, testes e quarentena na introdução de animais em um rebanho, identificação e sacrifício de animais infectados (incluindo a destruição de todo o rebanho), educação sanitária, manejo do rebanho e medidas de higiene (Crawford et al., 1990; Lage et al., 2005; Olsen e Stoffregen, 2005).

No Brasil, o MAPA instituiu em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) com o objetivo de reduzir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (Brasil, 2004 a).

As propostas técnicas do PNCEBT são: Vacinação obrigatória de fêmeas entre três e oito meses com vacina B19; certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose; certificação de propriedades monitoradas para brucelose e tuberculose; controle do trânsito de animais destinados à reprodução e normas sanitárias para participação de feiras, leilões e exposições; habilitação e capacitação de médicos veterinários (PROGRAMA..., 2006).

3.4 Vacinação contra brucelose

O principal meio de reduzir a taxa de infecção por brucelose em zonas de prevalência elevada é a imunização em massa (COMITÉ..., 1986). Sendo assim, a vacinação constitui-se na mais importante medida para o controle da brucelose nos

bovinos porque, apesar de não eliminar a brucelose em um rebanho infectado, promove uma diminuição da prevalência e da incidência da doença, propiciando um avanço do programa de controle em direção à erradicação da doença (Lage et al., 2005; Olsen e Stoffregen, 2005).

A vacinação de animais geralmente resulta na eliminação do principal quadro clínico da brucelose, que é o aborto, e na redução do número de microrganismos excretados por animais que se tornaram infectados. Além disso, os proprietários geralmente aceitam bem a vacinação como mecanismo de controle por já estarem familiarizados com este método de controle de doenças (Corbel, 2006).

Embora a vacinação seja a medida de controle mais econômica, seu uso isoladamente com as vacinas disponíveis na atualidade não é suficiente para erradicar a brucelose de qualquer espécie hospedeira. Nenhuma vacina confere 100% de proteção contra a brucelose, seja em condições experimentais, seja a campo (Olsen e Stoffregen, 2005).

3.5 Vacinas contra a brucelose bovina

As vacinas contra brucelose bovina são classificadas como vivas ou inativadas, sendo que as vacinas vivas oferecem imunidade mais sólida e duradoura (Nicoletti, 1990; Schurig et al., 2002).

As vacinas mais utilizadas no controle da brucelose bovina tem sido B19, RB51 e 45/20 (Olsen e Stoffregen, 2005).

A vacina 45/20, é elaborada com uma variante rugosa inativada de *B.abortus*, originada da amostra lisa de *B.abortus* 45/0, em adjuvante oleoso. Teve seu uso descontinuado em função da grande variabilidade de resultados de proteção, associado a severas reações no local de aplicação nos animais (Schurig et al., 2002).

A vacina RB51 é elaborada com uma amostra rugosa, mutante de *B. abortus*, com capacidade de promover uma resposta imune celular sem induzir a produção de

anticorpos detectáveis nos testes de diagnóstico (Schurig et al. 2002). A vacina RB51 teve seu uso aprovado nos Estados Unidos da América (EUA) em 1996, em função da necessidade de uma vacina que não promovesse a produção de anticorpos capazes de interferir nos testes sorológicos (Ragan, 2002).

No Brasil, o Regulamento Técnico do PNCEBT preconiza como obrigatória a vacinação de fêmeas bovinas e bubalinas com idade entre três e oito meses com vacina B19 e prevê que poderá ser realizada a vacinação de fêmeas com idade superior a oito meses com imunógenos que não interfiram nos testes diagnósticos, como a vacina RB51 (Brasil, 2004 a; Brasil, 2007).

3.6 Vacina B19

A vacina com a amostra B19 de *B. abortus* teve origem com o isolamento de uma amostra virulenta de *B. abortus* em 1923, pelo pesquisador norte-americano John Buck. A cultura ficou esquecida à temperatura ambiente por mais de um ano e, quando testada novamente, apresentou-se atenuada (Graves, 1943).

As principais características vacinais da B19 são a patogenicidade baixa e estável e a imunogenicidade relativamente alta. (Manthei, 1959). A atenuação e as características culturais e biológicas são estáveis e não se alteraram após várias passagens por cobaias ou passagens intravenosas em vacas gestantes (Mingle, 1941; Poester, 2006). A vacina B19 é a referência para avaliação de outras vacinas contra brucelose bovina e induz boa imunidade contra desafios moderados com organismos virulentos (Nielsen e Ewalt, 2004).

A B19 foi utilizada como vacina em experimentos na década de 1930, foi utilizada para produzir uma vacina padrão em 1939 e em 1941 foi introduzida no programa de erradicação da brucelose nos Estados Unidos da América (Nicoletti, 1990). Com base em estudos considera-se que uma vacina de qualidade contra brucelose pode assegurar uma proteção de 65 % a 75 % de animais vacinados, quando

utilizada uma dose de $5,0 \times 10^{10}$ de *Brucella abortus* viáveis aplicados subcutaneamente. Embora 25% a 35% dos animais vacinados possam vir a se infectar, muitos não irão abortar (Manthei, 1959). Vários estudos demonstraram que ocorre uma redução significativa da prevalência e incidência da brucelose em países e regiões que utilizaram sistematicamente a vacina B19 (Love et al., 1966; Nicoletti, 1990; Cheville, 1993; Ferreira Neto et al., 2006).

A principal desvantagem da utilização da vacina B19 está relacionada à ocorrência de títulos persistentes de anticorpos após vacinação, os quais interferem no diagnóstico sorológico da doença (Nicoletti, 1990; Nielsen, 2002). Pelo fato do tempo da soroconversão pós-vacinal ao estado soronegativo ser diretamente proporcional à idade (Nicoletti, 1990), os programas de controle da brucelose determinam como animais alvo para vacinação com amostra B19, animais pré-púberes, reduzindo o problema de detecção sorológica em animais adultos (Olsen e Stoffregen, 2005).

Outras desvantagens do uso da vacina B19 são a possibilidade desta amostra infectar o homem, causar aborto se utilizada em vacas gestantes (Cheville, 1993) e causar artrites e outras lesões em touros, como artrites (Lambert et al., 1964; Thoen et al., 1993).

3.7 Fatores relacionados à imunidade induzida por vacina B19

A capacidade imunogênica da vacina B19 depende da quantidade de bactérias viáveis no momento da aplicação da mesma. Fêmeas bovinas recebem somente uma dose de vacina B19 durante a vida e esta dose deverá conter uma concentração mínima de bactérias viáveis para a indução de imunidade protetora (García-Carrillo, 1982).

Estudos demonstraram que uma única dose da vacina B19 conferiu imunidade adequada por no mínimo 5 gestações e que na vacinação com doses de $5,0$ a $7,0 \times 10^{10}$ bactérias viáveis a resistência induzida em bovinos com a vacina B19 não reduziu com o tempo (Manthei et al., 1951; McDiarmid, 1957).

A dose recomendada de B19 para se conferir proteção é de $5,0 \times 10^{10}$ a $1,2 \times 10^{11}$ bactérias viáveis (COMITÉ..., 1986). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda uma única dose de $5,0$ a $8,0 \times 10^{10}$ bactérias viáveis (Nielsen e Ewalt, 2004). A Farmacopéia Britânica estabelece valores entre $4,0 \times 10^{10}$ e $1,2 \times 10^{11}$ bactérias viáveis por dose (British Pharmacopoeia, 1998). O MAPA recomenda doses de entre $6,0 \times 10^{10}$ e $1,2 \times 10^{11}$ bactérias viáveis para a aprovação da vacina para comercialização e que a menor dose a ser utilizada deverá ser $4,0 \times 10^{10}$, que é a dose estabelecida para vacinas B19 ao vencimento (Brasil, 2004b). Todas estas recomendações são para aplicação em bezerras de três a oito meses de idade, por via subcutânea.

Apesar de alguns autores afirmarem que doses reduzidas de $9,0 \times 10^7$ a $4,5 \times 10^9$ bactérias viáveis conferem proteção em bezerras vacinadas entre três e seis meses (Davies et al., 1980), não existem relatos de imunidade prolongada quando utilizadas estas doses, nem uma avaliação efetiva dessas dosagens reduzidas como indutoras de proteção em bovinos adultos (Olsen e Stoffregen, 2005).

Também foram avaliadas doses reduzidas, para utilização em animais adultos, de $3,0 \times 10^8$ a $3,0 \times 10^9$ bactérias viáveis via subcutânea (Nicoletti, 1990). Entretanto, com estas doses reduzidas alguns animais podem apresentar títulos persistentes, abortar e eliminar o microrganismo no leite (Nielsen e Ewalt, 2004). Também são sugeridas doses reduzidas de $5,0 \times 10^9$ a $10,0 \times 10^9$ bactérias viáveis por via conjuntiva. Porém, uma pequena porcentagem de animais vacinados pode apresentar títulos persistentes (COMITÉ..., 1986).

As qualidades antigênicas da amostra B19 estão diretamente associadas ao grau de dissociação, sendo que não deve haver dissociação superior a 5% quando a amostra é utilizada como vacina (Alton et al., 1988; Nicoletti, 1990).

Além da concentração celular e dissociação, outros fatores podem influenciar a

imunidade induzida por vacinas contra brucelose. A eficácia da vacina a campo pode ser influenciada pelo estado nutricional dos animais, estresse ambiental e infecção concomitante com outros microrganismos. As taxas de infecção e de abortos estão diretamente relacionadas à dose de exposição às amostras virulentas de *B. abortus*, sendo que altas doses de exposição podem sobrepor à proteção induzida pela vacinação (Confer et al., 1985; Olsen e Stoffregen, 2005).

3.8 Fatores relacionados à estabilidade da vacina B19

Vários são os fatores relacionados à perda de estabilidade de vacinas B19 liofilizadas em condições de estocagem. Em um estudo com vacinas B19 liofilizadas armazenadas a 4°C, verificou-se que ocorre uma curva de aumento de umidade residual ao mesmo tempo em que ocorre uma curva de queda da viabilidade bacteriana até cerca de seis meses após a liofilização. Após este período ocorre então uma progressão muito lenta dos valores de umidade e contagem de bactérias viáveis até cerca de 360 dias (Valette et al., 1977). A preservação da viabilidade bacteriana nas vacinas com amostra B19 está diretamente relacionada à umidade residual, sendo o nível ótimo de umidade entre 1% e 3%. (Valette et al., 1977; Fawthrop, 1996).

Estudos demonstraram que a perda de viabilidade é maior quando a vacina é mantida à temperatura ambiente (25°C) ou à temperatura de 37°C em comparação à temperatura de 5°C (Verwey et al., 1950; Love et al., 1966). A OIE recomenda que após a fabricação, a vacina B19 deve ser mantida a 4°C e apresentar umidade residual de 1% a 2% (Nielsen e Ewalt, 2004).

Verwey et al. (1950) afirmaram que no processo de liofilização, composto de três fases (congelamento, sublimação e selagem dos frascos), o estágio de sublimação é o que parece ser mais crítico para a sobrevivência dos microrganismos. Durante o processo de liofilização, a porcentagem de perda de células viáveis pode variar de 10 a 96% (Verwey et al., 1950, García-Carrillo,

1982), sendo a média de redução em torno de 50% (García-Carrillo, 1981).

Outro fator de grande importância para a estabilidade da vacina a longo prazo é o vácuo. Vacinas em frascos sem vácuo adequado não devem ser utilizadas (Verwey et al., 1950). Estudos demonstraram que frascos que contem pouco vácuo podem apresentar uma perda de 50% ou mais de bactérias viáveis até um mês após a fabricação, mesmo quando mantidos à temperatura de 4°C (García-Carrillo, 1977; García-Carrillo, 1982).

No processo de liofilização deve ser utilizado um veículo de liofilização, ou meio estabilizador, que preserve ao máximo as características e a viabilidade da amostra B19 (Angus et al., 1977). Estudos com diferentes fórmulas de veículos de liofilização demonstraram taxas de sobrevivência à liofilização variando de 23% a 65% em função do veículo (García-Carrillo, 1981; García-Carrillo, 1982). Segundo García-Carrillo (1981), deveria ser empregada como fórmula base para o veículo de liofilização aquela recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pois esta fórmula é a que apresenta melhores resultados durante a liofilização e armazenamento em condições adequadas (García-Carrillo, 1981). Esta afirmação está de acordo com os resultados de um trabalho no qual cinco meios estabilizadores foram avaliados e o meio OMS foi superior aos quatro outros meios avaliados (Angus et al., 1977).

3.9 Controle de qualidade das vacinas B19

A OIE recomenda que as partidas de vacina B19 sejam testadas para pureza (ausência de microrganismos estranhos), viabilidade (bactérias vivas por dose) e dissociação. Lotes de sementes de B19 produzidos devem ser regularmente testados para virulência residual e imunogenicidade em camundongos (Nielsen e Ewalt, 2004).

No Brasil, o MAPA aprova somente o uso da vacina liofilizada contra *B. abortus* (Brasil, 2004b). A vacina é composta de uma fração liofilizada e de um diluente. Para a produção

da vacina deve ser utilizada uma semente de referência de *B. abortus* B19 reconhecida pelo MAPA, com eficácia comprovada para a produção de vacina (Brasil, 2004b).

As vacinas B19 comercializadas no Brasil devem ser aprovadas pelo controle de qualidade dos estabelecimentos fabricantes antes de serem enviadas ao MAPA. O controle de qualidade oficial das vacinas B19 tem como meta assegurar que os objetivos da vacinação sejam alcançados. A Instrução Normativa 15 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do MAPA que regulamenta as normas para a aprovação de vacinas B19 inclui vários itens, entre os quais pureza, pH, dissociação, umidade e contagem de microrganismos viáveis, pressão negativa, ensaio de estabilidade térmica e análise do diluente (Brasil, 2004 b). A vacina deve estar livre de contaminação e apresentar somente crescimento de *B. abortus*.

A vacina é considerada satisfatória para dissociação se não houver mais que 5% de colônias rugosas. A contagem do número de bactérias viáveis é feita quando a vacina é recebida para análise oficial e é considerada satisfatória se a contagem não for inferior a $6,0 \times 10^{10}$ UFC por dose ou superior a $1,2 \times 10^{11}$ UFC por dose na data de liberação da vacina. Ao final do prazo de validade, as vacinas devem apresentar contagem de bactérias viáveis $\geq 4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose (Brasil, 2004 b).

Apesar de ser exigida uma concentração mínima de bactérias viáveis em vacinas B19 ao final do prazo de validade (Brasil, 2004 b), a análise destas vacinas não é realizada rotineiramente no Brasil¹.

3.10 Testes de Estabilidade Térmica

O Ensaio de Estabilidade Térmica utilizado pelo Laboratório Nacional Agropecuário de

Minas Gerais - LANAGRO/MG, órgão do MAPA responsável pelo controle oficial das vacinas B19, é um ensaio de estabilidade térmica acelerado utilizado para estimar a quantidade de células viáveis em vacinas B19 no final do período de validade do produto. O desempenho insatisfatório neste teste, no entanto, não é critério de reprovação do produto. (Manual..., 200?; Brasil, 2004b).

No item *Testes de Estabilidade*, a Organização Mundial de Saúde Animal OIE, informa que um teste acelerado de estabilidade pode ser feito para determinar um prazo de validade provisório de novos produtos, pela incubação deste produto a 37°C por uma semana para cada ano de validade do produto. Porém estes testes devem ser confirmados por testes de potência em tempo real, em pelo menos três lotes do produto, ao vencimento e três a seis meses após o vencimento. Para produtos com microrganismos viáveis, testes devem ser feitos na liberação do produto e próximo à data de vencimento até que se consigam dados estatisticamente válidos para determinar o prazo de validade (Espeseth, 2004).

No Brasil, os prazos de validade das vacinas são determinados pelo fabricante dentro dos períodos determinados pela legislação do MAPA e devem ser comprovados por testes de estabilidade em tempo real².

Para que seja determinado o prazo de validade de um produto veterinário na União Européia, o fabricante deverá apresentar estudos de estabilidade feitos em tempo real, em intervalos de tempo regulares. Estes estudos deverão ser feitos até três meses após o período de validade determinado em três lotes produzidos de forma consecutiva, sendo que podem ser feitos lotes piloto se os mesmos forem

¹ Soares Filho, P.M. Comunicação pessoal, 2008. Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MG Setor de Brucelose – Av. Rômulo Joviano S/N – CEP 33600.000 – Pedro Leopoldo/MG.

² Pereira, M.S. Comunicação pessoal, 2008. Coordenação de Produtos Veterinários (CPV). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo A, CEP 70043.900 - Brasília/DF.

realizados em condições semelhantes à escala industrial (Fawthrop, 1996)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do Experimento

As análises das vacinas foram realizadas no Setor de Brucelose do Laboratório Nacional Agropecuário / Minas Gerais (LANAGRO/MG) do MAPA, em Pedro Leopoldo/MG.

4.2. Amostragem

Tabela 1 – Distribuição das partidas de vacinas comerciais B19 aprovadas pelo MAPA, com vencimento entre março e julho de 2007, avaliadas neste estudo.

	Laboratório					Total
	1	2	3	4	5	
Março	7	3	4	0	3	17
Abril	3	6	1	1	0	11
Mai	9	7	4	0	0	20
Junho	4	4	3	1	0	12
Julho	0	6	0	1	0	7
Total	23	26	12	3	3	67

Das 67 partidas de vacina estudadas, 29 possuíam prazo de validade de 12 meses, 35 possuíam prazo de validade de 18 meses e três possuíam prazo de validade de 24 meses.

Todas as partidas de vacinas estudadas foram testadas e aprovadas para uso pelo LANAGRO/MG, segundo os critérios da Instrução Normativa 15 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do MAPA (Brasil, 2004 b).

Na primeira fase, quando as vacinas foram submetidas à análise oficial (Brasil, 2004b), foram coletados na indústria 10 dez frascos de cada partida da vacina por um Fiscal Federal Agropecuário do MAPA e enviados ao LANAGRO/MG.

Na segunda fase do experimento, para se avaliar a concentração de bactérias viáveis ao final do prazo de validade de cada partida, foram coletados outros quatro frascos de cada partida aprovada, no mês

Foram incluídas no estudo amostras de todas as partidas de vacinas comerciais B19 contra a brucelose bovina aprovadas pelo MAPA, com vencimento no período de março/2007 a julho/2007, totalizando 67 partidas. Estas partidas corresponderam a 44,7% das partidas com vencimento em 2007. Do total de nove marcas comerciais de vacinas B19 registradas junto ao MAPA, produzidas por oito laboratórios, seis vacinas apresentavam partidas com vencimento naquele período (Tab. 1). O Laboratório 2 produz duas diferentes marcas comerciais.

de vencimento da partida, diretamente no retém da indústria produtora por um Fiscal Federal Agropecuário do MAPA e enviados ao LANAGRO/MG.

Todas as partidas foram enviadas ao laboratório sob refrigeração (2°C a 8°C), acompanhadas de formulário de coleta oficial.

4.3. Análise das vacinas para aprovação oficial

Para a liberação oficial, as vacinas foram submetidas aos testes de pureza, dissociação, contagem de bactérias viáveis, estabilidade térmica (ensaio de estabilidade térmica), pH, análise do diluente da vacina e pressão negativa (análise de vácuo) (Brasil 2004b).

Os procedimentos para análise das vacinas B19 comercializadas no Brasil estão descritas no Manual de Procedimentos e Técnicas de Controle de Qualidade de

Vacinas Contra a Brucelose e Antígenos para Diagnóstico da Brucelose do MAPA (Manual..., 200?).

A determinação de bactérias viáveis foi realizada utilizando-se dois frascos de cada partida de vacina. A contagem do número de bactérias viáveis foi efetuada segundo as recomendações do Manual de Procedimentos e Técnicas de Controle de Qualidade de Vacinas Contra a Brucelose e Antígenos para Diagnóstico da Brucelose do MAPA (Manual..., 200?) descrita no Anexo 1, conforme Alton et al. (1988). Os resultados foram emitidos em número de unidades formadoras de colônias (UFC) x 10^{10} /dose de vacina. Vacinas com contagens de bactérias viáveis inferiores a $6,0 \times 10^{10}$ UFC/dose de vacina ou superiores a $1,2 \times 10^{11}$ UFC/dose de vacina foram reprovadas, conforme a legislação vigente (Brasil, 2004b).

O ensaio de estabilidade térmica (EET) foi realizado utilizando-se três frascos da mesma partida da vacina. Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C , por sete dias (Manual..., 200?). Após esse período foram retirados da estufa e submetidos à contagem do número de bactérias viáveis (Alton et al., 1988; Manual., 200?; Anexo 1). Os resultados foram emitidos em número de unidades formadoras de colônias (UFC) x 10^{10} /dose de vacina.

Todos os procedimentos e observações foram registrados no formulário "Acompanhamento do Controle de Vacinas B19 contra Brucelose", do Setor de Brucelose do LANAGRO/MG, para garantir a rastreabilidade, confiabilidade e qualidade das informações.

4.4. Contagem de bactérias viáveis nas vacinas ao vencimento

Para realizar a contagem de bactérias viáveis ao vencimento foram utilizados três frascos de cada partida da vacina, coletados no retém da indústria. Os frascos passaram por avaliação de vácuo (pressão negativa), utilizando-se um centelhador de alta voltagem antes de serem realizadas as contagens de bactérias viáveis (Manual...,

200?). Para o experimento foi utilizado o mesmo procedimento de contagem da análise para liberação oficial (contagem à fresco) e ensaio de estabilidade térmica (EET). A metodologia analítica foi a recomendada por Alton et al. (1988), descrita no Manual de Procedimentos e Técnicas de Controle de Qualidade de Vacinas Contra a Brucelose e Antígenos para Diagnóstico da Brucelose (Manual..., 200?), e no Anexo 1. Os resultados foram emitidos em número de unidades formadoras de colônias (UFC) x 10^{10} /dose de vacina.

4.5 Precauções analíticas

Todos os procedimentos foram realizados atendendo as exigências e recomendações do Nível 3 de Biossegurança (Richmond e McKinney, 2000). O trabalho foi realizado por técnico com adequado conhecimento e treinamento em procedimentos básicos de microbiologia, manipulação de culturas patogênicas, descarte de material contaminado e segurança biológica. Equipamentos de proteção individual como jalecos, sapatos fechados, máscaras, luvas, óculos e toucas foram utilizados durante todas as análises.

Todas as partidas de vacinas foram coletadas no retém da indústria e passaram pela recepção de amostras do LANAGRO/MG onde foram conferidas a documentação pertinente e a temperatura de chegada de cada partida. Após conferir documentos e temperatura, as vacinas foram então enviadas ao Setor de Brucelose do LANAGRO/MG, onde foram conferidas a integridade da amostra, partida, documentação e temperatura na entrega. As amostras recebidas com temperatura acima da recomendada (2°C a 8°C) (Brasil, 2004b), não foram utilizadas para análise. Somente as vacinas em condições adequadas foram registradas e ficaram disponíveis para análise. Neste percurso as vacinas foram mantidas sob refrigeração e após a conferência foram armazenadas em geladeira ou câmara fria com temperatura monitorada duas vezes ao dia até o momento da realização da análise.

4.6 Análises Estatísticas

As avaliações das médias das contagens bacterianas das vacinas à aprovação, ao ensaio de estabilidade térmica e ao final do prazo de vencimento foram realizadas pelo teste t de Student conforme Sampaio (2002), empregando-se o pacote estatístico SAEG (Fundação Arthur Bernardes, Viçosa, MG).

Para a análise e comparação dos resultados das contagens de bactérias viáveis das partidas ao ensaio de estabilidade térmica (EET) com os resultados ao vencimento foram simulados três diferentes pontos de corte para o EET: $2,0 \times 10^{10}$ UFC/dose (PC1); $3,0 \times 10^{10}$ UFC/dose (PC2); e $4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose (PC3). Os pontos de corte foram definidos em função do valor atualmente determinado na legislação (Brasil, 2004b) para aprovação (maior ou igual a $4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose) ou reprovação (menor que $4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose) das vacinas ao vencimento.

A aprovação das partidas pela contagem de bactérias viáveis ao vencimento e pelos diferentes pontos de corte no ensaio de estabilidade térmica foi avaliada pelos testes de McNemar (Siegel, 1975), kappa (Smith, 1995) e cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos (Tarabla, 2004) empregando-se os pacotes estatísticos Epistat (Gustafson, T.L.; Round Rock, Texas, USA) e WinEpiscope 2.0 (Thrusfield et al., 2001). Em todas as análises foi empregado um erro α de 0,05 (Sampaio, 2002).

5. RESULTADOS

À análise de pressão negativa pelo centelhador de alta voltagem todos os frascos de vacina utilizados no experimento apresentaram vácuo de boa qualidade.

Das 67 partidas de vacina B19 analisadas, com vencimento no período de março a

julho de 2007, 50 (74,6 %) apresentaram contagem de bactérias viáveis igual ou superior a $4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose ao final do prazo de validade, valor este estabelecido pela legislação para o número de bactérias viáveis no vencimento para vacinas B19 comercializadas no Brasil (Brasil, 2004b) (Tab. 2). Houve variação entre o número de partidas com contagem de bactérias igual ou superior a $4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose em função do prazo de validade, com 93,1%, 60,0% e 66,7% das partidas consideradas satisfatórias, com prazos de validade de 12, 18 e 24 meses, respectivamente, segundo parâmetros indicados pela legislação (Brasil, 2004b) (Tab. 2).

Os dados relativos à média das contagens de bactérias viáveis das vacinas nas análises para aprovação, ao vencimento e no ensaio de estabilidade térmica, por prazo de validade e por laboratório produtor de vacina B19, são apresentados na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre as médias das contagens de bactérias viáveis por dose de vacina na análise para aprovação entre partidas dos laboratórios que produziam vacinas B19 com prazo de validade de 12 meses (laboratórios 2 e 5), nem entre aquelas dos produtores de vacinas B19 com prazo de validade de 18 meses (laboratórios 1 e 3) (Tab. 2). Dessa forma as partidas de vacina B19 de diferentes laboratórios com prazo de validade de 12 meses e as com prazo de validade de 18 meses puderam ser agrupadas, dentro de cada prazo de validade, para as análises posteriores. Somente nas partidas de vacinas B19 com prazo de validade de 12 meses houve diferença significativa entre as médias das contagens de bactérias viáveis por dose observadas pelo ensaio de estabilidade térmica e pela análise ao vencimento da vacina (Tab. 3). As médias de bactérias viáveis por dose de vacina nas análises à aprovação e ao vencimento foram significativamente diferentes nas partidas de vacina com prazo de validade de 18 meses (Tab. 3).

Tabela 2 – Partidas de vacinas B19 aprovadas pelo MAPA e analisadas ao vencimento para a determinação de bactérias viáveis.

Prazo de Validade	Laboratório	Partidas analisadas ² ao vencimento	Partidas aprovadas ao vencimento ^{1,3}	
		N	N	%
12 meses	2	26	24	92,3
	5	03	03	100,0
	Total	29	27	93,1
18 meses	1	23	15	65,2
	3	12	06	50,0
	Total	35	21	60,0
24 meses	4	03	02	66,7
	Total	03	02	66,7
Total		67	50	74,6

1 - De acordo com a Instrução Normativa N° 15, de 19 de fevereiro de 2004; 2 – Partidas aprovadas pelo MAPA para comercialização com vencimento entre março e julho de 2007; 3 – Partidas com contagem de bactérias superior ou igual a $4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose.

Não foi realizada comparação das médias das contagens à liberação e ao vencimento das partidas do laboratório 5 em função do pequeno número de amostras (N = 3). Porém, as médias das três partidas ao vencimento são superiores às médias das partidas à liberação (Tab. 3). Isso ocorre em função da variação das contagens entre os

frascos de vacinas dentro de uma mesma partida.

As médias das contagens de bactérias viáveis do laboratório 4 também não foram analisadas em função do pequeno número de amostras (N=3).

Tabela 3 – Concentração de bactérias viáveis (UFC x 10¹⁰/dose) em vacinas B19 comercializadas no Brasil à aprovação, ao vencimento e no ensaio de estabilidade térmica¹.

Prazo de Validade	Laboratório	N ²	Análise ³	Média ⁴	Desvio-padrão ⁴	Valor máximo ⁴	Valor mínimo ⁴
12 meses	2	26	A	8,05	1,60	11,60	6,00
			V ^a	7,40	2,41	11,57	1,38
			EET ^a	5,26	2,54	9,65	1,36
	5	3	A	7,65	1,51	9,23	6,23
			V	8,47	0,33	8,85	8,22
			EET	5,71	3,15	8,53	2,35
	Total	29	A	8,01	1,57	11,60	6,00
			V ^a	7,51	2,31	11,57	1,38
			EET ^a	5,33	2,55	9,65	1,36
18 meses	1	23	A ^A	8,03	1,39	11,33	6,03
			V ^A	4,62	1,77	8,32	1,60
			EET	4,21	1,20	6,10	1,80
	3	12	A ^A	6,92	1,17	9,85	6,00
			V ^A	3,95	0,98	5,58	2,25
			EET	4,60	1,45	7,08	1,80
	Total	35	A ^A	7,65	1,41	11,33	6,00
			V ^A	4,39	1,56	8,32	1,60
			EET	4,34	1,28	7,08	1,80
24 meses	4	3	A	7,45	2,05	9,80	6,00
			V	5,53	1,55	6,48	3,52
			EET	5,43	3,49	9,22	2,35
	Total	3	A	7,45	2,05	9,80	6,00
			V	5,53	1,55	6,48	3,52
			EET	5,43	3,49	9,22	2,35

1 – Partidas com vencimento entre março e julho de 2007; 2 – Número de partidas analisadas; 3 – Análise à aprovação para liberação (A), análise ao vencimento (V) ensaio de estabilidade térmica (EET); 4 – Contagem de bactérias viáveis (UFC x 10¹⁰/dose). As comparações entre as médias das contagens de bactérias viáveis (4) à aprovação (A) e ao vencimento (V) (A = P<0,01) e entre ao vencimento (V) e o ensaio de estabilidade térmica (EET) (a = P<0,01) foram realizados pelo teste de t de Student. Somente as diferenças estatisticamente significativas foram indicadas por letras na tabela.

Para as vacinas com prazo de validade de 12 meses, somente no primeiro ponto de corte (PC1), 2,0 x 10¹⁰ UFC/dose, os resultados do ensaio de estabilidade térmica foram semelhantes aos resultados das análises das vacinas ao vencimento quando se utilizou o teste de McNemar (Tab. 4 e Tab. 5). No entanto, a concordância entre os testes foi inferior a 0,4 pelo teste kappa (Tab.5). Os valores preditivos negativos do ensaio de estabilidade térmica frente à aprovação das vacinas no vencimento foram baixos em todos os pontos de corte (Tab. 5).

Para as vacinas com prazo de validade de 18 meses, o ponto de corte de 4,0 x 10¹⁰ UFC/dose foi o único que apresentou resultados do ensaio de estabilidade térmica sem diferença estatisticamente significativa aos resultados das partidas de vacinas ao vencimento, segundo o teste de McNemar (Tab. 4 e Tab. 5). No entanto, a concordância pelo teste kappa, a sensibilidade, a especificidade e o valor preditivo negativo do ensaio de estabilidade térmica foram baixos quando comparados com a aprovação das partidas de vacina ao vencimento (Tab. 5).

Tabela 4 – Simulação de três pontos de corte para o teste de estabilidade térmica em partidas de vacina B19 comercializadas no Brasil em relação à aprovação da partida ao vencimento, segundo as recomendações do MAPA (Brasil, 2004b).

Prazo de Validade	V ¹	PC1 ²			PC2 ³			PC3 ⁴		
		A ⁵	R ⁶	T ⁷	A	R	T	A	R	T
12 meses	A	25	2	27	21	6	27	19	8	27
	R	1	1	2	0	2	2	0	2	2
	T	26	3	29	21	8	29	19	10	29
18 meses	A	20	1	21	19	2	21	18	3	21
	R	13	1	14	11	3	14	7	7	14
	T	33	2	35	30	5	35	25	10	35

1 – V – Análise ao vencimento; 2 – PC1 – Ponto de corte de $2,0 \times 10^{10}$ CFU/dose; 3 – PC2 – Ponto de corte de $3,0 \times 10^{10}$ CFU/dose; 4 – PC3 – Ponto de corte de $4,0 \times 10^{10}$ CFU/dose; 5 – A – Aprovada; 6 – R – Reprovada; 7 – T – Total

Tabela 5 – Análise dos três pontos de corte simulados para o ensaio de estabilidade térmica em relação à aprovação das partidas ao vencimento, segundo as recomendações do MAPA (Brasil, 2004b).

Prazo de Validade	Ponto de Corte ¹	Sen ²	Esp ³	VPN ⁴	VPP ⁵	Kappa ⁶	McNemar ⁷
12 meses	PC1	0,926	0,500	0,333	0,962	0,346	1,000
	PC2	0,778	1,000	0,250	1,000	0,326	0,031
	PC3	0,704	1,000	0,200	1,000	0,247	0,008
18 meses	PC1	0,952	0,071	0,500	0,606	0,028	0,002
	PC2	0,905	0,214	0,600	0,633	0,133	0,022
	PC3	0,857	0,500	0,700	0,720	0,375	0,344

1 – PC1 – Ponto de corte de $2,0 \times 10^{10}$ CFU/dose; PC2 – Ponto de corte de $3,0 \times 10^{10}$ CFU/dose; PC3 – Ponto de corte de $4,0 \times 10^{10}$ CFU/dose; 2 – Sen – Sensibilidade; 3 – Esp – Especificidade; 4 – VPN – Valor preditivo negativo; 5 – VPP – Valor preditivo positivo; 6 – Kappa – Estatística kappa (Tarabla, 2004); 7 – Teste de McNemar (Siegel, 1975)

6. DISCUSSÃO

O programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) do MAPA encontra-se na etapa de controle das doenças e, no caso da brucelose, a vacinação de bezerras de três a oito meses com a vacina B19 é a principal estratégia empregada. Dessa forma é indispensável que as vacinas disponibilizadas no mercado atendam aos parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação vigente no Brasil (Brasil, 2004b) e por órgãos internacionais (COMITÉ..., 1986); British Pharmacopoeia, 1998; Nielsen e Ewalt, 2004).

O MAPA não analisa rotineiramente as vacinas comerciais ao vencimento. Os prazos de validade são determinados pelo fabricante da vacina, dentro dos 24 meses máximos previstos pela legislação (Brasil, 2004 b). Desta forma não existem estudos das concentrações de bactérias viáveis em vacinas B19 ao vencimento, nem nas partidas disponíveis no mercado nem nas partidas em estoque na indústria.

Segundo Verwey et al. (1950), a determinação do número de microrganismos viáveis na vacina B19 tem sido utilizada como parâmetro para estimar se a vacina irá conferir proteção ou não. Assim, uma forma

de prever a qualidade de vacinas B19 é avaliar se a concentração de bactérias viáveis por dose, realizada *in vitro*, está dentro das normas do órgão regulador do programa de controle da brucelose no país.

Vacinas liofilizadas apresentam perda gradual de contagem de bactérias viáveis, porém devem manter a viabilidade durante a vida de prateleira indicada pelo fabricante (Nielsen e Ewalt, 2004). Considerando que umidade residual, o vácuo e o veículo de liofilização (estabilizador) são fatores que podem ser controlados pela indústria durante o processo de produção das vacinas, a temperatura passa a ser o fator que mais interfere na conservação da vacina após a fabricação. Por este motivo a cadeia de frio deve ser mantida em condições adequadas durante o transporte, distribuição, estocagem e manuseio das vacinas, para garantir a viabilidade das mesmas.

Verwey et al., (1950) concluem que grandes problemas em relação à perda de viabilidade ocorrem em condições de campo (transporte, estoque e uso) e podem ter um efeito direto sobre a capacidade imunizante da dose administrada.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), muitos problemas em relação à cadeia de frio são encontrados em países em desenvolvimento, onde existem falhas na distribuição de energia elétrica e refrigeração. Entre os principais problemas estão a exposição das vacinas a temperaturas inadequadas durante transporte e estocagem, congelamento de vacinas, ausência de termômetros nos refrigeradores para controle de temperatura e estoque de vacinas junto a alimentos, bebidas e outros produtos (Galazka et al., 1998).

No presente estudo as vacinas foram coletadas no mês do vencimento no estoque da indústria onde se encontravam em temperaturas adequadas de 2°C a 8°C, em função do interesse dos fabricantes em manter a integridade dos seus produtos. Após a coleta, foram mantidas em cadeia de frio monitorada até o momento da análise,

para garantir a confiabilidade dos resultados.

Os resultados do presente experimento demonstraram que mais de 25 % das vacinas analisadas apresentaram contagem de bactérias viáveis ao vencimento abaixo do recomendado pela legislação (Brasil, 2004b), sendo que as vacinas com prazo de validade de 12 meses foram as que apresentaram o menor número de partidas com contagens abaixo do estabelecido pela legislação ao vencimento. Destas vacinas, quase 8% estavam abaixo do recomendado. Este quadro se agrava quando analisamos as vacinas com prazo de validade acima de 12 meses. Somando-se as vacinas com prazo de validade de 18 e 24 meses, encontra-se que 42 % das partidas estavam com contagem inferior a $4,0 \times 10^{10}$ bactérias viáveis por dose.

Podemos inferir que, caso as vacinas tivessem sido coletadas no comércio, onde estariam submetidas aos problemas de cadeia de frio e aos efeitos deletérios das oscilações de temperatura sobre a contagem de bactérias viáveis (Verwey et al., 1950; Love et al., 1966), poderiam ser esperados resultados de contagens de bactérias viáveis ainda mais baixos nas partidas analisadas e maior número de partidas fora do padrão recomendado.

As diferenças entre as concentrações de bactérias viáveis ao final do prazo de validade nas vacinas com 12, 18 e 24 meses não podem ser justificadas por diferenças nas concentrações iniciais (à aprovação) uma vez que todas as vacinas aprovadas estavam com contagens acima do mínimo requerido para aprovação ($6,0 \times 10^{10}$ bactérias viáveis por dose) (Brasil, 2004b) e não existe diferença estatística entre as médias à aprovação das vacinas com diferentes prazos de validade.

Segundo Valette et al. (1977), uma curva de redução de bactérias viáveis em vacinas B19 ocorre principalmente nos seis primeiros meses após a liofilização, acompanhando a curva de aumento da umidade residual presente na vacina, mesmo quando as vacinas são

armazenadas a 4°C. Dessa forma, pode-se deduzir que as vacinas que chegaram ao final do prazo de validade com contagens abaixo do recomendado pela legislação, provavelmente já apresentavam estas contagens baixas anteriormente.

No presente estudo, onde as amostras foram mantidas sob temperatura controlada até o momento da análise, a temperatura e o tempo podem não ter sido os principais fatores responsáveis pela diferença entre as contagens de bactérias ao vencimento nas vacinas de 12, 18 e 24 meses. Outros fatores que interferem na viabilidade das vacinas durante estocagem devem ser considerados, como o veículo de liofilização (Angus et al., 1977; García-Carrillo, 1982), a umidade residual pós-liofilização (Hutton et al. 1951; Valette et al., 1977; Fawthrop, 1996) e a qualidade de frascos e rolhas (García-Carrillo, 1981; Pikal e Shah, 1991).

Como todos os frascos de vacinas foram avaliados quanto ao vácuo antes de serem submetidos à contagem de bactérias viáveis e apresentaram resultados satisfatórios, esse fator parece não ter contribuído para as diferenças entre os resultados da viabilidade celular das partidas de vacina com diferentes prazos de validade.

Apesar de somente três partidas do laboratório 4, cujo prazo de validade é de 24 meses, terem sido analisados neste experimento, o que diminui o poder de resolução dos testes, duas partidas apresentaram contagens de bactérias viáveis superior ao exigido pela legislação ao vencimento. Isto demonstra que é possível produzir vacinas com boa viabilidade considerando o prazo máximo de validade de 24 meses previstos na legislação, uma vez que a média das vacinas com prazo de validade de 24 meses, ao vencimento, é superior ao mínimo de $4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose (Tab. 3). Isso sugere que o fator tempo de estocagem pode ser menos significativo que os outros fatores que interferem na viabilidade das vacinas B19 durante sua armazenagem, como a composição do veículo de liofilização e a cadeia de frio durante a vida de prateleira da vacina.

Como a concentração de microrganismos viáveis ao vencimento, estabelecido pela legislação brasileira, é um fator diretamente relacionado à indução da resposta imune no hospedeiro e grande número de partidas se encontra com valores de UFC/dose ao vencimento abaixo do estabelecido pela legislação brasileira, podemos inferir que várias bezerras estão recebendo doses de vacinas B19 abaixo do recomendável para uma imunização adequada, mesmo quando a vacina não é utilizada ao final do prazo de vencimento. Isto pode causar grande impacto negativo no programa de vacinação, uma vez que mesmo se as metas de cobertura vacinal estipuladas pelo PNCEBT fossem alcançadas, nem todas as bezerras vacinadas estariam protegidas, reduzindo os índices de 65% a 75% de proteção previstos quando se utiliza a vacina B19.

Nos anos de 2005 e 2006, a média de doses por partida de vacina B19 produzidas no Brasil e aprovadas pelo MAPA foi em torno de 100.000 doses³. Considerando os dados da tabela 3, podemos inferir, com base nos resultados deste estudo, que 1.700.000 doses de vacina B19 podem ter sido disponibilizadas no comércio com concentração de bactérias viáveis abaixo do mínimo recomendado pela legislação ao vencimento (Brasil, 2004b). Aplicando-se o percentual de total de reprovação das partidas ao vencimento encontrado neste estudo (25,4%) ao total de partidas produzidas no ano de 2007 (150 partidas³), teríamos um total de 38 partidas reprovadas. Isto equivaleria, pela média de doses por partida³, a 3,8 milhões de doses de vacina que não apresentariam concentração bacteriana desejável ao final de sua validade. Se considerarmos os fatores relacionados à cadeia de frio, esse número pode ter sido ainda maior, principalmente nas vacinas de 18 e 24 meses que ficaram mais tempo sujeitas às

³ Soares, Filho, P.M. Comunicação pessoal, 2008. Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MG Setor de Brucelose – Av. Rômulo Joviano S/N – CEP 33600.000 – Pedro Leopoldo/MG.

alterações de temperatura, com suas consequentes implicações na viabilidade das vacinas.

Araújo (1976) analisou as quatro vacinas B19 que eram comercializadas no Brasil no ano de 1973. Destas, duas vacinas eram liofilizadas e duas eram vacinas líquidas. Foram realizados testes de contagem de bactérias viáveis e teste de potência em camundongos. A dose recomendada pela legislação era de $6,0 \times 10^{10}$ bactérias viáveis (BRASIL, 1958). Nenhuma das vacinas apresentou a contagem mínima recomendada pela legislação então vigente mesmo quando recém-fabricadas e fornecidas pela indústria. Considerando-se as vacinas próximo ao vencimento, a concentração de bactérias viáveis nas vacinas estava cerca de seis a 120 vezes menor que a contagem de bactérias viáveis recomendada pela legislação. Essas vacinas também conferiram baixa proteção, demonstrada no teste de potência em camundongos, provavelmente em decorrência da baixa concentração de bactérias viáveis (Araújo, 1976).

Os resultados das análises de Araújo (1976) comparados com os resultados deste trabalho demonstram que houve uma evolução significativa na qualidade das vacinas B19 comercializadas no Brasil e isso se deve às melhorias no processo de fabricação e controle de qualidade da indústria e do controle oficial realizado pelo MAPA. Porém os índices de reprovação de vacinas B19 ao vencimento ainda são elevados, principalmente nas vacinas com prazo de validade acima de 12 meses, o que pode estar causando grandes prejuízos ao programa de vacinação do PNCEBT.

No Brasil, os prazos de validade das vacinas são determinados pelo fabricante dentro dos períodos determinados pela legislação do MAPA e devem ser comprovados por testes de estabilidade em tempo real. Entretanto os resultados encontrados nesse trabalho não corroboram os prazos de validade determinados pelos fabricantes de vacinas B19 comercializadas atualmente no Brasil.

Considerando todos os fatores que podem influenciar a perda da estabilidade da vacina durante sua vida de prateleira e a importância do número mínimo recomendado de bactérias viáveis no momento do uso da vacina, é muito importante que a indústria fique atenta aos fatores ligados à perda de estabilidade e busque melhorar os resultados de viabilidade das vacinas.

Apesar do ensaio de estabilidade do MAPA ser utilizado há vários anos a cada lote de vacina analisada, gerando custos e mão-de-obra consideráveis, não existe um trabalho científico que comprove o valor deste teste como indicativo da contagem de bactérias viáveis ao final do prazo de validade de partidas de vacinas B19 comerciais. Desta forma o ensaio de estabilidade térmica e não é critério para reprovação de produtos sob análise oficial.

A União Européia não aceita dados oriundos de testes de estabilidade térmica acelerado para determinação do prazo de validade de imunobiológicos veterinários, uma vez que existem diferentes parâmetros de estabilidade e, no caso de vacinas veterinárias, um único parâmetro não poderá representar a estabilidade do produto (Lucken et al., 1997). Em função da natureza dos imunobiológicos veterinários, a degradação dos componentes observados em estudos de testes de estabilidade térmica acelerado geralmente não é igual ao observado em estudos em tempo real. Produtos biológicos contêm peptídeos que estão sujeitos a diferentes reações de degradação em diferentes temperaturas (Fawthrop, 1996).

Pilet et al. (1975) avaliaram seis lotes de vacinas B19 liofilizadas provenientes de vários laboratórios mantidos em três diferentes temperaturas de estocagem, 4°C, 37°C e temperatura ambiente por 536 dias. O teste de conservação das vacinas B19 a 37°C por sete dias não forneceu nenhuma indicação do período de validade deste tipo de vacina. Os resultados do presente experimento também não comprovaram a eficácia do ensaio de estabilidade térmica realizado por sete dias a 37°C em estimar a

concentração de bactérias viáveis ao final do prazo de validade em vacinas B19. Apesar de haver concordância entre os resultados do EET no ponto de corte de $4,0 \times 10^{10}$ e os resultados das vacinas ao vencimento para as vacinas de 18 meses de prazo de validade pelo teste de McNemar, os resultados de concordância encontrados pelo teste Kappa e os valores de sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo não validam o teste de EET.

Valette et al. (1977), em um estudo com vacinas B19 liofilizadas conservadas a 4°C e 37°C, afirmam que existe uma equivalência entre os resultados de viabilidade do 14º dia de vacinas preservadas a 37°C com os resultados obtidos após um ano de conservação a 4°C. Os resultados encontrados no presente experimento permitem supor que se os ensaios utilizando as vacinas mantidas a 37°C por apenas sete dias não foram eficazes em estimar a concentração de bactérias ao final do prazo de validade, apresentando médias de contagem de bactérias viáveis mais baixas que ao vencimento (Tab.3), a manutenção das mesmas a 37°C por 14 dias causaria reduções ainda maiores nas contagens de bactérias viáveis ao EET em função dos efeitos deletérios de altas temperaturas sobre as vacinas B19, o que contrasta com os dados obtidos por Valette et al.(1977).

No presente estudo, foram utilizados diferentes pontos de corte para o Ensaio de Estabilidade Térmica (EET) na tentativa de definir em qual deles as partidas analisadas não apresentariam valores discordantes das vacinas ao vencimento em função da contagem de bactérias viáveis ao vencimento recomendada pela legislação ($<4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose para reprovação e $\geq 4,0 \times 10^{10}$ UFC/dose para aprovação).

Mesmo nos pontos de corte em que as vacinas com prazo de validade de 12 e 18 meses apresentaram-se estatisticamente semelhantes ao EET e ao vencimento quando analisados pelo teste de McNemar, os valores de sensibilidade, especificidade e VPN foram baixos, o que não permite

validá-lo como ensaio indicador da concentração de bactérias viáveis das vacinas ao vencimento. Além disto, em nenhum dos pontos de corte avaliados o teste de Kappa apresentou valor satisfatório.

Considerando que o EET fosse critério para reprovação oficial de vacinas B19, mesmo utilizando os pontos de corte com concordância pelo teste de McNemar para avaliar as vacinas com prazo de validade de 12 e 18 meses, os dados de sensibilidade e especificidade indicam que para as vacinas com prazo de validade de 12 meses seriam aprovadas indevidamente 50% das vacinas testadas e seriam reprovadas 7% de vacinas em boas condições. Para as vacinas com validade de 18 meses, seriam também aprovadas indevidamente 50% das vacinas testadas e seriam reprovadas 14% de vacinas em boas condições. A reprovação de vacinas em boas condições comerciais prejudica o programa de controle da brucelose por reduzir o abastecimento de vacinas, interferindo nas metas de cobertura vacinal. Acarreta também elevados prejuízos econômicos à indústria uma vez que em determinadas partidas podem ser produzidas até 300.000 doses de vacina. Por outro lado, a aprovação de vacinas em condições inadequadas coloca em risco as metas do programa de vacinação, principal ferramenta do programa de controle e erradicação da brucelose atualmente no Brasil, por não induzir a imunidade prevista.

7. CONCLUSÕES

- Entre as vacinas B19 contra brucelose bovina comercializadas no Brasil, observa-se elevado percentual de reprovação ao vencimento em vacinas com prazo de validade acima de 12 meses.

- O ensaio de estabilidade térmica acelerado preconizado pelo MAPA não pode ser considerado teste capaz de estimar a quantidade de bactérias viáveis em vacinas B19 ao final do prazo de validade.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em decorrência dos resultados do presente trabalho, sugere-se ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA):

- Avaliar rotineiramente as vacinas B19 atualmente comercializadas no Brasil ao vencimento;
- Reavaliar os prazos de validade das vacinas B19 comercializadas no Brasil com estudos de estabilidade em tempo real;
- Avaliar a estabilidade de vacinas B19 atualmente comercializadas no Brasil com estudos em diferentes temperaturas, comparando viabilidade, umidade residual e outros parâmetros de qualidade.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y Enfermedades Transmissibles Comunes al hombre y a los Animales*. 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986, 989 p. (Publicación Científica n. 503)

ANDERSON, T.D.; MEADOR, V.P.; CHEVILLE, N.F. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Vet. Pathol.* V. 23, n.3, p. 219-226, 1986.

ANGUS, R.D.; LOVE, E.L.; PIETZ, D.E. Evaluation of five mediums for the stabilization of *Brucella abortus* strain B19 desiccated by liophilization. *Develop. Biol. Standard.* V.36, p. 307-312, 1976.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D. et al. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA. 1988, 189 p.

ARAÚJO, R.F. *Avaliação de qualidades das vacinas B19, fabricadas no Brasil*. 1976. 47 f., Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1976

BALDWIN, C.L. Immune response overview. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p.365-366, 2002.

BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p.367-382, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria Nº 438, de 22 de abril de 1958. Instruções para o Combate à Brucelose Animal. Diário Oficial da União, Brasília, 25 abril de 1958, p. 9411-9413.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 06, de 08 de janeiro de 2004. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial da União Nº 07, Brasília, 12 janeiro de 2004, Seção 1, p. 6-10. 2004 a.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 15, de 19 de fevereiro de 2004. Regulamento Técnico para produção e controle de qualidade da vacina contra Brucelose e antígenos para diagnóstico da brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial da União Nº 57, Brasília, 24 março de 2004, Seção 1, p. 25-26. 2004 b.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 33, de 24 de agosto de 2007. Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51.

Diário Oficial da União Nº 166, Brasília, 28 de agosto de 2007, Seção 1, p. 6-7. 2007.

BRITISH PHARMACOPOEIA. *Veterinary Antisera and Veterinary Vaccines*. 3. ed. Saint Ruffine: Maisonneuve S.A., 1998.

CELLI, J.; GORVEL, J-P. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmatic reticulum. *Curr. Op. Microb.* v.7, p. 93-97, 2004

CELLI, J.; CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D-Met al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmatic reticulum. *J. Exp. Med.* v.198, n.4, p. 545-556, 2003

CELLI, J.; SALCEDO, S.P.; GORVEL, J-P. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *PNAS.* v.102, n.5, p. 1673-1678, 2005

CHEVILLE, N.F. Development of vaccines and diagnostic reagents for eradication of bovine brucellosis. *Agri-Practice.*,v.14, n. 1, p.9-13, 1993.

COMITÉ Mixto FAO/OMS de Expertos em *Brucellosis*. Ginebra: Organización Mundial de La Salud, 1986.149 p. (Série de Informes Técnicos 740)

CONFER, A.W.; HALL, S.M.; FAULKNER, C.B.; ESPE, B.H.; DEYOE, B.L.; MORTON, R.J.; SMITH, R.A. Effects of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated with reduced doses of *Brucella abortus* Strain 19. *Vet. Microb.* v.10, n.6, p. 561-575, 1985.

CORBEL, M.J. *Brucellosis in Man and Animals*. Geneva: WHO, 2006, 89p.

CRAWFORD, R.P.; HUBBER, J.D.; ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 131-151.

DAVIES, G.; COCKS, E.; HEBERT, N. *Brucella abortus* (strain 19) vaccine: (a) determination of a minimum protective dose in cattle; (b) the effect of vaccinating calves previously inoculated with anti-*Brucella abortus* serum. *J. Biol. Stand.*, v.8, n.3, p.165-175, 1980.

DETILLEUX, P.G.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Inf. Immun.*, v.58, n.7, p. 2320-2328, 1990.

ENRIGHT, F.M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.301-320

ESPESETH, D.A. Principles of Veterinary Vaccine Production. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5. ed., Paris:World Organization for Animal Health, 2004, v.1, p. 57-68.

FAWTHROP, D. Regulatory requirements for veterinary vaccine stability in the European Community. *Dev. Biol. Stand. Basel.* Karger, v. 87, p.319-327, 1996.

FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.et al. *Situação Epidemiológica da Brucelose Bovina e Bubalina no Brasil..* São Paulo : USP, 2006. 71 P. (Primeiro Relatório Parcial)

GALAZKA, A.; MILSTIEN, J.; ZAFFRAN, M. *Thermostability of vaccines*. Geneva: WHO, 1998. 64p.

GARCÍA-CARRILLO, C. Conservación de la vacuna liofilizada *Brucella melitensis* Rev. 1. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, v. 19, n.1, p.17-22, 1977.

GARCÍA-CARRILLO, C. Evaluación de 15 fórmulas de liofilización sobre la viabilidad de la vacuna *B. abortus* cepa 19. *Rev. Med. Vet.* V.62, n. 3, p.182-191, 1981.

- GARCÍA-CARRILLO, C. Influencia de la temperatura y el grado de vacío sobre la conservación de la vacuna *Brucella abortus* cepa 19 liofilizada. *Zbl. Vet. Méd. B.* v.29, n.1, p. 57-66, 1982.
- GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J-P et al. From discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.*, V.36, n. 3, p.313-326, 2005
- GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p.281-297, 2002.
- GRAVES, R.R. The story of John M. buck's and Matilda's contribution to the cattle industry. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 102, n.3, p.193-195, 1943.
- HUDDLESON, F.; RICHARDSON, M.A.; WARNER, J. et al.. *Studies in brucellosis, III*. East Lansing: Michigan State University, 1952. 114 p.
- HUTTON, R.S.; RUSSEL, J.H.; ROBERTS, J.L. Some physical factors that influence the survival of *Brucella abortus* during freeze-drying. *J. Bact.* v.61, n.3, p.309-319, 1951
- KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Mic. Rev.* V.16, n. 1, p.65-78, 2003.
- LAGE, A.P.; POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P. Controle da brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zoot.* n.47, p. 30-41, 2005.
- LAMBERT, G.; DEYOE, B.L.; PAINTER, G.M. Postvaccinal persistence of *Brucella abortus* strain 19 in two bulls. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* V. 145, p. 909-911, 1964
- LOVE, E.L., PIETZ, D.E., RANGER.C.R. Effect of storage temperatures on desiccated *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 149, n. 9, p.1177-1182, 1966.
- LUCKEN, R.; STOLP, R.; FAWTHROP, D. Stability testing. IN: PASTORET, P.P.; BLANCOU, J.; VANNIER, P.; VERSCHUVER, C. *Veterinary Vaccinology*. Amsterdam : Elsevier, 1997, p.215-219.
- MANTHEI. C.A.; MINGLE, C.K.; CARTER, R.W. Duration of immunity to brucellosis induced in cattle with strain 19 vaccine. In: Annual Meet. U.S. 88, 1951, *Proc....Am. Vet. Med. Assoc.* 1951, p. 128-141.
- MANTHEI. C.A. Summary of controlled research with strain 19. In: Annual Meet. U.S. 63, 1959, *Proc...U.S. Livest. Sanit. Assoc.*, 1959, p. 91-97.
- MANUAL de Procedimentos e Técnicas de Controle de Qualidade de Vacinas Contra a Brucelose e Antígenos Para Diagnóstico da Brucelose. [s.l]: [s.n], [200?], (circulação interna)
- McDIARMID, A.A. The degree of duration of immunity in cattle resulting from vaccination with strain 19 *Brucella abortus* vaccine and its implication in the future control and eventual eradication of brucellosis. *Vet. Rec.*, v.69, n. 37, p.877-879, 1957.
- MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in Bovine placenta. *Vet. Pathol.* V.26, n.6, p. 513-515, 1989.
- MINGLE, C.K.; MANTHEI, C.A.; JASMIN, A.M. The stability of reduced virulence exhibited by *Brucella abortus* strain 19. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.99, n. 773, p.203-205, 1941.
- NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 283-299.
- NICOLETTI, P. Effects of brucellosis on bovine reproductive efficiency. In: MORROW, D.A. *Current Therapy in theriogenology* 2 ed., Philadelphia : W.B. Saunders, 1986. p.271-274.

- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p.447-459, 2002.
- NIELSEN, K.; EWALT, D.R. Bovine Brucellosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5.ed., Paris: World Organization for Animal Health, 2004, v.1, p. 409-438.
- OLIVEIRA, S.C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p.417-424, 2002.
- OLSEN, S.C.; STOFFREGEN, W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev. Vaccines* v.4, n.6, p. 915-928, 2005.
- PIKAL, M.J.; SHAH, S. Moisture transfer from stopper to product and resulting stability implications. *Dev. Biol. Stand.* V. 74, p.165-179, 1991.
- PILET, CH.; LE GARREC, Y.; VISSAC, J.L et al. Influence de la temperature sur la conservation des vaccines brucelliques. *Dev. Biol. Stand.*, v. 31, p. 314-322, 1976.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MÉRESSE, S.; PARTON, R.G et al.. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Inf. Immun.*, v.66, n.12, p. 5711-5724, 1998a.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V. et al. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Inf. Immun.*, v.66, n.5, p. 2387-2392, 1998b.
- POESTER, F.P., GONÇALVES, V.S.P., LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p.55-62, 2002.
- POESTER, F.P. *Eficácia da vacina RB51 em novilhas*. 2006. 52 f., Tese (doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006
- PROGRAMA Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 188 p. (*Manual Técnico*).
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Veterinary Medicine: A textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9th ed., London: W.B. Saunders, 2000, p.867-882.
- RAGAN, V.E. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p.11-18, 2002.
- RAY, W.C. Brucellosis due to *Brucella abortus* e *Brucella suis*. In: STEELE, J.H. (Ed). *CRC Handbook Series in Zoonosis*. Boca Raton : CRC Press, 1979, p. 99-127.
- RICHMOND, J.Y.; MCKINNEY, R.N (Eds.). *Biossegurança em laboratórios biomédicos e de manipulação*. Brasília: FUNASA, 2000. 290 P.
- SAMPAIO, I.B.M. 2002. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002.. 265 p.
- SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p. 479-496, 2002.
- SIEGEL, S.. *Estatística não-paramétrica*. São Paulo: McGRAW-HILL. 1975, 350 p.
- SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; BORGES, A.M et al. Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zoot.* n.47, p. 1-12, 2005.
- SMITH, R.D. *Veterinary Clinical Epidemiology*. A problem-oriented approach. 2 ed. Boca Raton: CRC Press. 1995, 279 p.

TARABLA, H.D. *Epidemiologia Diagnóstica*. Santa Fé: Universidad Nacional del Litoral. 2000, 120 p.

THE DEVELOPMENT of New/Improved Brucellosis Vaccines: *Report of WHO Meeting*. 47 p. 1997. (WHO/EMC/ZDI/98.14). Disponível em: <http://www.who.int/emc>. Acesso em: 07/01/2008.

THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *Brucella*. In: GILES, C.L., THOEN, C.O. (Ed.) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 2. ed. Local: Iowa: Iowa State Univ. Press, 1993. p.236-247.

THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I. et al. Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec*, v. 148, n.18, p. 567-572, 2001.

VALETTE, L.; STELLMANN, P.; PRECAUSIA, P. et al. Freeze-drying of *Brucella* vaccine strain B19. *Dev. Biol. Stand.*, v. 36, p. 313-322, 1977.

VERWEY, W.F.; HARRINGTON, N.H.; MATT, C. Factors influencing the properties of desiccated *Brucella abortus* vaccine. U.S. 54, 1950, *Proc. U.S. Livest. San. Assoc.*, 1950. p.65-71.

Anexo 1 – Contagem do número de bactérias viáveis (UFC – Unidades formadoras de colônias)

1.1 Equipamentos

- Cabine de segurança biológica (CSB) classe II tipo A;
- Refrigerador Duplex Frost Free, 110V, 423 litros
- Estufa BOD, 550 litros, 110V
- Autoclave.

1.2 Materiais

- Agulhas 25mm x 8mm ou 25mm x 7mm, estéreis e descartáveis;
- Seringas descartáveis e estéreis de 20mL;
- Alças de Drigalsky ou bastão em L estéreis;
- Caneta para marcação em vidro ou lápis dermatográfico;
- Pedacos de gaze;
- Garrafas de diluição (garrafas Milk) com rolhas;
- Luvas de látex;
- Respiradores com filtro N95, com 95% de eficiência para partículas de 0,3 μ m, livre de látex;
- Micropipetas de 1000 μ L
- Ponteiras estéreis de 1000 μ L com filtro hidrofóbico, acondicionadas em raques;
- Micropipetas de 100 μ L
- Ponteiras estéreis de 100 μ L ou 200 μ L com filtro hidrofóbico, acondicionadas em raques;
- Tesouras (estéreis) para abertura de lacres dos frascos de vacina;
- Recipientes para descarte de materiais com solução desinfetante ácido peracético 0,03%

1.3 Reagentes e soluções

- Ágar triptose (30 mL) em placas de Petri (9,0mm x 1,0mm);
- Água destilada;
- Álcool etílico 70° GL;
- Solução Salina 0,5% peptonada a 1% (99 ml em garrafa milk com rolha);

1.3.1 Agar triptose

- Foi utilizado ágar triptose Difco (Tryptose Agar - Lote : 6058053) para produção dos meios.

- Formulação:

- | | |
|---|---------------|
| - Agar triptose | - 41,0 gramas |
| - H ₂ O destilada/deionizada | - 1.000 ml |
| - Volume por placa | - 30 mL |
| - pH final - 7,2 ± 0,2 | |

- Composição em 1 litro :

- | | |
|--------------------|---------------|
| - Triptose | - 20,0 gramas |
| - Dextrose | - 1,0 grama |
| - Cloreto de Sódio | - 5,0 gramas |
| - Agar | - 15,0 gramas |

1.3.2 Solução Salina 0,5% Peptonada 1%

- Foi utilizado peptona Difco (Lote : 3335867) e peptona Oxoid (Lote: 411170) para produção dos meios.

- Formulação:

- | | |
|---|-------------|
| - Cloreto de Sódio | 25,0 gramas |
| - Peptona | 50,0 gramas |
| - H ₂ O destilada/deionizada | 5.000 ml |
| - Volume por garrafa | 99,0 mL |
| - pH final - 7,0 ± 0,2 | |

1.4 Técnica de contagem de microrganismos viáveis

Técnica realizada segundo Alton et al.. (1988) e publicada no Manual de Procedimentos e Técnicas de Controle de Qualidade de Vacinas Contra a Brucelose e Antígenos Para Diagnóstico da Brucelose do MAPA (Manual, 200?).

- **Nº de frascos:** São utilizados 02 (dois) ou 03 (três) frascos de vacinas com seus respectivos diluentes de acordo com a finalidade (Ensaio a Fresco, Estabilidade ou Teste ao Vencimento)

- **Técnica :**

- Identificar as garrafas, contendo 99mL salina peptonada, com os valores de diluição:
- 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} ;
- Desinfetar, com álcool 70°GL, todo o material que for colocado dentro da CSB;
- Avaliação macroscópica da fração diluente - Inspeccionar visualmente os frascos de diluente, em condições de boa luminosidade, para observar alterações do aspecto, cor e presença de partículas em suspensão.
- Retirar os lacres aluminizados com uma tesoura descontaminada e reconstituir a vacina usando seringa de 20 ml e agulha 25mm x 8mm ou 25mm x 7mm descartáveis, considerando a quantidade de doses por frasco e 2mL por dose;
- Aguardar até que a pastilha liofilizada esteja completamente hidratada;
- Homogeneizar a suspensão invertendo o frasco, suavemente, durante 1 a 2 minutos;
- Transferir 1000µL da vacina reconstituída para a garrafa identificada com a diluição 10^2 ;
- Homogeneizar a suspensão invertendo a garrafa, no mínimo, 20 vezes;
- Transferir 1000µL da diluição 10^{-2} para a garrafa 10^{-4} , desta para a 10^{-6} e finalmente para a 10^{-8} , homogeneizando sempre da maneira indicada e utilizando uma nova ponteira para cada transferência. A suspensão final (10^{-8}) fica assim diluída: 100.000.000 de vezes;
- Depositar 100µL da diluição 10^{-8} em quatro placas de ágar triptose. Espalhar o inóculo pela superfície do ágar, utilizando alça de Drigalsky ou bastão em L, até o inóculo ser totalmente absorvido pelo meio de cultura;
- Incubar as placas invertidas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96 horas;
- Contar as colônias nas quatro placas e calcular a média;

- Estimar a quantidade de brucelas viáveis / dose de vacina / frasco, multiplicando o valor da média encontrada por 2×10^9 ;
- Calcular a média dos resultados dos frascos e emitir o resultado da partida em UFC/dose do produto.

1.5 Registro de Procedimentos

Todos os procedimentos e observações foram registrados no formulário “Acompanhamento do Controle de Vacinas B19 contra Brucelose”, do Setor de Brucelose do LANAGRO/MG, para garantir a rastreabilidade, confiabilidade e qualidade das informações.

1.6 Descarte de material contaminado

Frascos de vacinas e diluentes, seringas, agulhas, ponteiros e demais materiais descartáveis foram autoclavados a $131\text{ }^{\circ}\text{C}/30'$ e descartados.