

Maria Ivette Carboni ^{DS} Malucelli

**PRODUÇÃO DE VACINA PERTUSSIS POR DIFERENTES PROCESSOS.
NÍVEIS DE PROTEÇÃO E ASPECTOS ECONÔMICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Departamento de Prática de Saúde Pública, para obtenção do título de "Mestre em Saúde Pública".

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa de Paula Carvalho

SÃO PAULO
1983



À Sra. Angelina e ao Sr. Ignácio, meus pais

Ao Frederico e Ricardo, meus filhos

Ao Benjamin (Bijo), meu marido

COM GRATIDÃO E CARINHO

*Ao Prof. Dr. João Pessoa de Paula Carvalho, do
Departamento de Prática de Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo*

PELO APOIO, ESTÍMULO E ORIENTAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar nossa gratidão a todos que nos auxiliaram e incentivaram durante a realização deste trabalho.

À Divisão de Microbiologia e Imunologia, ao seu Diretor Dr. Bruno Soerensen Cardoso; ao Serviço de Bacteriologia, à sua Diretora Martha M. M. Pereira; e, a todos os colegas e funcionários da Seção de Vacinas Bacterianas do Instituto Butantan, agradecemos o auxílio e a amizade durante todos estes anos.

À Professora Doutora Masaio Mizumo Ishizuka, da disciplina de Epidemiologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal,

Ao Professor Doutor Mario Mariano, da disciplina de Patologia Geral do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e

Ao Sr. Nelson Fernando Prestes D'Avila, nossa profunda gratidão pelas efetivas colaborações e valiosas sugestões.

O nosso muito obrigado a:

- Carlos Righetti Neto
- Carmem Aleixo Nascimento
- Cassiano Augusto Ferreira
- Denise Maria Mariotti
- Eide Mariana Muta Carvalho
- Ezequiel da Silveira
- Maria Ângela Dias Furtado
- Maria Aparecida Sakauchi
- Rosi Carvalho Lemos
- Túlia Brígida Ventura
- Valter Pezzine
- Yassuo Shimizu
- e
- Funcionários da Biblioteca
do Instituto Butantan

RESUMO

Diferentes processos foram desenvolvidos para aumentar a produção de Vacina Pertussis a fim de atender à elevada demanda deste imunoterápico.

A produção de Vacina Pertussis foi realizada pelos processos de Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador. Foram analisadas a potência, o rendimento e a eficiência da vacina produzida por estes diferentes processos.

Em todos os processos, a potência da vacina foi igual ou superior a 8 UI/ml, resultado que está de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde.

O processo de Garrafa de Roux produziu vacina com maior média de potência ($12,33 \pm 3,11$) quando comparado com os outros processos, mas com maior desvio padrão. O Agitador produziu vacina com menor média de potência ($10,99 \pm 1,52$) porém, com menor desvio padrão, demonstrando, conseqüentemente, maior uniformidade metodológica.

O rendimento, assim como a eficiência da vacina, foram maiores com o processo do Agitador.

SUMMARY

Different methodological procedures have been developed to increase the production of Pertussis Vaccine in order to supply the increasing demand of this type of immunotherapeutic.

The production of Pertussis Vaccine was assayed by the Roux Flask, the Fermentor and the Shaker process. The potency, the rate of production as well as the efficiency of the vaccine produced by these different procedures were analysed.

Using these different methods the vaccine produced had a potency of 8 IU/ml or higher, a result which is in accordance to the recommendations of the World Health Organization.

The Roux Flask method produced vaccine with the highest mean of potency (12.33 ± 3.11) as compared to the other ones but with the highest standard deviation. The Shaker method produced vaccine with the lowest mean of potency (10.99 ± 1.52) but with a small standard deviation and consequently, with a more homogeneous pattern of production.

The rate of production as well as the efficiency of the vaccine were higher with the Shaker method.

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	08
2.1. Cepas de <i>Bordetella pertussis</i>	08
2.2. Meios de cultura	08
2.3. Animais	09
2.4. Obtenção da suspensão de <i>B. pertussis</i> para a produção de Vacina Pertussis	09
2.4.1. Preparação do inóculo	10
2.4.2. Semeadura em Garrafas de Roux (cultivo estacionário)	10
2.4.3. Semeadura em Fermentadores (cultivo submerso)	11
2.4.4. Semeadura em Agitadores (cultivo submerso)	12
2.5. Controle de qualidade das suspensões	12
2.5.1. Teste de pureza	12
2.5.2. Teste de identidade	13
2.5.3. Teste de esterilidade	13
2.5.4. Teste para a determinação da concentração bacteriana	13
2.5.5. Teste de toxidez	14
2.5.6. Teste de potência	15
2.5.6.1. Imunização	15
2.5.6.2. Inoculação da cultura virulenta	16
2.5.6.3. Avaliação do poder <u>i</u> munizante	17
2.5.6.4. Valor protetor exigido	18
2.6. Fluxograma da produção da Vacina Pertussis	18
2.7. Análise estatística	20
2.8. Análise econômica	20

3. RESULTADOS	22
3.1. Determinação da potência da Vacina Pertussis nos diferentes processos de produção	31
3.2. Avaliação do rendimento dos pro- cessos de produção da Vacina Per- tussis	34
3.3. Estudo da eficiência dos processos de produção da Vacina Pertussis	35
4. DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Vacina Pertussis preparada pelo processo de Garrafa de Roux, <u>se</u> gundo lote e condição	23
Tabela 2 - Vacina Pertussis preparada pelo processo do Fermentador, <u>segun-</u> do lote e condição	27
Tabela 3 - Vacina Pertussis preparada pelo processo do Agitador, <u>segundo</u> lote e condição	29
Tabela 4 - Valores de potência (UI/ml) da Vacina Pertussis segundo parti- da e processo	32
Tabela 5 - Valores da média aritmética, <u>des</u> vio padrão e coeficiente de <u>va</u> riabilidade das potências dos três processos empregados	33
Tabela 6 - Vacina Pertussis segundo <u>proces</u> so de preparo e condição	34
Tabela 7 - Relação entre rendimentos da <u>Va</u> cina Pertussis pelos processos relacionados 2 a 2	35
Tabela 8 - Custo de meio de cultura para <u>u</u> ma dose de Vacina Pertussis, <u>se</u> gundo processo de preparo e <u>con</u> dição	37

Tabela 9 - Relação entre eficiência da Vacina Pertussis pelos processos relacionados 2 a 2	38
--	----

1. INTRODUÇÃO

A coqueluche, popularmente conhecida por "tosse comprida", é uma moléstia de distribuição cosmopolita que acomete, preferencialmente, crianças de 0 a 5 anos de idade.

Esta moléstia caracteriza-se por uma infecção respiratória localizada e com manifestações específicas de tosse paroxística, linfocitose, com sintomas e características epidemiológicas únicas.

O período de incubação da doença é de 10 a 16 dias, após o qual os indivíduos atingidos apresentam febre acompanhada pela presença de catarro ao nível do aparelho respiratório. Após este período, manifestam-se os sintomas característicos, que persistem de 4 a 8 semanas, podendo permanecer até 20 semanas. A duração da enfermidade é de 50 a 60 dias (MUDD²², 1970).

BORDET & GENGOU¹, em 1906, examinando o escarro de crianças acometidas de coqueluche durante o período catarral, conseguiram isolar um coco-bacilo gram negativo de crescimento delicado em meio de Bordet-Gengou, hoje denominado *Bordetella pertussis*.

No passado, a morbidade e a mortalidade da coqueluche eram elevadas (BROOKS & BUCHANAN², 1970), sendo a gravidade da manifestação clínica e a letalidade mais frequentemente observadas em crianças abaixo de 2 anos de idade, em razão da maior suscetibilidade e menor resistência (KRUGMAN & WARD¹⁴, 1977).

Atualmente, a doença manifesta-se com baixa endemicidade e a sua persistência deve-se à rápida propagação de criança à criança por via aerógena e ao período longo de transmissibilidade.

À evolução prolongada da doença, bem como à gravidade com que a mesma se reveste, impõem-se medidas eficazes de controle.

Embora medidas inespecíficas de controle, como isolamento e tratamento sejam adotadas, são as específicas, representadas pela imunização ativa dos suscetíveis, as mais recomendadas.

A imunização ativa vem sendo utilizada há mais de 20 anos e tem sido a responsável pela queda na incidência da enfermidade, embora continue merecendo a atenção das autoridades sanitárias, principalmente, dos países em desenvolvimento. Nestes países, a coqueluche, dentre as moléstias infecto-contagiosas, é a segunda maior causa de morbidade e mortalidade (COCKBURN⁴, 1977).

A vacinação sistemática contra a coqueluche é feita rotineiramente com três doses de Vacina Tríplice (Difteria-Tétano-Coqueluche) em crianças a partir de 2 meses até 4 anos de idade.

A Vacina Pertussis é uma suspensão de *B. pertussis*, fase I, morta por agentes físicos ou químicos, que associada aos toxóides diftérico e tetânico dá origem à Vacina Tríplice.

O requisito mínimo da Vacina Pertus-

sis, estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION³⁹, 1982), corresponde a 4 Unidades Imunizantes por dose (usualmente contida em 0,5 ml), aferida pela prova de proteção em camundongos infectados pela via intracerebral.

A prova de proteção em camundongos é o método obrigatório de comprovação da atividade protetora da vacina, não eliminando a necessidade de comprovação baseada em testes de campo.

Assim, as investigações efetuadas pelo Conselho de Pesquisas Médicas da Inglaterra (MEDICAL RESEARCH COUNCIL¹⁸, 1956) demonstraram relação positiva entre os testes de potência em camundongos e nível de proteção em crianças vacinadas.

Esse Conselho estabeleceu dois objetivos principais de investigações, sendo o primeiro o de determinar o valor profilático da Vacina Pertussis em crianças, em testes de campo, e o segundo, determinar o valor profilático da vacina em testes laboratoriais. Os testes de campo foram realizados com um grande número de vacinas, dando resultados variáveis, desde ausência da resposta imune até proteção máxima. Os testes de laboratório também demonstraram que as vacinas diferem em sua capacidade de proteção em camundongos contra a infecção intracerebral e em sua capacidade para produzir aglutininas específicas em camundongos e em crianças (MEDICAL RESEARCH COUNCIL¹⁹, 1959). A relação entre a proteção em camundongos e crianças e as aglutininas específicas fo

ram estudadas por diversos pesquisadores (PRESTON & TE PUNGA²⁷, 1959; PRESTON & EVANS²⁶, 1963; PRESTON^{24,25}, 1965, 1966; ELDERING et alii⁷, 1967; MURATA et alii²³, 1971).

Os resultados obtidos nesses estudos permitiram concluir que as vacinas que protegem os camundongos contra a inoculação intracerebral protegem, também, as crianças contra a coqueluche (COMITÉ OMS⁶, 1979).

A prova de proteção em camundongos, portanto, constitui o único método reconhecido de avaliação de eficácia da Vacina Pertussis (WORLD HEALTH ORGANIZATION³⁹, 1982).

O método pioneiro de preparo da Vacina Pertussis é o cultivo do agente etiológico em meio sólido de Bordet-Gengou em Garrafas de Roux, executado por MADSEN¹⁶, em 1933.

O método em meio sólido, embora apresente algumas vantagens, como eficácia e segurança, também apresenta algumas desvantagens, tais como: tempo prolongado de cultivo, baixo rendimento a nível industrial e exigência de longo tempo para sua destoxificação sob refrigeração, o que acarreta, muitas vezes, perda de potência (CATILLEJOS CARMONA & GONZÁLEZ PACHECO³, 1981).

Na procura de métodos alternativos para contornar as desvantagens da utilização do sistema em meio sólido, HORNIBROOK¹¹ (1939), VERWEY & SAGE³⁶ (1945) e COHEN & WHEELER⁵ (1946) verificaram que o meio líquido

era mais adequado que o anterior. Seguiram-se outros trabalhos, visando melhorar as características do meio líquido (GOLDNER et alii⁹, 1966; STAINER & SCHOLTE³⁰, 1971), bem como uma seleção mais criteriosa das cepas a serem semeadas (STAINER & SCHOLTE³⁰, 1971; VAN HEMERT³⁵, 1971).

A tecnologia de produção de vacinas, nos últimos anos, sofreu mudanças fundamentais com a introdução do uso de fermentadores. Este avanço tecnológico possibilitou efetiva simplificação no processamento de produção de vacinas. O cultivo em fermentadores, embora apresente um rendimento superior, tem seu valor protetor inferior, comparativamente ao método em meio sólido; porém, compatível com os padrões de imunogenicidade requeridos para a imunização de suscetíveis (GALICIA et alii⁸, 1981; GÓMEZ REYES & MEDINA GARCIA¹⁰, 1981).

Os fermentadores oferecem como vantagens o bom rendimento a nível industrial, maior homogeneidade de colheita, oferecendo maior confiabilidade. Em contrapartida, temos o custo elevado do equipamento e sua manutenção, assim como, necessidade de infraestrutura adequada.

No momento, no Brasil, apenas o Instituto Butantan de São Paulo, produz a Vacina Pertussis, cuja produção de 1982 foi da ordem de 5 milhões de doses.

A demanda nacional é da ordem de 15 milhões de doses, segundo a informação projetada pelo Anuário Estatístico do Brasil, 1980, relativamente à po-

pulação infantil de 0 a 4 anos de idade e considerando-se a vacinação de 75 a 85% desta população, submetida a um esquema completo de três doses e um reforço. Desta forma, pode-se inferir da necessidade iminente de fomentar-se a produção interna da Vacina Pertussis.

Preocupado em atender a esta elevada demanda, o Instituto Butantan tem procurado alternativas de metodologia de preparo de vacina, visando atender aos propósitos dos Serviços de Saúde Pública. Entre as alternativas, poder-se-ia adotar a produção da Vacina Pertussis pelo processo de cultivo submerso em frascos submetidos a agitação constante (Agitador).

Este processo tem sido utilizado em laboratórios, apenas para o preparo do inóculo, o qual é transferido para o fermentador para a produção final da vacina e, também, como um veículo para testes de meios de cultura (PUSZTAI et alii²⁸, 1961; LANE¹⁵, 1970; STAINER & SCHOLTE³⁰, 1971; GÓMEZ REYES & MEDINA GARCIA¹⁰, 1981; MEDINA GARCIA et alii²¹, 1981; RECAMIER et alii²⁹, 1981).

A procura de um processo de produção mais simplificado e econômico levou-nos a estudar a viabilidade da produção da Vacina Pertussis pelo processo do Agitador, em comparação com aqueles tradicionalmente utilizados.

Assim, para este trabalho, estabeleceu-se o seguinte objetivo:

- avaliar comparativamente a produção

da Vacina Pertussis pelos processos de Garrafa de Roux (método estacionário); Fermentador e Agitador (métodos de cultivo submerso), quanto a:

- a) potência;
- b) rendimento; e
- c) eficiência (custo/benefício).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento prático deste trabalho foi realizado junto à Seção de Vacinas Bacterianas do Serviço de Bacteriologia da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantan, São Paulo, no período de 1981 a 1983.

2.1. CEPAS DE *Bordetella pertussis*

Para a produção de Vacina Pertussis, foram utilizadas as cepas números 137 e 143, provenientes do National Institute of Health (N.I.H.), Bethesda, Maryland, USA, liofilizadas, sorotipos 1.2.3.5.6. e a cepa número 18.323, da mesma procedência, a qual foi utilizada para a dose desafiante intracerebral em camundongos, segundo o método de KENDRICK et alii¹² (1947).

2.2. MEIOS DE CULTURA

Os seguintes meios de cultura foram utilizados para a produção da vacina e testes:

- Meio de Bordet-Gengou, ao qual é acrescentado sangue citratado de carneiro a 25% (KINDT & KÖRNER¹³, 1969) utilizado para a preparação do inóculo e teste de viabilidade.

- Meio sólido de Holt (KINDT & KÖRNER¹³, 1969) utilizado para o cultivo estacionário em Gar

rafas de Roux.

- Meio líquido de Cohen-Wheeler (COHEN & WHEELER⁵, 1946) para o cultivo submerso em Fermentadores e Agitadores.

- Meio líquido de Sabouraud (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE³¹, 1968) para o teste de esterilidade (detecção do crescimento de fungos).

- Meio líquido de tioglicolato (WORLD HEALTH ORGANIZATION³⁹, 1982) para o teste de esterilidade (detecção do crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias).

2.3. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da raça Swiss Webster, pesando 14 a 18 g, provenientes do Biotério Geral do Instituto Butantan, para os testes de potência e toxidez.

2.4. OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE *B.pertussis* PARA A PRODUÇÃO DA VACINA PERTUSSIS.

Os processos de produção seguem as de terminações da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION³⁸, 1977) com algumas modificações.

2.4.1. Preparação do inóculo

As cepas liofilizadas foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de Bordet-Gengou e incubadas durante 96 horas em estufa a 35⁰C. Após este tempo, algumas colônias foram selecionadas, repicadas em outras placas contendo o mesmo meio, donde se obteve um crescimento maciço após 48 horas de cultivo a 35⁰C. Um terceiro repique foi realizado em tubo de ensaio inclinado com o meio Bordet-Gengou, permanecendo por 48 horas a 35⁰C.

O crescimento bacteriano obtido em cada tubo foi ressuspenso e transferido totalmente a um frasco Erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de meio de cultura líquido (Meio de Cohen-Wheeler) em agitação constante (agitador rotatório, 200 rpm) durante 20 a 24 horas a 35⁰C, donde foi obtido o inóculo para semeadura em Garrafas de Roux, Fermentadores e Agitadores.

2.4.2. Semeadura em Garrafas de Roux (cultivo estacionário)

O cultivo estacionário em Garrafas de Roux contendo o meio sólido de Holt, foi realizado transferindo-se 100 ml do inóculo para um Erlenmeyer de 1000 ml contendo 500 ml de meio de Cohen-Wheeler, o qual serve como veículo de semeadura para o meio sólido de Holt. Foram semadas 3 a 4 ml desta cultura em cada garrafa que

permaneceram em estufa a 35^oC durante 72 horas. O crescimento obtido após o período de incubação foi ressuspensado em salina fosfatada (pH 7.2), com solução de timerosal a 1/5.000.

Executou-se o controle de pureza da cultura por microscopia óptica, utilizando-se o método de coloração de Gram. O método de concentração foi realizado por centrifugação (3.000 rpm durante 90 minutos) e o sedimento ressuspensado em salina fosfatada (pH 7.2), com solução de timerosal a 1/5.000. A destoxificação foi feita à temperatura de 2 a 8^oC durante 3 meses.

2.4.3. Semeadura em Fermentadores (cultivo submerso)

O inóculo (100 ml) obtido foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 6.000 ml, contendo 1.500 ml de meio de Cohen-Wheeler e incubado a 35^oC por 20 a 24 horas (200 rpm), após o que, foram transferidos para os fermentadores (Biolafitte 78.600, Maison Lafitte, France), com capacidade de 50.000 ml, contendo 20.000 a 30.000 ml de meio de Cohen-Wheeler, num período de incubação de 30 a 36 horas a 35^oC a 300 rpm.

A concentração do cultivo foi feita por precipitação ácida com ácido cítrico 7N (MORA AYALA et alii²¹, 1981) até atingir pH 3,9 - 4,0. Este cultivo permaneceu em repouso durante 24 horas a 4^oC, sendo o sobrenadante removido através de sucção e o sedimento bac-

teriano ressuspensão em salina fosfatada ajustando a neutralidade com NaOH 5N. A destoxificação foi realizada pelo calor a 56°C por 30 minutos. Para a preservação adicionou-se timerosal na concentração final de 1/5.000.

2.4.4. Semeadura em Agitadores (cultivo submerso)

Para a semeadura em Agitadores, transferiu-se 100 ml do inóculo para um frasco Erlenmeyer de 6.000 ml, contendo 1.500 ml de meio de Cohen-Wheeler e incubado durante 30 a 36 horas a 35°C em agitação constante a 200 rpm em agitador rotatório (motor 250 volts; 1680 rpm; 0,3 CV; 60 HZ).

A concentração do cultivo e a destoxificação foi realizada como descrito no item 2.4.3.

2.5. CONTROLE DE QUALIDADE DAS SUSPENSÕES

Para controle de qualidade das suspensões obtidas pelos processos de Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador, os seguintes testes foram realizados segundo determinações da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION³⁹, 1982).

2.5.1. Teste de pureza

O controle da pureza da cultura, as-

sim como da suspensão destoxificada, foi realizado através de microscopia óptica utilizando-se o método de coloração de Gram.

2.5.2. Teste de identidade

A prova de identidade foi executada nas cepas, suspensões e vacinas, através de antissoros específicos fornecidos pelo N.I.H., contendo os aglutinógenos 1, 2 e 3. Colocou-se 1 gota de suspensão diluída a 50 unidades opacimétricas (UO), com uma gota de soro específico em uma lâmina de microscopia óptica. Agitou-se levemente. Rápida e forte aglutinação foi observada no espaço de 3 minutos.

2.5.3. Teste de esterilidade

A esterilidade foi realizada em meio específico para o desenvolvimento de *B. pertussis* (para testar viabilidade), em meio sólido de Sabouraud a 25°C durante 15 dias, e meio líquido de tioglicolato a 25°C e a 37°C por 15 dias.

2.5.4. Teste para determinação da concentração bacteriana

Esta prova foi executada num período inferior a 15 dias após a preparação da suspensão.

A concentração bacteriana foi estimada por comparação fotométrica com padrão turbidimétrico de Referência Internacional de Preparação de Opacidade fornecida pelo National Institute of Health.

Atribui-se a este padrão um valor de 10 UO, quando examinado fotometricamente com comprimento de onda de 530 nm. Tal grau de opacidade corresponde aproximadamente a 10×10^9 bactérias/ml.

2.5.5. Teste de toxidez

O teste de toxidez foi feito a partir de uma amostra de suspensão diluída em solução salina a 0,85%, contendo 10 UO.

Foram inoculados 10 camundongos, por via intraperitoneal, com 0,5 ml desta suspensão diluída, e o peso destes animais foi avaliado, antes da inoculação, 24 horas, 72 horas e 7 dias após. O mesmo procedimento de avaliação foi utilizado com animais controles que foram inoculados intraperitonealmente com 0,5 ml de solução salina a 0,85% contendo timerosal na diluição de 1/5.000.

A suspensão ou vacina foi considerada atóxica desde que:

a) Após 72 horas o peso total do grupo não foi inferior ao peso inicial à inoculação.

b) No final de 7 dias o ganho de peso médio por camundongo não foi inferior a 3 g ou o aumen-

to médio de peso por camundongo não foi inferior a 60% do peso do grupo controle.

c) Não ocorrer mais de 5% de mortes no total do número de camundongos inoculados por caixa.

2.5.6. Teste de potência

O poder imunizante da vacina foi determinado pelo método contido no Minimal Requirements for Pertussis Vaccine (U.S.NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH³⁴, 1968), e os resultados calculados pelo procedimento de Worcester-Wilson (WORCESTER & WILSON³⁷, 1943; U.S.NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH³³, 1956).

2.5.6.1. Imunização

Para cada suspensão a ser testada os camundongos foram separados em lotes, assim distribuídos: 3 lotes de 20 animais para a imunização com a vacina padrão (N.I.H.), 3 lotes com o mesmo número de animais para a imunização com a vacina em exame e 4 lotes de 10 camundongos para a prova de virulência.

Foram feitas 3 diluições em série da vacina ou suspensão em exame e da vacina padrão com razão de 5, a fim de ser obtida a dose efetiva mediana (DE_{50}), ou seja, a dose que confere proteção a cerca de 50% dos animais.

De cada diluição foram inocula-

dos 0,5 ml, por via intraperitoneal, nos camundongos dos lotes utilizados para imunização com a vacina padrão e com a vacina em exame.

2.5.6.2. Inoculação da cultura virulenta

A inoculação da cultura virulenta, por via intracerebral, foi feita 14 a 17 dias após as imunizações, com a cepa liofilizada nº 18.323, obtida após repique em meio de Bordet-Gengou durante 48 horas a 35°C. Um segundo repique de 24 horas foi realizado, o qual foi utilizado para a inoculação.

A concentração da cultura virulenta, após prova de pureza, foi determinada em fotômetro, com comprimento de onda de 530 nm, de maneira a conter 10 UO (10×10^9 organismos/ml). Esta suspensão foi diluída com ácido casamínico a 1% e o intervalo entre o preparo da suspensão virulenta e a sua inoculação não excedeu 2 horas e 30 minutos.

A dose teste a ser inoculada em todos os lotes de camundongos das vacinas (padrão e em exame), corresponde a 1:3000 da concentração inicial, sendo que cada camundongo recebeu 0,03 ml da dose por via intracerebral. Apenas 16 camundongos foram considerados para cada lote de diluição.

O lote de 40 camundongos utilizado para o teste de virulência foi dividido em 4 grupos, que receberam as seguintes diluições de germes virulen-

tos: 1ª lote, dose teste; 2ª lote, 1/50 da dose teste; 3ª lote, 1/250 da dose teste; e, 4ª lote, 1/1250 da dose teste.

Todos os animais foram observados por um período de 14 dias, durante os quais anotou-se as mortes (os camundongos que apresentaram paralisia ou tumefação ao nível da cabeça, foram considerados como "mortos" na avaliação da vacina).

2.5.6.3. Avaliação do poder imunizante

Ao final da observação de 14 dias para a verificação da potência, quando foram registrados o número total de sobreviventes e de mortos, nas diferentes diluições da vacina, aplicou-se o método de Worcester-Wilson para calcular as unidades de proteção por ml e o desvio padrão.

O valor da unidade protetora de uma vacina, sob teste, foi determinado na base dos valores relativos de DE_{50} desta vacina e da padrão. A dose efetiva foi calculada pela diferença entre o número de sobreviventes na maior e na menor dose, e o número total de sobreviventes. Para calcular as unidades de proteção por ml usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{unidade/ml} = \frac{DE_{50} \text{ vacina padrão}}{DE_{50} \text{ vacina teste}} \times n^{\circ} \text{ de U/ml vacina padrão}$$

2.5.6.4. Valor protetor exigido

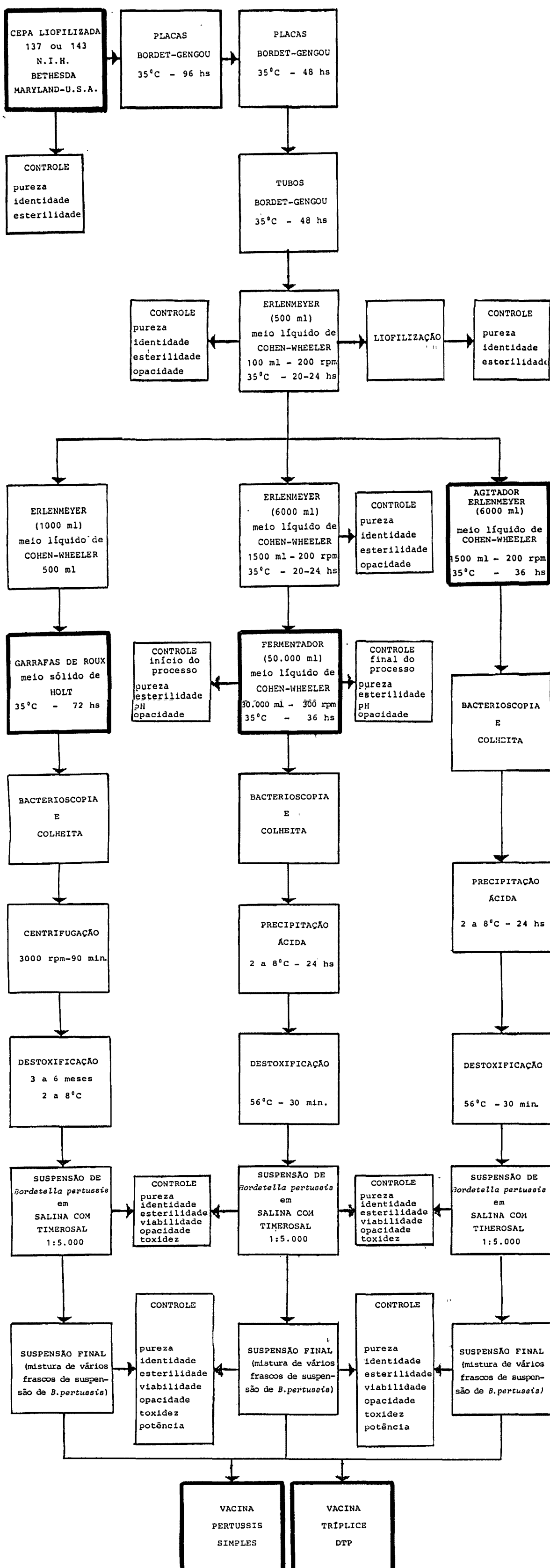
A potência de uma vacina é considerada satisfatória para a liberação, quando possui 12 unidades protetoras por dose total de imunização, sempre que o valor da unidade protetora, calculado para esta dose, não for menor que 8 e maior que 36 (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE³², 1980).

Este teste de proteção é realizado como prova prévia nos frascos de suspensão a serem utilizados na produção da vacina e no produto final.

2.6. FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DA VACINA PERTUSSIS

Para dar uma visão global e simplificada de produção da Vacina Pertussis, o fluxograma mostra as diferentes etapas de produção dos três processos (Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador).

FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE VACINA PERTUSSIS PELOS PROCESSOS TESTADOS



2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calcularam-se as médias aritméticas os desvios padrão e os coeficientes de variabilidade segundo MARASCUILLO¹⁸ (1971).

2.8. ANÁLISE ECONÔMICA

Quanto aos aspectos econômicos relativos à produção da Vacina Pertussis pelos três processos em questão, tão somente estarão sendo considerados, pela oportunidade e importância analítica deste trabalho, os pertinentes aos níveis de custo da matéria prima básica, ou seja, meios de cultura necessários.

A análise econômica global das alternativas industriais analisadas, transcende ao âmbito do presente trabalho.

Portanto, a análise econômica baseou-se nos cálculos do rendimento e eficiência dos processos de produção da Vacina Pertussis, considerando-se apenas o custo do meio de cultura empregado.

Para a eficiência foram obtidos os valores em Cruzeiro (Cr\$) dos meios de cultura.

Os valores, em Cruzeiro, por litro dos meios de cultura, foram calculados com base nos preços das drogas, de mão-de-obra e dos materiais de consumo empregados, relativamente ao início do 1º semestre de 1983*.

Assim temos:

- Meio sólido de Holt: Cr\$ 2.577,49
(dois mil, quinhentos e setenta e sete cruzeiros e quarenta e nove centavos).

- Meio de Cohen-Wheeler: Cr\$ 1.163,16
(hum mil, cento e sessenta e três cruzeiros e dezesseis centavos).

* Dados obtidos na Seção de Meios de Cultura do Serviço de Controle e Técnicas Auxiliares da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantan.

3. RESULTADOS

Para o processamento dos resultados foram computados os volumes totais de suspensão de *B. pertussis* aprovados nos testes de pureza, identidade, esterilidade, viabilidade e toxidez, correspondente a 89, 39 e 34 lotes de suspensão respectivamente para os processos de Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador.

Cada lote de cultura pura foi concentrado e submetido ao teste de opacidade a fim de se calcular o número de doses.

A determinação do número de doses após concentração da suspensão bacteriana de cada lote nos diferentes processos, foi obtido a partir do número de unidades opacimétricas (UO) e do volume (ml) da suspensão. Sabendo-se que 10 UO corresponde à unidade padrão para a obtenção de uma dose de vacina, fez-se a relação entre o total de unidades opacimétricas de cada lote e a unidade padrão para uma dose, cujo resultado é multiplicado pelo volume da suspensão bacteriana do mesmo lote.

Estes dados, referentes a cada processo e aprovados nos testes anteriormente citados, estão reunidos nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Vacina Pertussis, preparada pelo processo de Garrafa de Roux, segundo lote e condição, S.P., 1983.

Condição Lote nº	Vol. de cult. pura (ml)	Vol. de cult.após concent. (ml)	Unid.de Opacida de (UO)	Nº de doses da Vacina
1	24.750	400	769	30.769
2	36.300	300	1.250	37.500
3	33.450	300	1.666	50.000
4	37.650	300	2.000	60.000
5	41.100	300	2.500	75.000
6	37.800	300	1.666	50.000
7	29.250	200	1.666	33.333
8	38.700	350	2.000	70.000
9	33.150	150	2.000	30.000
10	33.600	250	1.666	41.666
11	28.500	250	1.666	41.666
12	26.700	150	1.538	23.077
13	39.000	300	2.000	60.000
14	37.650	300	2.000	60.000
15	26.850	250	909	22.727
16	30.600	250	1.000	25.000
17	33.750	250	769	19.231
18	33.600	350	833	29.166
19	38.250	230	1.250	28.750
20	27.450	250	1.250	31.250
21	30.000	250	1.111	27.777
22	29.100	250	909	22.727
23	35.250	250	1.000	25.000

Tabela 1 - (continuação)

Condição Lote nº	Vol. de cult. pura (ml)	Vol. de cult.após concent. (ml)	Unid.de Opacida de (UO)	Nº de doses da Vacina
24	33.750	250	1.250	31.250
25	19.800	150	1.428	21.428
26	37.050	250	1.250	31.250
27	31.050	200	1.000	20.000
28	36.450	300	1.250	37.500
29	35.850	300	1.000	30.000
30	37.950	500	833	41.666
31	36.150	400	1.666	66.666
32	32.850	400	909	36.363
33	30.000	300	833	25.000
34	31.500	350	769	26.923
35	33.000	250	1.111	27.777
36	37.500	380	833	31.666
37	38.850	250	2.000	50.000
38	35.400	200	2.500	50.000
39	37.800	200	1.250	25.000
40	37.050	200	1.250	25.000
41	35.550	300	1.000	30.000
42	37.500	200	1.111	22.222
43	40.950	400	3.333	133.333
44	38.400	200	1.000	20.000
45	29.700	180	1.111	20.000
46	36.750	180	2.000	36.000
47	32.850	250	1.000	25.000
48	38.700	500	1.250	62.500
49	36.450	200	2.500	50.000
50	35.250	500	666	33.333

Tabela 1 - (continuação)

Condição Lote nº	Vol. de cult. pura (ml)	Vol. de cult.após concent. (ml)	Unid.de Opacida de (UO)	Nº de doses da Vacina
51	33.000	400	714	28.571
52	32.700	250	833	20.833
53	36.900	250	909	22.727
54	32.250	250	909	22.727
55	28.500	250	526	13.157
56	33.900	250	1.250	31.250
57	37.200	200	1.428	28.571
58	34.350	300	1.428	42.857
59	36.450	350	1.250	43.750
60	34.350	350	1.111	38.888
61	33.600	200	1.111	22.222
62	34.800	200	1.111	22.222
63	36.450	400	833	33.333
64	38.700	600	833	50.000
65	33.600	250	769	19.230
66	40.050	300	1.250	37.500
67	37.800	300	1.111	33.333
68	20.700	250	714	17.857
69	37.800	250	1.666	41.666
70	34.050	400	714	28.571
71	32.100	300	1.000	30.000
72	22.800	200	555	11.111
73	36.300	250	1.250	31.250
74	39.000	300	1.666	50.000
75	39.150	300	1.666	50.000
76	28.500	150	1.666	25.000
77	37.050	200	1.666	33.333

Tabela 1 - (conclusão)

Condição Lote nº	Vol. de cult. pura (ml)	Vol. de cult.após concent. (ml)	Unid.de Opacida de (UO)	Nº de doses da Vacina
78	38.550	250	1.666	41.666
79	39.450	300	1.666	50.000
80	38.850	300	1.666	50.000
81	39.000	300	1.666	50.000
82	39.600	350	1.250	43.750
83	39.900	300	1.666	50.000
84	39.750	600	1.000	60.000
85	40.050	350	833	29.166
86	38.400	500	1.250	62.500
87	27.000	250	666	16.666
88	37.500	300	1.250	37.500
89	36.300	250	1.000	25.000
TOTAL	3.082.950	25.720		3.250.723

Tabela 2 - Vacina Pertussis, preparada pelo processo de Fermentador, segundo lote e condição, S. P., 1983.

Condição Lote nº	Vol. de cult. pura (ml)	Vol. de cult.após concent. (ml)	Unid.de Opacida de (UO)	Nº de doses da Vacina
1	26.000	3.500	143	50.000
2	23.500	2.000	125	25.000
3	25.800	3.000	200	60.000
4	23.000	2.000	200	40.000
5	21.700	3.000	200	60.000
6	23.200	2.000	244	48.780
7	23.500	1.500	167	25.000
8	24.500	2.700	167	45.000
9	25.500	2.000	182	36.363
10	25.000	2.000	200	40.000
11	23.000	1.100	118	12.941
12	21.000	2.000	200	40.000
13	21.000	3.000	200	60.000
14	23.000	2.000	270	54.054
15	23.000	1.600	233	37.209
16	22.000	2.100	286	60.000
17	25.000	2.100	357	75.000
18	23.400	2.200	250	55.000
19	24.500	2.500	175	43.859
20	22.000	2.500	233	58.139
21	23.500	2.000	222	44.444
22	23.200	1.100	91	10.000
23	23.000	3.000	192	57.692

Tabela 2 - (conclusão)

Condição Lote nº	Vol. de cult. pura (ml)	Vol. de cult.após concent. (ml)	Unid.de Opacida de (UO)	Nº de doses da Vacina
24	25.000	3.000	200	60.000
25	22.500	1.750	233	40.697
26	23.000	2.000	167	33.333
27	25.100	850	256	21.794
28	25.600	1.750	244	42.682
29	23.500	1.700	147	25.000
30	30.200	2.000	250	50.000
31	29.000	3.000	185	55.555
32	28.500	2.000	222	44.444
33	28.500	2.500	250	62.500
34	28.500	2.500	200	50.000
35	28.500	2.500	143	35.714
36	26.700	2.000	270	54.054
37	26.700	3.000	263	78.947
38	24.500	1.500	143	21.428
39	24.500	1.500	167	25.000
TOTAL	959.600	84.450		1.739.629

Tabela 3 - Vacina Pertussis, preparada pelo processo de Agitador, segundo lote e condição, S. P., 1983.

Condição Lote nº	Vol. de cult. pura (ml)	Vol. de cult.após concent. (ml)	Unid.de Opacida de (UO)	Nº de doses da Vacina
1	9.500	1.000	154	15.387
2	13.000	1.500	200	30.000
3	10.500	900	238	21.428
4	10.000	850	223	18.888
5	8.000	500	200	10.000
6	6.500	750	208	15.625
7	12.500	1.200	250	30.000
8	10.000	850	167	14.167
9	12.400	900	313	28.125
10	12.100	1.500	313	46.875
11	12.400	1.200	200	24.000
12	9.600	1.250	200	25.000
13	9.600	1.250	200	25.000
14	9.600	1.100	222	24.444
15	14.100	1.500	200	30.000
16	9.000	1.000	200	20.000
17	9.200	1.100	200	22.000
18	9.000	1.040	250	26.000
19	8.000	1.000	200	20.000
20	10.800	1.200	200	24.000
21	7.400	600	400	24.000
22	8.000	900	244	21.951
23	8.200	900	286	25.714

Tabela 3 - (conclusão)

Condição Lote nº	Vol. de cult. pura (ml)	Vol. de cult.após concent. (ml)	Unid.de Opacida de (UO)	Nº de doses da Vacina
24	8.800	900	278	25.000
25	7.500	625	200	12.500
26	9.200	700	313	21.875
27	7.800	600	333	20.000
28	8.000	1.200	91	10.909
29	7.500	1.500	128	19.231
30	6.200	800	227	18.182
31	5.400	325	270	8.763
32	4.600	600	223	13.333
33	12.000	1.500	142	21.428
34	14.000	1.500	200	30.000
TOTAL	320.100	34.240		743.845

Os lotes, assim obtidos, foram armazenados entre 2 a 8°C, aguardando a confirmação dos resultados dos testes usuais. Aqueles aprovados foram misturados, dando origem às partidas em número de 15, por processo, para serem submetidos posteriormente ao teste de potência.

3.1. DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA VACINA PERTUSSIS NOS DIFERENTES PROCESSOS DE PRODUÇÃO

De cada uma das 15 partidas aprovadas, obtidas em cada processo de produção, foi coletada uma alíquota para a realização do teste de potência, cujos valores encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de potência (UI/ml) da Vacina Pertussis, segundo partida e processo, S.P., 1983.

Partida	Processo		
	Garrafa de Roux UI/ml	Fermentador UI/ml	Agitador UI/ml
1	12.0	11.2	8.0
2	11.2	12.8	11.2
3	13.4	14.4	9.6
4	12.0	16.0	11.2
5	9.7	12.8	12.0
6	8.0	11.9	10.8
7	19.7	13.4	9.6
8	11.4	9.9	9.9
9	10.8	13.1	13.1
10	8.0	12.8	12.9
11	10.8	9.8	13.4
12	13.4	10.8	11.2
13	18.3	8.0	8.8
14	13.4	8.8	12.0
15	12.8	12.0	11.2

Com os dados de potência da Tabela 4, foram calculados a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variabilidade por processo (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores da média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variabilidade das potências dos três processos empregados, S.P., 1983.

PROCESSO	\bar{x}	s	C.V.
Garrafa de Roux	12,33	3,11	25,2
Fermentador	11,85	2,06	17,4
Agitador	10,99	1,52	13,8

\bar{x} = média aritmética

s = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variabilidade

3.2. AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DA VACINA PERTUSSIS

Para atender a este objetivo, foram considerados os volumes totais de meio de cultura pura e o respectivo número de doses de vacina.

O rendimento foi calculado pelo quociente entre o número de dose obtido e o volume de cultura pura, o qual foi designado pela letra Δ (delta), tendo sido calculado, individualmente, pelos processos empregados (Tabela 6).

Tabela 6 - Vacina Pertussis, segundo processo de preparo e condição, S.P., 1983.

PROCESSO \ CONDIÇÃO	Vol. de cult.pura (ml)	Nº de doses	Rendimento Δ
Garrafa de Roux	3.082.950	3.250.723	1,05
Fermentador	959.600	1.739.629	1,81
Agitador	320.100	743.845	2,32
Total	4.362.650	5.734.197	-

Complementarmente, calculou-se a relação entre o rendimento dos processos considerados 2 a 2 (Tabela 7).

Tabela 7 - Relação entre rendimentos da Vacina Pertussis pelos processos relacionados 2 a 2, S. P., 1983.

RELAÇÃO DOS PROCESSOS	RELAÇÃO DOS RENDIMENTOS
Agitador x Garrafa de Roux	2,21
Fermentador x Garrafa de Roux	1,72
Agitador x Fermentador	1,28

3.3. ESTUDO DA EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DA VACINA PERTUSSIS

Neste estudo de eficiência da Vacina Pertussis, estabeleceu-se a relação entre o custo e o benefício.

Conforme já nos referimos, por custo,

considerou-se os gastos em Cruzeiros (Cr\$) apenas do meio de cultura e por benefício, o número de doses obtido pelos diversos processos.

Considerou-se adequado avaliar o custo por dose de vacina e para tanto houve a necessidade de se calcular, inicialmente, o volume de meio de cultura por unidade de dose obtida pela relação entre o volume de meio (ml) utilizado e o número de doses obtido. Assim:

$$\text{Vol. meio de cult.de uma dose} = \frac{\text{Vol. total do meio (ml)}}{\text{Nº de doses obtido}}$$

Conhecido o custo de cada meio de cultura, como referido no capítulo de Material e Métodos, calculou-se o custo de meio de cultura por unidade de vacina, segundo os processos empregados (Tabela 8).

Tabela 8 - Custo de meio de cultura para uma dose de Vacina Pertussis, segundo processo de preparo e condição, S.P., 1983.

PROCESSO \ CONDIÇÃO	Vol.de meio/ dose (ml)	Custo do ml meio de cult. (Cr\$)	Custo de meio cult.para uma dose (Cr\$)
Garrafa de Roux	0,95	2,58	2,45
Fermentador	0,55	1,16	0,63
Agitador	0,43	1,16	0,49

Finalmente, verificou-se a relação entre as eficiências dos processos considerados 2 a 2 com o intento de se conhecer o número de vezes que um método é mais eficiente que outro (Tabela 9).

Tabela 9 - Relação entre eficiência da Vacina Pertussis pelos processos relacionados 2 a 2, S.P., 1983.

RELAÇÃO DOS PROCESSOS	RELAÇÃO ENTRE EFICIÊNCIA
Agitador x Garrafa de Roux	5,0
Fermentador x Garrafa de Roux	3,9
Agitador x Fermentador	1,3

4. DISCUSSÃO

A produção de Vacina Pertussis segundo três diferentes processos de produção (Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador) foi analisada segundo os critérios de proteção, rendimento e eficiência.

Como pode ser observado pelos resultados constantes da Tabela 4, todas as partidas, independentemente do processo utilizado, dosaram igual ou acima do padrão proposto pela Organização Mundial da Saúde, ou seja, 8 UI/ml (WORLD HEALTH ORGANIZATION³⁹, 1982).

O processo de produção em que foi utilizada a Garrafa de Roux, apresentou maior média expressa em unidades de proteção ($12,33 \pm 3,11$) que o Fermentador ($11,85 \pm 2,06$) e o Agitador ($10,99 \pm 1,52$) - Tabela 5. Por outro lado, o coeficiente de variabilidade entre os três processos foi menor para o Agitador (13,8%), seguido pelo Fermentador (17,4%) e Garrafa de Roux (25,2%) - Tabela 5. Estes dados estão de acordo com as referências de GALICIA et alii⁸ (1981), os quais verificaram que a média de potência era maior em cultivos estacionários que em fermentadores sendo, porém, a dispersão dos resultados maior no primeiro processo. Salientam que pelo fato do processo do fermentador apresentar menor variação em unidades de potência, permite programar e controlar adequadamente o processo de produção.

À semelhança da observação do referi-

do autor, os resultados obtidos na presente pesquisa revelaram menor variabilidade para o método do Agitador.

Por outro lado, estes dados não permitem concluir se um processo é melhor do que outro no que diz respeito à potência da vacina, uma vez que não existem dados que permitam avaliar se uma vacina que apresenta maior unidade de proteção, protege mais do que aquela com menor unidade de proteção. Assim, o significado epidemiológico da maior ou menor proteção da vacina ainda não é conhecido. Segundo ZAKHAROVA et alii⁴⁰ (1981), o grau de eficácia epidemiológica da vacinação varia muito, independente do número de unidades de proteção da vacina. Portanto, a importância prática do teste de proteção em camundongos é altamente convencional.

O rendimento dos três processos de produção da Vacina Pertussis foi analisado, estabelecendo-se relação entre o número de doses obtido e o volume de cultura pura. O melhor rendimento foi obtido pelo processo do Agitador ($\Delta = 2,32$), seguido pelo Fermentador ($\Delta = 1,81$) e Garrafa de Roux ($\Delta = 1,05$) - Tabela 6.

Calculando-se a relação entre o rendimento dos processos considerados 2 a 2, podemos observar que o Agitador produz 2,21 ($2,32/1,05$) vezes mais doses de vacina que o de Garrafa de Roux e 1,28 ($2,32/1,81$) vezes mais do que o Fermentador, enquanto que este produz 1,72 ($1,81/1,05$) vezes mais que o da Garrafa de Roux (Tabela 7).

Ao mesmo tempo, foi verificada a efi-

ciência dos processos de produção, onde se estabeleceu a relação entre o custo e o número de doses obtido pelos diversos processos.

Os resultados mostraram que, enquanto são necessários 0,43 ml de meio de cultura para produzir uma dose de vacina pelo processo do Agitador, o Fermentador necessita 0,55 ml e a Garrafa de Roux 0,95 ml (Tabela 8).

Com base nesta relação, pode-se verificar que o custo de meio de cultura para obtenção de uma dose de vacina pelo processo do Agitador é de Cr\$ 0,49 (quarenta e nove centavos), pelo Fermentador é de Cr\$ 0,63 (sessenta e três centavos) e pela Garrafa de Roux Cr\$ 2,45 (dois cruzeiros e quarenta e cinco centavos) - Tabela 8.

Estabelecendo-se a relação entre as eficiências dos processos considerados 2 a 2, verificou-se que o Agitador é 5,0 ($2,45/0,49$) vezes mais eficiente que a Garrafa de Roux e 1,3 ($0,63/0,49$) vezes mais eficiente que o Fermentador, enquanto que este é 3,9 ($2,45/0,63$) vezes mais eficiente que a Garrafa de Roux (Tabela 9).

Estes dados favorecem o processo do Agitador, em comparação com os outros, no que diz respeito ao rendimento e eficiência, uma vez que para se obter uma dose de vacina é necessário menor volume de meio de cultura e menor custo.

Ao analisarmos os rendimentos entre

os diversos processos de produção, não encontramos dados que pudessem justificar as diferenças apresentadas.

O menor rendimento da Garrafa de Roux talvez se deva ao crescimento bacteriano apenas na superfície do meio de cultura, bem como pela heterogeneidade entre as colheitas. Estes aspectos refletem-se, provavelmente, em prejuízos da produtividade em larga escala e, conseqüentemente, no maior custo de produção.

A literatura não faz referência sobre os rendimentos entre os dois processos que utilizam cultivos submersos (Agitador e Fermentador).

Estes dois processos caracterizam-se por utilizar o mesmo meio de cultura e mesma concentração de inóculo, diferindo porém no que se refere à formação de espuma e aeração da cultura.

Assim, no Fermentador conseqüente à turbulência observa-se a formação de grande quantidade de espuma a despeito de se incorporar anti-espumante na concentração de 0,9 ml/25 litros e que, segundo GÓMEZ REYES & MEDINA GARCIA¹⁰ (1981), arrastaria o crescimento bacteriano para a superfície do meio, provocando a formação de grumos que seriam os responsáveis pelo baixo desenvol^lvimento bacteriano.

GÓMEZ REYES & MEDINA GARCIA¹⁰ (1981) recomendam, ainda, a introdução de modificações nos equipamentos que impeçam a turbulência e dispensem a adição de anti-espumante. Com estas alterações, os autores conseguiram elevar de 2 a 3 vezes o rendimento expresso em

unidades de opacidade/ml.

A impossibilidade de se controlar a aeração do meio de cultura do Fermentador, nas nossas condições, talvez seja um outro fator responsável pela quebra do rendimento do processo.

Confrontados os três processos de produção da vacina, verificou-se que, embora o Agitador tivesse conferido menor média de potência comparativamente aos outros dois processos, a variabilidade dos resultados entre as diversas partidas foi menor e o rendimento e eficiência foram superiores.

Além destes aspectos, o Agitador oferece algumas vantagens: ausência de espuma durante o processo da agitação; dispensa a aeração forçada; a manipulação e manutenção são fáceis, pois exige uma infraestrutura bastante simples, com pequeno risco de contaminação que concorrem para o elevado rendimento do método. Como desvantagens podemos citar principalmente a heterogeneidade dos cultivos em função do número de frascos Erlenmeyer para o cultivo.

O Quadro 1 mostra, resumidamente, as vantagens e desvantagens dos três processos analisados.

Q U A D R O 1

CARACTERÍSTICAS PROCESSO	V A N T A G E N S	D E S V A N T A G E N S
GARRAFA DE ROUX	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vacina com maior potência 2. Não há necessidade de infraestrutura 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Manipulação prolongada 2. Riscos de contaminação 3. Grande heterogeneidade de cultivos 4. Baixo rendimento 5. Maior volume de mão-de-obra 6. Custo elevado do meio de cultura e garrafas
FERMENTADOR	<ol style="list-style-type: none"> 1. Elevado rendimento 2. Controle rigoroso de variação de pH, temperatura e crescimento 3. Menor volume de mão-de-obra 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Perda total do cultivo em caso de contaminação 2. Necessidade de instalações apropriadas (infraestrutura adequada) 3. Serviço de manutenção constante do equipamento e instalações (não permite interrupção no fornecimento de vapor, ar comprimido ou água) 4. Adição de anti-espumante 5. Custo elevado do equipamento e manutenção
AGITADOR	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fácil manutenção 2. Fácil manipulação 3. Não utilização de anti-espumante 4. Menor volume de mão-de-obra 5. Pequeno risco de contaminação 6. Não há necessidade de infraestrutura 7. Elevado rendimento e menores custos 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Frascos grandes e pequeno volume de meio 2. Heterogeneidade de cultivos

Com base em todos os aspectos constantes dos resultados e do Quadro 1, é de se considerar a indicação deste último método na elaboração de Vacina Pertussis. Obviamente, os resultados ora encontrados são um incentivo a que se prossiga com os estudos concernentes à produção da referida vacina em quantidade cada vez maior a custo cada vez menor, a fim de atender à demanda do país.

5. CONCLUSÕES

Após a realização da análise comparativa quanto à produção da Vacina Pertussis pelos processos de Garrafa de Roux, Fermentador e Agitador, em relação à potência, rendimento e eficiência, parece lícito concluir que:

1. QUANTO À POTÊNCIA

- Todos os processos analisados dosaram igual ou acima do padrão proposto pela Organização Mundial da Saúde, ou seja, 8 UI/ml.

- O processo de Garrafa de Roux apresentou maior média em unidades de potência (12,33) em comparação ao Fermentador (11,85) e Agitador (10,99).

- O desvio padrão e o coeficiente de variabilidade da potência foram menores para o Agitador, demonstrando sua maior uniformidade metodológica.

2. QUANTO AO RENDIMENTO

- O maior rendimento foi obtido pelo processo do Agitador.

3. QUANTO À EFICIÊNCIA

- A eficiência demonstrou ser maior quando se utiliza o processo do Agitador.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BORDET, J. & GENGOU, O. Le microbe de la coqueluche. Ann.Inst.Pasteur, Paris, 20:731-41, 1906.
2. BROOKS, G.F. & BUCHANAN, T.M. Pertussis in the United States. J.Infect.Dis., 122:123-5, 1970.
3. CASTILLEJOS CARMONA, C.R. & GONZÁLEZ PACHECO, M. Evaluación de cepas de *Bordetella pertussis* utilizadas en la producción de vacuna antipertussis en cultivo estacionario. Salud púb.Méx., 23:549-53, 1981.
4. COCKBURN, C.W. Vacinar e proteger a criança. A saúde do mundo (OMS), fev./mar., 1977.
5. COHEN, S.M. & WHEELER, M.W. Pertussis vaccine prepared with phase-I cultures grown in fluid medium. Amer.J.Publ.Hlth., 36:371-6, 1946.
6. COMITÉ OMS D'EXPERTS DE LA STANDARDISATION BIOLOGIQUE. Normes relatives au vaccin anti-coquelucheux. 30ème rapport. Org.mond.Santé Ser. Rapp. tech., nº 638, 1979.
7. ELDERING, G.; HOLWERDA, J.; BAKER, J. Mouse protective properties of *Bordetella pertussis* serotypes in passive tests. J.Bact., 93:1758-61, 1967.

Abreviações dos títulos das revistas conforme: World Medical Periodicals, London, 1961.

8. GALICIA, O.; VILLALVA, H.; PÉREZ, A. Estudio comparativo de la potencia del componente pertussis en la vacuna DPT producido en cultivo estacionario y de fermentación. Salud p^ub.Méx., 23:607-11, 1981.
9. GOLDNER, M.; JAKUS, C.M.; RHODES, H.K.; WILSON, R.J. The amino acid utilization by phase - I *Bordetella pertussis* in a chemically defined medium. J.gen.Microb., 44:439-44, 1966.
10. GÓMEZ REYES, I. & MEDINA GARCIA, A. Estudios iniciales para el desarrollo de procesos en la producción de vacunas bacterianas por cultivo agitado. Salud p^ub.Méx., 23:555-62, 1981.
11. HORNIBROOK, J.W. Cultivation of phase-I *H.pertussis* in a semisynthetic liquid medium. Publ.Hlth.Rep., (Wash.), 54:1847-51, 1939.
12. KENDRICK, P.L.; ELDERING, G.; DIXON, M.K.; MISHER, J. Mouse protection test in study of Pertussis vaccine. Comparative series using intracerebral route for challenge. Am.J.Publ.Hlth., 36:803-10, 1947.
13. KINDT, H. & KÖRNER, L. Improving the pertussis mouse protection test by growing the challenge culture on Holt's solid medium. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL ASSAY METHODS, London, 1967. Symp.Ser.immunob.Stand., Basel, Karger, 1969. v.10, p.29-32.
14. KRUGMAN, S. & WARD, R. Pertussis (whooping-cough). In: Infectious disease of children, 6th.ed., Saint-Louis, C.V.Mosby, 1977. p.206-15.

15. LANE, A.G. Use of glutamic acid to supplement fluid medium for cultivation of *Bordetella pertussis*. Appl.Microbiol., 19:512-20, 1970.
16. MADSEN, T. Vaccination against whooping-cough. J. Am.med.Assoc., 101:187-8, 1933.
17. MARASCUIILLO, L.A. In: Statistical methods for behavioral science research. New York, McGraw Hill, 1971. p.173-200.
18. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Vaccination against whooping-cough. Relation between protection in children and results of laboratory tests. Brit. med.J.; 2:454-62, 1956.
19. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Vaccination against whooping-cough. Brit.med.J., 12:994-1000, 1959.
20. MEDINA GARCIA, A.; MARTÍN ESCOBAR, T.A.; REYES, E. T. Estudio comparativo de los medios de cultivo HBP-2 y FGP-1 en la producción de *Bordetella pertussis* por fermentación. Salud pùb.Méx., 23:575-84, 1981.
21. MORA AYALA, T.A.; RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, H.; LEMOS PASTRANA, A. Concentración de vacuna pertussis con ácido cítrico. Salud pùb.Méx., 23:585-9, 1981.
22. MUDD, S. In: Infections agents and host reactions. London, W.B.Sauders, 1970. p.239-65.
23. MURATA, R.; PERKINS, F.T.; PITTMAN, M.; SHEIBEL, I.; SLADKY, K. International collaborative studies on the Pertussis vaccine potency assay. Part played by the challenge in the mouse-protection test. Bull.Wld.Hlth.Org., 44:673-87, 1971.

24. PRESTON, N.W. Effectiveness of pertussis vaccine. Brit.med.J., 2:11-3, 1965.
25. PRESTON, N.W. Potency tests for pertussis vaccine: doubtful value of intracerebral challenge test in mice. J.Path.Bact., 91:173-9, 1966.
26. PRESTON, N.W. & EVANS, P. Type-specific immunity against intracerebral pertussis infection in mice. Nature, London, 197:508-9, 1963.
27. PRESTON, N.W. & TE PUNGA, W.A. The relation between agglutinin production by pertussis vaccines and their immunising potency in mice. J.Path.Bact., 78:209-16, 1959.
28. PUSZTAI, Z.; JOÓ, I.; JUHÁSZ, V.P. Immunogenic properties of liquid shaken *Bordetella pertussis* culture. Z.Immun.forschg.und Exp.Ther., 122: 278-90, 1961.
29. RECAMIER, L.; MEDINA, A. ; RODRIGUEZ, H. Desarrollo de un proceso de fermentación en la producción de vacuna pertussis. Salud púb.Méx., 23:563-73, 1981.
30. STAINER, D.W. & SCHOLTE, M.J. A simple chemically defined medium for the production of phase-I *Bordetella pertussis*. J.gen.Microb., 63:211-20, 1971.
31. U.S.DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. Biological Products Title 42, Part 73, revised May 1968. Public.Health Service Publication, nº 437, 1968 (Bethesda, Md).

32. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE.
Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations: food and drugs 21. Parts 600 to 799. Revised April 1, 1980. Washington, D.C., 1980. p.57.
33. U.S. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Application of the method proposed by Wilson and Worcester for determining the ED_{50} to the evaluation of the potency of pertussis vaccine. Bethesda, Maryland, 1st. Revision, October 11, 1956.
34. U.S. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Minimum Requirements for Pertussis Vaccine. Revised June 1968. Bethesda, Maryland, 1968.
35. VAN HEMERT, P. Vaccine production as a unit process. [Thesis doctoral] Rijks. Instituut voor de Volksgezondheid. Vaccine Department, Bilthoven, The Netherlands, 1971.
36. VERWEY, W.F. & SAGE, D.N. An improved culture medium for the growth of *B. pertussis*. J. Bact., 49:520-5, 1945.
37. WORCESTER, J. & WILSON, E.B. A table determining LD_{50} for the fifty percent end-point. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 29:207-12, 1943.
38. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual for the production and control of vaccines. Pertussis vaccine BLG/UNDP/77.3. Rev. 1, 1977.
39. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual of details of tests required on final vaccines used in the WHO expanded programme of immunization. BLG/UNDP/82.1, 1982.

40. ZAKHAROVA, M.S.; MALIVANOVA, O.M.; SOKOLOVSKAYA, A.D.; SHAVROVA, E.N.; KAPUSTIK, L.A. The results of study of pertussis component of DPT vaccine produced in USSR and some other countries. J.Hyg.Epidem., Praha, 25:439-48, 1981.