MARTHA MARIA MUTTI PEREIRA

Ø

EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DA VACINA TRÍPLICE
AO BCG

Tese apresentada à Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de
São Paulo, Departamento de Práti-
ca de Saúde Pública, para obten-
ção do título de "Doutor em Saú-
de Pública".

Orientador: Prof. Dr. JOÃO PESSOA DE PAULA CARVALHO

SÃO PAULO
1.985

RESUMO

A eficácia da associação quádrupla (DPT + BCG) foi estudada através da proteção e comparação da soro conversão das vacinas, usando como adjuvante o hidróxido de almínio e ou BCG.

A potência da vacina pertussis foi avaliada pelo teste de proteção em camundongos e o BCG pelo teste de consumo de oxigênio e de vitalidade, sendo considerada satisfatória. Sendo os toxóides diftérico e tetânico considerados proteínas inertes e estáveis, suas potências não foram determinadas depois de associadas.

Os níveis de anticorpos foram determinados para difteria e tétano pela reação imunoenzimática, para vacina pertussis pela reação de imunofluorescência e para o BCG pela conversão tuberculínica. Os níveis de conversão foram satisfatórios, revelando ser possível a associação sem prejuízo para nenhum dos antígenos.

A associação DPT + BCG não causou reação local ou geral significativa, possibilitando uma simplificação operacional.

SUMMARY

The efficacy of the quadruple association (DPT + BCG) was studied through protection and comparison of the conversion serum in vaccines using aluminium hydroxide or BCG as adjuvant.

Both the protection power of the Pertussis vaccine evaluated by the protection test in mice and BCG by the oxygen uptake and counts of viable particles were considered satisfactory. Being difteria and tetanus toxoids considered inert and stable proteins, their protection wasn't determined after their combination.

The antibody levels produced by the antigens were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay to the difteria and tetanus toxoids, by the fluorescent antibody technique to the Pertussis vaccine and by the tuberculin conversion to the BCG. The conversion levels were satisfactory and there was no damage in their association.

There was no meaningful local or general reaction in this association making an operational simplification possible.

INDICE

1. INTRODUÇÃO -----	01
1.1. Generalidades -----	01
1.1.1. Difteria -----	04
1.1.2. Tetano -----	06
1.1.3. Coqueluche -----	08
1.1.4. Tuberculose -----	17
1.2. Adjuvantes -----	22
1.3. Vacinas Associadas -----	29
1.4. Esquemas de Vacinação -----	33
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	41
2.1. Vacinas -----	41
2.2. Determinação da potencia das vacinas -----	43
2.2.1. Verificação da potência dos toxóides diftêri co e tetânico -----	44
2.2.2. Verificação da potência da fração pertussis	44
2.2.2.1. Imunização -----	44
2.2.2.2. Inoculação da dose desafiante -----	45
2.2.2.3. Determinação das unidades protetoras-----	46
2.2.3. Verificação da potência da vacina BCG -----	46
2.2.3.1. Prova de vitalidade -----	47
2.2.3.2. Prova de consumo de oxigênio -----	47
2.3. Imunização -----	48
2.3.1. Primeiro experimento -----	48
2.3.2. Segundo experimento -----	50
2.3.3. Determinação de resposta imune nos cobaios--	50

2.3.3.1. Teste imunoenzimático para a fração dif- térica -----	50
2.3.3.2. Teste imunoenzimático para a fração tetā nica -----	53
2.3.3.3. Imunofluorescência indireta para a fração pertussis -----	55
2.4. Análise Estatística -----	57
3. RESULTADOS -----	62
4. DISCUSSÃO -----	73
5. CONCLUSÃO -----	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades

A idéia da doença produzir imunidade surgiu de de a remota antigüidade, quando o povo passou a reconhecer - cer que os sobreviventes a uma doença infecciosa raramente tinham possibilidade de contraí-la outra vez.

Em 1733, VOLTAIRE escreve sobre o velho costume chinês do século XV, para a profilaxia da varíola, de aspiração nasal do p^o obtido pela secagem de pústulas variolosas. Porém, somente no século XVII, EDWARDS JENNER começa a vacinação antivariólica. (FARHAT²², 1935).

PASTEUR inaugurou a era moderna das vacinas, de mostrando que carneiros poderiam ser protegidos contra o B.anthraxis, quando inoculados previamente com vacina bacteriana específica. Mais tarde, vacinas produzidas com outros microorganismos, foram inoculadas no homem como medida de prevenção (BENENSON⁴, 1970).

Na maioria dos países em desenvolvimento, os ô-bítos são em grande parte devidos a doenças infecciosas e parasitárias e estão intimamente ligados a precárias condições sócio-econômicas. Aproximadamente, um décimo da vida do cidadão médio, nesses países em desenvolvimento, é gravemente perturbada por doenças. As doenças parasitárias em particular, são endêmicas e com caráter crônico e debilitante nas regiões pobres. As doenças infecciosas que o

correm na infância, preocupam as autoridades sanitárias , embora elas não constituam problema nos países desenvolvidos. Essas doenças poderiam ser evitadas pela imunização de 80 milhões de crianças que nascem, cada ano nos países em desenvolvimento. Isto porém não ocorre porque menos de 10% são vacinados (ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTE⁵⁵ , 1981).

As vacinas são derivadas de agentes patogênicos modificados, para se tornarem inofensivos, mas conservam suas propriedades imunogênicas. As vacinas podem ser: atenuadas (vacinas vivas), inativadas (vacinas mortas) ou fracionadas (vacinas químicas ou frações antigênicas).

As vacinas são administradas, geralmente, pela via parenteral, porém outras vias podem ser usadas. A imunidade provocada artificialmente procura reproduzir e substituir a imunidade adquirida naturalmente.

Sabe-se que vários fatores podem interferir na eficácia de uma vacina, tais como: o método de preparação e preservação, a estrutura química do antígeno, a presença e concentração de adjuvantes e a via e esquema de imunização.

O controle das doenças não depende somente da eficácia da vacina, mas também do seu nível de aceitação pela população, para que uma alta proporção de pessoas seja imunizada (BENENSON⁴, 1970).

Nos últimos anos as vacinações constituem um dos aspectos mais positivos da medicina, na prevenção das doenças, destacando-se, não somente a sua eficácia, mas também o seu custo e rentabilidade. A este respeito resalta-se a erradicação da varíola no mundo, a diminuição de morbidade e mortalidade de muitas doenças e o quase desaparecimento da poliomielite, difteria e tétano nos países industrializados.

Atualmente, pesquisas estão em desenvolvimento e novas e aperfeiçoadas vacinas estão surgindo, graças aos conhecimentos adquiridos em relação ao mecanismo e cronologia da resposta imunitária e aos adjuvantes de imunidade. Outros processos referem-se a identificação dos antígenos vacinantes, aos novos métodos de preparação, purificação do antígeno, manipulação genética e possivelmente, síntese antigênica.

O maior problema atualmente é tornar o benefício da vacinação mais disponível à humanidade e não restringi-lo a países privilegiados. As vacinas são muitas vezes, inacessíveis nos países desfavorecidos, onde se estima que é preciso imunizar cerca de 80 milhões de crianças nascidas a cada ano. Sabe-se que é um dos objetivos da Organização Mundial da Saúde, vacinar todas as crianças do mundo contra difteria, tétano, coqueluche, sarampo, tuberculose e poliomielite (ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTE⁵⁵, 1981).

Realmente, estas enfermidades devem merecer toda atenção das autoridades sanitárias, tendo em vista os danos que as mesmas têm causado às populações infantis nos países em desenvolvimento.

Como este trabalho tem por objetivo contribuir para o estudo da eficácia da associação da vacina triplíce ao BCG, inicialmente serão feitos alguns comentários sobre a difteria, o tétano, a coqueluche, a tuberculose, os adjuvantes, as vacinas associadas e os esquemas de vacinações, que certamente deverão ser considerados.

1.1.1. Difteria

Durante os séculos XVI e XVIII, diversas epidemias de difteria atingiram a Europa, principalmente a Espanha, Itália e França. (BARROS et alii³, 1985).

Após o isolamento do bacilo Corynebacterium diphtheriae por KLEBS e em cultura pura por LOEFFLER no final do século XIX, inúmeras descobertas vieram contribuir para o conhecimento sobre a infecção e as características do agente etiológico.³

ROUX e YERSIN em 1888 identificaram a exotoxina responsável pelas manifestações clínicas da doença e VON BEHRING e KITASATO em 1890 demonstraram que a toxina diftérica induzia a formação da antitoxina em cobaias. (BIER⁶, 1975).

VON BEHRING inoculando toxina neutralizada pela antitoxina em animais e no homem, verificou que os indivíduos em estudo apresentavam proteção contra a difteria. Porém foi RAMON quem verificou que a toxina tratada pelo formol perdia o poder tóxico mas mantinha o poder antigênico, e desde então o seu método tem sido a base para o preparo da vacina empregada como imunoprolático para a difteria. (Barros et alii³, 1985).

SHICK em 1913, descreve o teste intradérmico para avaliação da imunidade, conhecido como teste de SHICK. (BIER⁶, 1975).

Em população não vacinada, a difteria é endêmica, e as vezes epidêmica. A incidência é da ordem de 25 a 100 casos por 100.000 habitantes, observada sobretudo em crianças de 6 meses a 15 anos. As crianças de 1 a 5 anos de idade são as mais atingidas e representam o principal reservatório do agente etiológico. O adulto é protegido em 90% dos casos, podendo isto ser demonstrado pelos níveis de antitoxina diftérica obtidos no seu soro (0,05 UI/ml), através de provas de neutralização em cobaio, ou pela negatização da reação de SHICK. O recém nascido tem imunidade materna que o protege até 9 meses de idade. (REY⁶⁷, 1980).

Na maioria dos países no norte da Europa, a doença está praticamente erradicada desde 1960. Na Inglaterra está reduzida a 0,1 caso por 100.000 habitantes⁶⁷.

Verifica-se uma tendência decrescente da incidência de difteria na maioria dos países desenvolvidos. Quanto ao Brasil, a incidência é ainda alta. A doença predomina nos primeiros anos de vida, havendo diminuição de incidência no jovem e adulto, devido a imunidade natural. No período compreendido entre 1977 e 1981 houve um declínio de 50% no número de casos e também, diminuição da taxa de mortalidade (BARROS et alii³, 1985).

1.1.2. Tétano

O tétano é conhecido desde os primórdios da história da medicina, porém NICOLAIER em 1834 foi quem associou a doença a uma bactéria por ele isolada do solo e denominada desde há muitos anos Clostridium tētani (TAKANO⁷⁷, 1984). É uma espécie bacteriana produtora de uma potente exotoxina, descoberta por KNUD FABER e é a responsável pelo surgimento da sintomatologia da doença. Por outro lado a antitoxina tetânica foi descoberta por VON BEHRING e KITASATO. (RELEVELD⁶⁴, 1984).

Em 1909, LOEWENSTEIN estudou a ação do formol sobre a toxina tetânica. RAMON estandardizou o procedimento de preparação da anatoxina tetânica, empregando um método envolvendo o tratamento da toxina pelo formaldeído. Este método é atualmente usado na preparação do toxóide tetânico, que constitui a vacina contra o tétano. (BIER⁵, 1975).

O tétano está relacionado a fatores sôcio-econômicos e ecológicos. O número de casos fatais no mundo é estimado em 1 milhão e mata cerca de 140 vezes mais em países pobres que nos ricos. Nos países industrializados a mortalidade é menor que 0,1 por 100.000, e em alguns países, o tétano tornou-se curiosidade médica. Nos Estados Unidos o número de casos relatados desde 1976 a 1982 não tem variado e as ocorrências refletem a inadequadas coberturas da população idosa na maioria dos casos, entre as pessoas de mais de 60 anos. (RELYVELD,⁶⁴ 1984).

Nos países em desenvolvimento casos de tétano em recém-nascidos são devidos a inadequados cuidados obstétricos, podendo produzir níveis de letalidade da ordem de 60 a 90%.⁶⁴

Na Europa o tétano tem se tornado raro, com exceção de alguns países, como a França, que como nos Estados Unidos, o problema se apresenta em pessoas com mais de 50 anos. Neste país, a proteção vacinal, em pessoas idosas, é fraca, mostrando fraca evidência de vacinação recente.⁶⁴

Atualmente, a extensão e magnitude do tétano do recém-nascido tem se revelado mais claramente, sendo esta doença um problema sério de Saúde Pública nos países em desenvolvimento. Mais de 90% das mortes por tétano neonatal ocorrem nas duas primeiras semanas de vida (GALASKA & COOK²⁹, 1984).

A mortalidade por tétano neonatal deverá servir como indicador da qualidade e utilidade dos serviços de saúde materna, do impacto dos programas de imunizações e no progresso em atingir a meta "Saúde para todos no ano 2000", proposta pela Organização Mundial da Saúde. (GALASKA & COOK,²⁹ 1984).

VERONESI⁸⁴ (1984) comenta que a maioria dos habitantes do terceiro mundo tem imunidade naturalmente adquirida contra a toxina tetânica. Segundo o autor este estado de imunidade resulta dos esporos de tétano presentes nos alimentos e no meio ambiente e que podem germinar no intestino do homem e de animais produzindo toxina tetânica que induzirá as células imunológicas a elaborarem a antitoxina tetânica específica.

A melhoria das condições sócio-econômicas e culturais das populações e a introdução de programas de educação em saúde, particularmente, quanto aos cuidados obstétricos, têm contribuído para uma significativa redução de incidência do tétano nos países em desenvolvimento. Entretanto morrem ainda cerca de 1 milhão de indivíduos por ano por tétano, especialmente o neonatal, apesar da doença poder ser prevenida através da imunização (FOCACCIA et alii²⁴, 1985).

1.1.3. Coqueluche

A coqueluche, causada pela Bordetella pertussis é uma infecção exclusivamente humana que acomete princi -

palmente crianças. Através da doença produz-se um estado imunitário duradouro, porém a imunidade transmitida pela mãe é insuficiente para proteger o recém-nascido. Em uma população não vacinada, a coqueluche se apresenta como uma infecção quase obrigatória em crianças. A incidência de casos clínicos atinge uma proporção que pode ser de 500 a 1.000 por 100.000 habitantes e a maioria dos casos é representada por crianças com menos de 5 anos de idade. O grupo de alto risco, que deve ser protegido com prioridade, são as crianças de 0 a 12 meses. A incidência, precocidade, e gravidade da coqueluche são aumentadas por fatores sócio-econômicos desfavoráveis (REY⁶⁸, 1980).

Nos países industrializados, a coqueluche tem regredido consideravelmente, quanto a sua frequência e gravidade, porém, nos países em desenvolvimento a incidência e a mortalidade permanecem ainda elevadas. Segundo estimativa da OMS a coqueluche causa, anualmente, milhões de óbitos em crianças sobretudo nos países desfavorecidos⁶⁸.

Desde 1942, na Inglaterra tem sido realizados pelo Comitê do Conselho de Pesquisas Médicas, investigações para avaliar a eficácia da vacina contra a coqueluche. Nestes estudos, ensaios conduzidos de forma bem controlada nenhuma diferença foi observada na incidência ou severidade da doença entre os grupos vacinados e não vacinados. Porém, os estudos realizados nos Estados Unidos e Canadá indicam que a vacina contra a coqueluche produz um grau de proteção significativa. O primeiro resultado de im

portância foi observado em duas epidemias ocorridas na ilha Faroe. Na primeira, a vacinação foi feita durante a epidemia e não houve efeito sobre a incidência, embora tenha sido relatada uma redução da gravidade da doença. Na segunda epidemia, constatou-se que 75% e 98,2% das crianças vacinadas e não vacinadas, respectivamente, contraíram a doença (MEDICAL RESEARCH COUNCIL INVESTIGATION ⁴⁷, 1951).

Devido as grandes controvérsias havidas nos diversos ensaios foi concluído que as vacinas usadas, eram diferentes, dando resultados inconclusivos sobre a proteção conferida ⁴⁷.

Dos vários estudos feitos com vacina clássica, convém destacar o conduzido por KENDRICK, mostrando que de crianças vacinadas expostas a infecções, apenas 34,9% contraíram a doença e no grupo não vacinado 89,4% ⁴⁷.

A avaliação de cuidadosos ensaios de campo com a Vacina Pertussis para a determinação do efeito profilático no homem, indicou que a melhor maneira de se determinar a capacidade protetora da vacina era a utilização, em laboratório, do teste de proteção usando-se o desafio intracerebral em camundongos previamente vacinados. A este respeito, as investigações efetuadas pelo Conselho de Pesquisas Médicas da Inglaterra (MEDICAL RESEARCH COUNCIL ⁴⁸, 1956), e por outros (CSIZER et alii ¹⁴, 1973) demonstraram haver correlação entre os testes de potência em camundongos e proteção em crianças vacinadas.

O mecanismo do teste de proteção em camundongos segundo WANDLAW & PARTON⁽⁸⁷⁾ (1983), citando outros autores depende da linhagem dos camundongos usados, de virulência do microorganismo e do seu poder de multiplicação no cérebro dos camundongos e da ocorrência de mudança da permeabilidade da barreira sanguínea cerebral com escoamento de fatores protetores no cérebro de camundongos vacinados mas não nos de controle. O número de B.pertussis no cérebro dos camundongos vacinados declina e o animal sobrevive enquanto que nos não vacinados a bactéria continua a se multiplicar e o animal morre dentro de 8 a 12 dias quando a B.pertussis alcança um limite ao redor de 10^9 bactéria por cérebro.

A proteção conferida pela Vacina Pertussis, segundo alguns, não depende do soro, mas de anticorpo local, tipo IgA. A proteção conferida é semelhante a que ocorre entre os cílios respiratórios do homem contra algumas viroses respiratórias e possivelmente contra a Bordetella pertussis. Este fato poderia explicar porque recém-nascidos não são protegidos contra a coqueluche pelos anticorpos maternos (CHRISTIE¹¹, 1971).

A Bordetella pertussis possui uma estrutura antigênica complexa, e não é ainda totalmente conhecida. O organismo possui muitas substâncias biologicamente ativas e vários sorotipos. Muitas das substâncias produzidas pela bactéria são tóxicas para as crianças e nas vacinas celulares não existe método satisfatório de separação desses fatores tóxicos.

LESLIE & CARDEN⁴⁰ (1931), verificaram que a Bordetella pertussis pode se apresentar nas fases I, II, III e IV. As cepas virulentas se apresentam na fase I ou fase lisa e avirulentas na fase IV ou fase rugosa, sendo as fases II e III intermediárias.

As cepas de Bordetella pertussis podem ser diferenciadas de acordo com os aglutinógenos que possuem números de 1 a 14. Existem três aglutinógenos major 1, 2 e 3 e outros minor. Cepas podem possuir 2 ou mais antígenos major. (ELDERING et alii²⁰, 1957; PRESTON^{61, 62} 1956, 1963).

Os aglutinógenos são importantes em uma preparação de vacina porque sua eficácia está na dependência dos aglutinógenos da cepa da população infectada (PRESTON⁶², 1963). Em estudos realizados no Brasil por UBATUBA & SALMITO⁷⁹ (1970) no Rio de Janeiro 70,0% das cepas isoladas possuíam os antígenos 1, 2 e 3, 18,0% somente 1 e 3 e 12,0% apenas 1 e 2; em São Paulo, IARIA³⁸ (1977) encontrou 83,3% das cepas com os antígenos 1, 2 e 3, 10,0% com os antígenos 1 e 3 e 6,7% apenas com os antígenos 1 e 2.

São condições necessárias para que uma vacina seja eficaz: cepas cultivadas em fase I (LESLIE & GARDNER⁴⁰, 1931), possuindo na sua estrutura antigênica os serotipos 1, 2 e 3, com a concentração de 10 bilhões de germes, contendo 4 unidades protetoras internacionais.

O fato da vacina pertussis não ser completamente protetora, nem totalmente segura, tem inevitavelmente

despertado questões quanto a avaliação de benefício versus risco. No entanto, tem-se argumentado que nos programas de vacinação, deve-se levar em consideração que a doença é ainda muito séria, acometendo, principalmente, as crianças. A imunização oferece um considerável, embora não muito sólido, nível de proteção. Reações adversas à vacina, embora se saiba que ocorrem, são raras e não invalidam os benefícios da vacinação. (WANDLAW & PARTON⁸⁷, 1983).

As vacinas contra a coqueluche são produzidas com uma ou mais cepas de B.pertussis cultivadas em uma variedade de meios sólidos ou líquidos. Tais cultivos podem ser realizados em frascos, garrafas ou em culturas submersas em fermentadores, com incubação de 35 a 36°C por 24 horas ou mais. Por um processo de centrifugação ou por precipitação, as células são colhidas do meio. Em alguns processos, o sobrenadante é usado para reconstituição da suspensão celular e em outras é descartado sendo a ressuspensão realizada com solução fisiológica tamporada.

Sabemos que as proteínas LPF (fatores protetores da linfocitose) e FHA (filamentos hemaglutinantes) podem ser encontrados no sobrenadante das culturas e contribuem para a potência da vacina. A suspensão da vacina concentrada é inativada pelo calor e estocada a frio com timerosal ou formalina. (MANCLARCK & COWELL⁴⁴, 1983).

As vacinas celulares contra a coqueluche são

comprometidas, pois, para se conseguir um nível aceitável de potência, deve-se aceitar um certo teor de toxicidade. A toxina dermonecrótica é inativada pelos métodos usados na fabricação de vacina, entretanto, toxicidade da vacina celular é devida a endotoxina, e a atividade residual do fator promotor da linfocitose (LPF). A vacina pertussis contendo células bacterianas intactas terá sempre a presença da endotoxina, pois, métodos que inativem a atividade farmacológica do LPF, poderão ter influência na antigenicidade da vacina. O processo da inativação deve ser terminado antes da imunogenicidade ser destruída e por esta razão a vacina pertussis celular contém alguma atividade biológica do LPF. (MANCLARCK & COWELL⁴⁴, 1983).

A B.pertussis tem na sua composição uma gama de fatores, os quais têm sido estudados, para se conhecer melhor as suas propriedades (WANDLAW & PARTON⁸⁷, 1983).

O quadro 1 mostra, de forma resumida, as principais atividades da toxina e outros fatores produzidos pela B.pertussis.

Muitas substâncias biologicamente ativas têm sido isoladas da B.pertussis a saber: a toxina dermonecrótica termolábil, a endotoxina, vários aglutinógenos, hemaglutininas, pertussígeno e outras substâncias antigênicas menos conhecidas. A toxina dermonecrótica, endotoxina e pertussígeno são as mais biologicamente ativas. O efeito altamente letal de B.pertussis é devido a toxina dermonecrótica e a endotoxina⁸⁷.

A maioria dos estudos recentes visando a produção de uma vacina acelular tem sido realizados procurando-se obter o isolamento e purificação de duas proteínas: o fator promotor da linfocitose (LPF) e os filamentos hemaglutinantes (FHA). A este respeito MUNOZ ⁵⁴ (1963) e SATO et alii ⁷¹ (1983), obtiveram em suas pesquisas, o LPF e FHA altamente purificados.

A vacina acelular feita no Japão é produzida a partir do crescimento da B.pertussis em cultura estática. O sobrenadante contendo LPF e FHA é removido por centrifugação, seguida de sua precipitação com sulfato de amônio. O precipitado é redissolvido e centrifugado em gradiente de sacarose. A vacina japonesa é mais segura e menos reatogênica do que a vacina celular por ser constituída dos antígenos LPF e FHA, e por conter quantidade muito reduzida de endotoxina (MANCKARCK & COWELL ⁴⁴, 1983).

Uma variedade de técnicas são admissíveis para a purificação e concentração de antígenos da B.pertussis e a maioria das pesquisas realizadas em laboratórios produtores de vacinas, objetivam o estabelecimento de métodos que sejam técnica e economicamente viáveis para uma produção comercial.

Quadro 1. Toxinas e outros fatores da B.Pertussis

Componente	Localização e propriedade fisicoquímicas	Atividades biológicas
Endotoxina	Envelope; lipopolisacaride - (LPS) termo estável (100°C).	Típica de liposacaride de bactérias Gram negativas.
Toxina termo-lábil (HLT)	Citoplasma; proteína; destruída a 56°C por 30 minutos; com formaldeído, transforma-se em toxoide.	Dermonecrótico para coelhos e cobaias; letal em camundongos; causa atrofia no baço em injeção - I.V.; fracamente antigênica.
Pertussígeno	Envelope e sobrenadante de culturas; proteína; estável a 56°C porém inativado a 80°C; toxoide com glutaraldeído.	Única da B.pertussis; tem atividades histamina sensibilizantes; leucocitose; adjuvante; mitogênica e hemaglutinante; aumenta a secreção da insulina; parece ser protetora no teste de proteção intracerebral para camundongos.
Citotoxina traqueal (TCT)	Sobrenadante de cultura; provavelmente fragmento peptidoglican; termo - lábil (100°C, 1 hora)	Causa perda da atividade ciliar e citopatológica em cultura de células traqueais.
Adenilo ciclase	Intracelular, periplásmica e escretada; termo-lábil.	Destroi a função fagocítica.
Hemaglutinina filamentosa (FHA)	Superfície celular e sobrenadante de culturas estáticas; proteína.	Prende-se em células de mamíferos.
Aglutinógenos termolábeis	Superfície celular; proteína	Não conhecidas.

Fonte: WANDLAW, A.C. and PARTON, R.⁸⁷, 1983.

1.1.4. Tuberculose

Entre as doenças, a tuberculose é considerada ainda um problema de saúde pública e de importância global, tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. A prevalência é estimada em 15 a 20 milhões de casos de tuberculose ativa, com uma incidência anual de cerca de 10 milhões, com 3 milhões de óbitos por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION⁹¹, 1982).

A magnitude do problema torna-se maior devido a incerteza das medidas de controle, especialmente a imunização pelo BCG, embora esta seja considerada como medida importante no controle da doença. Resultados contraditórios foram revelados em vários ensaios controlados, e em estudos mais recentes realizados na Índia, onde a incidência da doença revelou-se semelhante em indivíduos vacinados e não vacinados (TUBERCULOSIS PREVENTION TRIAL⁷⁸, 1980).

Desde a descoberta do bacilo da tuberculose por KOCH em 1882 e a observação em 1890 do fenômeno local produzidos em cobaias infectados com bacilos tuberculosos e reinfectados com bacilos vivos, mortos, ou extratos de um filtrado de culturas dos bacilos, tornou-se claro que infecção com microbactéria produzia um estado de reatividade específica em animais, induzindo resistência a infecção. Em 1945 tornou-se claro, que o mecanismo imune responsável pelo reconhecimento específico estava associado aos linfócitos e que o fenômeno da resistência estava

associado com um estado particular dos macrófagos que destroem as micobactérias nos animais imunizados (LAGRAN³⁹, 1980).

Foi verificado também, que a tuberculose pulmonar era rara em indivíduos que apresentavam adenite tuberculosa e, o uso da tuberculina veio mostrar que adolescentes e adultos quando infectados precocemente em sua vida, possuíam mais resistência à doença que os não infectados (DAM & PIO¹⁷, 1979).

O BCG, bacilo de CALMETTE & GUERIN, é uma cepa variedade bovina do Mycobacterium tuberculosis, isolada de uma vaca infectada, que por passagem seriada em meio enriquecido de sais biliares tornou-se avirulento. (MOORE⁵³, 1983). Esta cepa vem sendo usada como vacina contra a tuberculose. De início, a vacina era administrada oralmente, passando mais tarde a ser aplicada pela via intradérmica ou por escarificação (STANFORD & ROOK⁷⁶, 1983).

Para melhor compreensão sobre a eficácia do BCG, os cientistas tem debatido as circunstâncias dos ensaios controlados, e tem havido um consenso de opiniões sobre seu valor protetor. De fato, estes ensaios mostraram que algumas vacinas deram proteção alta, algumas baixas e outras, indubitavelmente, nenhuma proteção (MEDICAL RESEARCH COUNCIL INVESTIGATION^{49, 50, 51}, 1956, 1959, 1963) (FRIMODT et alii²⁸, 1964), (COMSTOCK et alii^{12, 13}, 1966, 1969).

Foi demonstrado que a cepa BCG usada nos laboratórios produtores de vacina, apresentava-se com diferen-tes propriedades, pois a viabilidade e a quantidade baci-lar de diferentes partidas diferiam de laboratório para laboratório e a dose administrada não era sempre a mesma. A este respeito, alguns problemas já foram resolvidos, e o maior avanço foi, sem dúvida, a produção de BCG liofili-zado. A liofilização oferece a vantagem de manter a cepa, usada na produção da vacina, fixa em suas propriedades ge-néticas (HITZE³⁷, 1974).

Experimentos em cobaios mostraram que certas es-pécies de micobactérias do meio ambiente podem imunizar contra a tuberculose, conferindo vários graus de proteção, quando comparado ao BCG. Assim com o M.Kansassi obteve-se 70% de proteção, M.avium 50% e M.fortuitum 15%, (PALMER & LONG⁵⁷, 1966). Em outros experimentos usando vacinação com M.avium e M.intracellulare obteve-se proteção de cobaios contra algumas cepas de M.tuberculosis (EDWARDS et alii²¹, 1982).

STANFORD & ROOK⁷⁶ (1983), formularam hipótese complexa e sofisticada para explicar a variável eficácia da vacinação BCG. O fenômeno da hipersensibilidade retar-dada, causada pelos antígenos micobacterianos em humanos e animais, era confundido porque eles provocavam respos-tas heterogeneas e os primeiros pesquisadores falhavam em reconhecer este fato. Camundongos e cobaios sensibiliza-dos davam dois tipos de resposta. Um tipo, como o que foi

descrito por KOCH e chamada " Resposta tipo KOCH " e um outro denominado " Resposta tipo Listeria", que foi descrito pela primeira vez por MACKANESS. O insucesso dos ensaios era devido a exposição a micobactérias do meio ambiente que podem possibilitar parcial proteção contra a doença e assim mascarar completamente o efeito da vacinação BCG. Segundo PALLEN⁵⁶(1984), se STANFORD & ROOK estão certos nas suas hipóteses, então o padrão de distribuição das micobactérias do meio ambiente e a epidemiologia da infecção por estas bactérias são importantes determinantes da eficácia da vacinação BCG no controle da tuberculose.

Atualmente, ainda é obscuro o conhecimento de como e em que extensão a resposta ao antígeno microbiano é regulado, pois existem lacunas no conhecimento do papel funcional e químico do antígeno, não somente do M. tuberculosis, mas também do BCG e de outras micobactérias.

Segundo a Organização Mundial da Saúde⁹¹, (1982) são considerados problemas: 1) isolamento do antígeno micobacteriano; 2) o uso de métodos "in vivo" para investigar a resposta imune a micobactéria e a relação parasita-hospedeiro; 3) a imunologia clínica da tuberculose e a imunização BCG.

YOUMANS & YOUMANS⁸⁶ (1969) extraíndo diversas frações de micobactérias como a fração ribossomal, membrana celular e fator corda, concluíram que o poder imunizan

te da célula micobacteriana viva reside em uma substância lábil presente nesta célula. Estudos realizados com a fração ribossomal e membrana celular revelaram que possivelmente os ribossomas contêm o antígeno lábil. Um processo de extração para manter os ribossomas vivos foi conseguido pelos referidos autores. Injetando-se a fração ribossomal em camundongos, os linfócitos T são sensibilizados tornando-se imunocompetentes, sendo a imunidade induzida específica e dirigida contra as micobactérias. Observou-se ainda que quantidades mínimas da fração ribossomal provocam imunidade idêntica a provocada pelas micobactérias vivas, as quais, naturalmente, possuem quantidade igual de ribossomas.

A membrana celular é uma fração estável, resistente ao calor, e constituída do fator corda, lipossacárides e outras substâncias. Este componente ativa os macrófagos desenvolvendo atividade fagocitária e bactericida para as micobactérias e outras bactérias, produzindo imunidade inespecífica. A associação de tuberculino-proteína ao fator corda e aos lipossacárides, induz sensibilidade a tuberculina (YOUMANS & YOUMANS⁸⁶, 1969).

A obtenção de uma vacina extrativa composta da fração ribossomal poderia ser um caminho para se conseguir antígenos que confirmam imunidade contra a tuberculose, sem provocar sensibilidade a tuberculina.

1.2. Adjuvantes

Adjuvantes são substâncias incorporadas a um antígeno ou injetadas ao mesmo tempo que ele, potencializando de maneira não específica as respostas imunitárias que desencadeia, permitindo com isto, a obtenção de títulos mais elevados de anticorpos, com quantidades mínimas e menor número de doses de antígeno, conservando-os no local de inoculação, e reduzindo as reações vacinais (GROUPE SCIENTIFIQUE DE L'OMS³², 1976).

O interesse dos imunologistas em usar emulsões de água em óleo mineral como adjuvante, surgiu com as pesquisas de FREUND et alii²⁶(1944). Estes autores mostraram que o adjuvante agia com mais eficiência quando o antígeno era incorporado na fase dispersa, estimulando uma resposta imunitária mais alta e duradoura.

Emulsão de água em óleo é chamada de "adjuvante incompleto de FREUND". Quando uma suspensão de M.tubercul^osis morta pelo calor e seca é incorporada à essa emulsão, o conjunto constitui o denominado "adjuvante completo de FREUND". O adjuvante completo de FREUND resulta em uma maior resposta imunológica em animais, como o cobaio, provocando uma alta produção de imunoglobulinas, aumentando a hipersensibilidade retardada, estimulando o sistema fagocítico mononuclear e ativando os macrófagos. A desvantagem de seu uso é, inevitavelmente, a formação de granuloma e, muitas vezes, produção de abscesso no local da inoculação (HERBERT³⁶, 1973).

O efeito antigênico do soro de cavalo pode ser aumentado com a combinação da lanolina e óleo de parafina, contendo suspensão morta de bacilo da tuberculose. Outros antígenos solúveis (toxóide diftérico) e particulados (Salmonella typhi e B. pertussis) foram experimentados em coelhos. Com toxina diférica incorporada à lanolina, os níveis de antitoxina produzidos eram maiores e mais duradouros em relação ao que ocorria após a inoculação de toxóide simples (FREUND & BONANTO²⁶, 1944).

Através da inoculação em animais de suspensão de Salmonella typhi em salina, esta suspensão + aquaphor + parafina líquida e esta última suspensão + bacilos de tuberculose mortos, verificou-se que os níveis de aglutininas produzidos foram maiores, quando se associavam os adjuvantes, sendo mais elevados quando adicionavam bacilos da tuberculose mortos à suspensão inoculada (FREUND & BONANTO²⁶, 1944).

Em experimento realizado com B. pertussis como antígeno, estes autores obtiveram resultados semelhantes aos verificados com a S. typhi. Durante estes experimentos os locais da inoculação foram examinados, frequentemente, tendo sido neles constatada a presença de nódulos ovais nos locais de injeção do antígeno combinado com os adjuvantes. Os nódulos eram irregulares quanto a forma e, muitas vezes, apareciam distantes do local da injeção. Não se verificou supuração de nenhum dos nódulos, os quais em alguns meses desapareciam²⁶.

A administração de um antígeno em emulsão de óleo de parafina pode ser justificada, porque aumenta e mantém a formação de anticorpos. O uso de adjuvantes poderá encontrar aplicação na imunização profilática e em tratamento de pessoas alérgicas. A adição de micobactéria morta à emulsão modifica e potencializa a sensibilidade alérgica, sendo esta uma maneira de se demonstrar a natureza alergênica do tecido e de outros antígenos (FREUND²⁷, 1957).

As substâncias com propriedades adjuvantes são de dois tipos básicos: a) aquelas que conservam o antígeno no local de inoculação, liberando-o vagarosamente, para agir, possivelmente, produzindo uma série de respostas secundárias; b) um segundo grupo, como as exotoxinas que devem ter efeito direto, não específico, estimulador do sistema retículo endotelial. Na prática alguns adjuvantes são uma combinação dos dois tipos, sendo difícil dissociá-los. (HERBERT³⁵, 1967).

Os adjuvantes mais conhecidos são de duas categorias: os compostos de alumínio e de cálcio (fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, óxido de alumínio e fosfato de cálcio) e os adjuvantes constituídos de emulsão de água em óleo, sendo os principais a mistura de água em óleo de parafina (adjuvante incompleto de FREUND) e água em óleo de arachide (adjuvante 65). (GROUPE SCIENTIFIQUE DE L'OMS³², 1976).

O fosfato e o hidróxido de alumínio são os adjuvantes mais utilizados. Estes compostos são considerados não perigosos para o homem, embora sua utilização seja, muitas vezes, seguida da formação de abscessos estéreis persistentes (GROUPE SCIENTIFIQUE DE L'OMS,³² 1976).

Os níveis de anticorpos contra os antígenos das vacinas contendo como adjuvantes, fosfato e hidróxido de alumínio, são nitidamente mais elevados que os obtidos através da inoculação de vacinas simples. Estas respostas com produção de anticorpos séricos são de curta duração, porém pode-se obter um prolongamento satisfatório pela administração de doses múltiplas³².

Os adjuvantes a base de óleo mineral são objeto de muitas críticas, pois além de ocasionarem manifestações patológicas, provocam diversas perturbações autoimunes e potencializam as respostas alérgicas, havendo ainda escassez de dados experimentais, indispensáveis para um julgamento abalizado sobre sua inocuidade. Os adjuvantes de óleo mineral, mesmo corretamente preparados, provocam abscessos estéreis, com uma retenção durável do óleo nos tecidos. Certos pesquisadores consideram estes inconvenientes como inaceitáveis³².

Entre outros adjuvantes que podem ser utilizados pelo homem, convém destacar o bacilo de CALMETTE GUÉRIN (BCG) e a Bordetella pertussis. Os lipopolídeos

(LPS) de muitas bactérias gram negativas poderiam ser considerados como adjuvantes, porém, possuem outras atividades biológicas que não estão diretamente ligadas a resposta imunitária, destacando-se entre outras, a pirogenicidade, a estimulação da síntese de proteínas pelo fígado, liberação e estimulação do interferon. As atividades biológicas são atribuídas a presença do lípide A, que é comum a todos LPS. Em razão de seu largo espectro de atividade biológica, é improvável que o lípide A, normalmente, seja utilizado como adjuvante³².

Sendo o adjuvante a base de óleo mineral inaceitável e os compostos de alumínio, apesar de não serem perigosos, serem produtores de abscessos e nódulos persistentes, o BCG sendo um poderoso estimulante não específico poderia compor a vacina tríplice, como adjuvante e antígeno.

Estudos comparativos sobre as atividades dos adjuvantes comuns foram realizados com a finalidade de se determinar os seus comportamentos em animais de laboratório. Assim, YAMAMOTO et alii⁸⁵ (1979), usando o toxóide tetânico como antígeno e vários adjuvantes verificaram que o gel de alumínio mostrou-se consistentemente de alta adjuvanicidade na produção de antitoxina quando administrada subcutaneamente. Por outro lado, quando se utilizava como adjuvante água-óleo em água verificava-se uma atividade comparável à do alumínio em camundongos e coelhos, porém nenhuma atividade em macacos. Endotoxinas,

usadas como adjuvante, foram consideravelmente efetivas em coelhos e macacos, mas não em camundongos. Antitoxinas IgM e IgG foram produzidas pelo efeito adjuvante em coelho e macaco, entretanto em camundongos, o efeito dos adjuvantes sobre a produção de antitoxina IgM, foi menos significativa e inconsistente.

Foi investigada a síntese de anticorpo dos tipos IgD e IgE em ratos, utilizando-se a ovo-albumina como antígeno e diferentes adjuvantes. A produção de anticorpos do tipo IgE mostrou-se estimulada pelo emprego do hidróxido de alumínio e da combinação B.pertussis e hidróxido de alumínio, ao contrário do que foi constatada, usando-se o adjuvante completo de FREUND. Foi demonstrada a formação de anticorpo tipo IgD com o emprego do adjuvante completo de FREUND ou com a combinação B.pertussis e hidróxido de alumínio. Usando-se somente hidróxido de alumínio ou o antígeno sem adjuvante, foram produzidas pequenas quantidades de IgD específica (PAUWELS⁵⁸, 1979).

A administração por via subcutânea de BSA (soro albumina bovina) e SRBC (hemácias de carneiro) foi comparada quanto a produção de anticorpos usando-se sete adjuvantes conhecidos: adjuvante completo (FCA) e incompleto de FREUND (FIA), alhydrogel, Corynebacterium parvum, B.pertussis, muramyl dipeptide (MDP) e saponina. Uma marcante seletividade e diferenças na potência foram reveladas em relação àqueles dois antígenos. Somente FIA, FCA, alhydrogel e MDP, causaram uma resposta primária para 50 mg de BSA, sendo o FIA significativamente superior ao FCA. A

memória imunológica para dose baixa (0,5mg) de BSA, não evocou resposta primária com nenhum adjuvante e foi potencializada pelo alhydrogel e pelo MDP e relativamente reduzida pelo FIA. Através da radioimunoeletroforese foi demonstrada que a potencialização da resposta com MDP foi confinado a IgG, enquanto alhydrogel, FIA e FCA estimularam a produção de IgG₁ e IgG₂. A saponina foi o melhor adjuvante para as resposta hemaglutinantes primária e secundária relativamente a SRBC. Foram ativas, em menor grau, alhydrogel para a resposta primária e alhydrogel e B.pertussis para a secundária. Estes resultados mostraram que a potência relativa dos adjuvantes diferem, marcadamente, de acordo com antígeno usado e sugerem que a saponina pode ser um adjuvante efetivo para antígenos de membrana celular (BOMFORD⁷, 1980).

A utilização de uma cultura de BCG recentemente preparada e contendo uma proporção elevada de bacilos vivos, é a melhor maneira para se obter uma estimulação de imunidade celular. Porém, o modo de preparação e a conservação das suspensões bacterianas, bem como as cepas utilizadas têm um papel importante no poder adjuvante do BCG. As observações mostram que a atividade é ótima quando se utilizam bacilos provenientes de vênus e não de cultura submersa. (GROUPE SCIENTIFIQUE DE L'OMS³², 1976).

A B.pertussis ativa os macrófagos e aumenta a eficácia dos antígenos. Tem sido verificado que esta

bactéria aumenta o número de células T cooperantes e o grau de proliferação das células B, bem como dos macrófagos ativadores. Não se sabe, entretanto, quais elementos ou propriedades dos microorganismos que são responsáveis por estes efeitos e nem seu modo de interreação. Parece que a ação do fator promotor da linfocitose (LPF) sobre a redistribuição dos linfócitos possui efeitos importantes sobre a imunidade, mas não se conhece claramente como resultaria em efeito imunopotencializante (GROUPE SCIENTIFIQUE DE L'ONS³², 1976).

1.3. Vacinas associadas

A falta de recursos econômicos, de pessoal adequadamente treinado, a necessidade cada vez maior de se fazer vacinação em massa, conduziram os pesquisadores a estudarem a viabilidade de combinação de diversas vacinas, sem inconvenientes para a população. Estas combinações trariam, entre outras vantagens, a possibilidade de diminuir as constantes aplicações de vacinas isoladas, melhor cumprimento dos programas de vacinação existentes e provavelmente, uma melhoria nas condições das vacinas.

A lentidão e complexidade dos programas de vacinação fizeram surgir a necessidade do uso de vacinas associadas (vacinas vivas com vacinas vivas, vacinas inativadas com vacinas inativadas, bem como vacinas vivas com vacinas inativadas). A associação entre vacinas vivas e mortas não são ainda muito usadas, embora elas não sejam, teoricamente, incompatíveis.

A associação das vacinas é feita de duas maneiras diferentes, ou sejam, administradas simultaneamente no mesmo dia, em locais diferentes do corpo ou misturadas e aplicadas no mesmo local. As associações das vacinas mais usadas são os toxóides tetânico, diftérico e B. pertussis para as vacinas inativadas e poliomielite, varíola, sarampo e BCG para as vacinas vivas. O problema das associações múltiplas são também concernentes a outras vacinas mortas (tífica e colérica) e vivas (rubéola, caxumba e febre amarela) (REY, M. et alii⁶⁶, 1970).

CVJETANOVIC¹⁵ (1972), revelou ser aceitável, com resposta imunológica satisfatória, a combinação DPT Ty (toxóide tetânico, diftérico, pertussis e tífica), revelando-se a vacina contra a febre tifóide (Ty) morta pelo calor, melhor do que a vacina acetona.

A combinação das vacinas BCG e anti-variolica foram estudadas e ficou demonstrado não haver perda aparente dos seus efeitos protetores, e nem interferência quando aplicadas ao mesmo tempo em uma única aplicação ou quando inoculadas em locais diferentes (MOODIE & CHENG⁵², 1962; LIN & HYG⁴¹, 1965; CHRISTENSEN et alii¹⁰, 1966; VAUGHAN et alii^{81,82}, 1972, 1973).

A combinação dos toxóides diftérico e tetânico precipitados com hidróxido de alumínio, adicionada de vacina pertussis tem simplificado consideravelmente a imunização primária em crianças. Estes antígenos são bem

tolerados quando aplicados profundamente por via intramuscular, não havendo nenhuma complicação local ou sistêmica. Todas as crianças normais, a partir do 2º mês de vida deverão receber 3 doses de uma vacina padrão, aplicadas com intervalos de 1 mês (WEHRLE⁸⁸, 1964).

Crianças que foram imunizadas contra a varíola, sarampo e febre amarela simultaneamente, em locais diferentes de inoculação responderam adequadamente aos três antígenos. Porém, em crianças que receberam estas três vacinas mais a vacina tríplice (DPT), houve uma diminuição da taxa de soroconversão com relação a vacina contra o sarampo, de 89% para 70%. Diante disto, uma interreação entre vacinas vivas e mortas deveria ser considerada quando a administração de antígenos múltiplos é planejada (RUBEN et alii⁶⁹, 1973).

ARAKAWA et alii² (1965), usaram a combinação das vacinas anti-tetânica, diftérica, pertussis e sarampo em crianças de 13 meses, administrando 3 doses (0,5, 1,0 e 1,0 ml), com intervalos de um mês, e obtiveram níveis de anticorpos significantes. Entretanto, crianças de 16 meses que receberam três doses (1 ml cada) da mesma vacina, com o mesmo intervalo entre as inoculações, mostraram uma resposta mais significativa quanto a produção de anticorpos.

SAGAWA et alii⁷⁰ (1970) usando a combinação das vacinas anti-tetânica, diftérica, pertussis, sarampo e varíola em crianças de 5 a 18 meses, que não haviam sido a

cometidas, anteriormente destas doenças, obtiveram resultado satisfatório, mostrando um aumento do título de anticorpos significativo para o sarampo.

A administração simultânea da vacina BCG, toxóides tetânico e diftérico adsorvidos em hidróxido de alumínio e vacina contra a poliomielite foi estudada em crianças de 13 a 14 anos. Nenhuma reação adversa foi verificada em relação às vacinas BCG e contra a poliomielite, embora 8% das crianças apresentassem reação no local de inoculação das vacinas contra o tétano e difteria, a qual foi atribuída ao toxóide diftérico (CALBRAITH et alii³⁰, 1971).

GATEFF et alii³¹ (1973) estudaram a administração simultânea de vacinas contra a varíola, febre amarela, sarampo, BCG e toxóide tetânico. O toxóide tetânico e a vacina do sarampo, foram misturados e administrado em um único local. Os autores verificaram que a eficácia foi satisfatória com todos os antígenos, exceto com o BCG, devido talvez ao fato da vacinação ter sido realizada com o "ped-o-jet". O nível de conversão tuberculínica foi o mesmo no grupo que recebeu os cinco antígenos e no grupo controle.

A aplicação simultânea de BCG com outras vacinas está sendo usada ultimamente, porém combinações usando-se a mistura do BCG com outras vacinas tem sido pouco investigadas.

1.4. Esquemas de vacinação

O importante avanço na medicina moderna é inegavelmente a possibilidade de se impedir a ocorrência de doenças por meio de imunizações apropriadas (PHILLIPS⁵⁹, 1975).

O modo de se conduzir a imunização varia conforme as condições próprias de cada país, mas os princípios fundamentais permanecem os mesmos. A planificação dos programas de vacinação deve ser organizada em bases econômicas que permitam tirar o máximo de vantagem dos recursos disponíveis (CVJETANOVIC¹⁶, 1973).

Para se planejar um programa de imunização contra uma determinada doença é necessário levar-se em conta as taxas de morbidade e mortalidade, se conhecer a sua importância relativa sua gravidade e sequelas, os grupos vulneráveis, o poder imunizante da vacina, os níveis de anticorpos e sua durabilidade, presença ou ausência de imunização de grupo, número de doses da vacina a ser aplicado, ocorrência e gravidade das reações pós-vacinais e insuficiência da resposta imunitária.¹⁶

O plano de imunização constitui um compromisso entre dois objetivos: de uma parte, conferir a melhor proteção possível e de outra economizar ao máximo os esforços e recursos dos serviços de saúde e da população visada¹⁶.

A política de vacinação necessita frequentes a valiações para se verificar se ela permanece especificamente apropriada para a população considerada. É preciso que haja uma tentativa de equilíbrio entre necessidades e recurso atual, entre benefício individual e comunitário, entre o risco de imunização e o das doenças que são designadas para serem prevenidas (DOWNHAM¹⁹, 1976).

A imunização é um meio econômico e eficiente de prevenção de doenças para os países em desenvolvimento, porém o seu custo pode ser reduzido mediante a administração de vários antígenos associados.

A erradicação da varíola tornou-se possível graças ao esforço mundial, dos programas de vacinação de senvolvidos. Estes programas mostraram ser possível vacinar 80 a 90% da população dos países, por meio de equi-pes móveis de vacinação. Cada programa de imunização deve ser acompanhado por um sistema de avaliação da ocorrência da doença, para o controle epidemiológico (FOEGE & FOSTER²⁵, 1974).

CVJETANOVIC¹⁵ (1972) propôs um esquema que pode ser adaptado para a imunização de crianças nos países em desenvolvimento, onde a febre tifóide ainda era problema. Basicamente, o autor usou uma vacina quádrupla, que consistia na associação da vacina DPT à vacina contra a febre tifóide.

A imunização deve ser feita o mais cedo possível para proteger o maior número de crianças, aumentando, assim a possibilidade de se interromper a transmissão da doença. Os antígenos específicos usados nos programas de vacinação podem variar de continente para continente, porém incluem DPT, vacina oral trivalente contra a polio_{mi}lite, vacina contra o sarampo e pode, em adição, incluir vacina contra a febre tifóide, BCG e contra a febre amarela entre outras (FOEGE & FOSTER²⁵, 1974).

A vacina anti-diftérica clássica é aplicada em três doses na infância e uma dose posterior, na entrada à escola. Porém, a imunização não impede a ocorrência de portadores de C.diphtheriae, desta maneira, indivíduos não imunes não são protegidos pelo alto nível da população imunizada. O toxóide diftérico é um bom agente imunizante e produz anticorpos duradouros como os produzidos através da vacinação pelo toxóide tetânico (PHILLIPS⁵⁹, 1975; DOWNHAM¹⁹, 1976).

O toxóide tetânico, usado atualmente, deverá ser ministrado em 4 doses na infância, a exemplo da vacina anti-diftérica. Uma outra dose poderá ser aplicada quando a criança deixa a escola ou quando houver risco, após 5 anos da última dose. Para as pessoas não imunes, no tratamento de feridas, penicilina é essencial, porém, o soro antitetânico deverá ser usado se ferimento foi de alto risco para tétano. O toxóide tetânico é um bom agente imunizante produzindo anticorpos estáveis e dando proteção duradoura^{59,19}.

Embora a incidência de coqueluche tenha declinado em muitos países com a introdução da política de vacinação, a doença ainda é severa. A vacina pertussis atual deverá ser aplicada em 3 doses na infância. Entretanto, para a proteção do grupo de alto risco, ela deverá ser começada cedo, nos primeiros meses de vida (DOWNHAM ¹⁹, 1976).

Foi demonstrado em países desenvolvidos que, uma cobertura de 90%, ocasionou o desaparecimento virtual da B.pertussis na população. Isto é, provavelmente, devido à considerável redução da circulação do microorganismo. Nesta situação, o grupo imunizado dará proteção às crianças, mesmo que elas não estejam imunizadas. O uso de duas doses de DPT, sendo a segunda dose, retardada até 9 ou 14 meses de idade, interferirá com os tais grupos imunes. Como consequência, crianças nos seus primeiros 14 meses de vida, podem continuamente ser expostas a infecção (MANGAY-ANGARA et alii ⁴⁵, 1980).

A vacinação BCG é uma arma importante a ser utilizada no controle da tuberculose a nível comunitário. O tipo de programa escolhido deve ser ditado pela situação epidemiológica própria de cada país: a) nos países onde a tuberculose apresenta uma prevalência elevada, a vacinação BCG deve ser praticada em idade precoce, caso seja demonstrado que possa ter um papel apreciável na prevenção das formas graves de tuberculose infantil, a meningite tuberculosa e miliar; b) nos países onde a

prevalência é baixa, a política atual, quanto a vacinação com o BCG deve continuar a ser adaptada conforme a evolução da situação, as tendências epidemiológicas locais e certos fatores como as migrações (PHILLIPS ⁵⁹, 1975).

A vacinação com o BCG é obrigatória em 64 países e oficialmente recomendada em 118 países e territórios. Ela é aplicada em 3/4 da totalidade dos cinco continentes e em quase todos os países em desenvolvimento. A vacinação é praticada em recém-nascidos porém, em alguns países, em crianças na idade escolar. Nos programas de rotina, aplicados na idade escolar, a vacinação é efetuada, diretamente sem prova de tuberculina prévia. Por outro lado, a revacinação somente é praticada dependendo do resultado da prova de tuberculina (GROUPE D'ETUDE DE L'OMS ³³, 1980).

A vacina BCG pode ser aplicada simultaneamente com outras vacinas, quando isto representar vantagens do ponto de vista operacional. Em recém-nascidos o BCG é administrado ao mesmo tempo que as vacinas DPT e contra a poliomielite ³³.

Na Inglaterra o BCG é aplicado rotineiramente, em crianças de 10 a 13 anos, negativos ao teste tuberculínico. Crianças recém-nascidas, com antecedentes familiar de tuberculose ou em família imigrada recentemente, deve ser imunizada durante as primeiras semanas de vida. Crianças chegando como imigrantes de países onde a tuberculose

é comum, deverá ser imunizada em qualquer idade. Por outro lado, deve ser salientado, que todos que vierem a receber a vacina BCG, deverão ser submetidos ao teste tuberculínico, antes da imunização, exceto os recém-nascidos (DOWNHAM ¹⁹, 1976).

Tem se estudado, cada vez mais, métodos de preparo de vacinas e de simplificação dos esquemas de imunização, por questões operacionais, de economia, de pessoal treinado e de utilização do menor número possível de aplicações, abrangendo um maior número de antígenos possíveis.

No Brasil, a vacinação no 1º ano de vida é obrigatória compulsória para fins de recebimento de salário família. (Portaria nº 85/BSP de 4/4/77) (MACIEL ⁴², 1985), sendo utilizado o esquema do Quadro 2.

As vacinações com BCG intradérmico, e com DPT são obrigatórias nos primeiros meses de vida, e comumente vem sendo realizadas por meio de aplicações simultâneas, representando isto alguma vantagem de ordem operacional. Entretanto estas vacinas talvez pudessem ser aplicadas em uma única dose, através da combinação do BCG com a vacina tríplice (DPT) e dependendo dos resultados de investigações a respeito.

Quadro 2. Esquema de vacinação utilizado no Brasil

IDADES	VACINAS
0m-1	BCG intradérmico
2 meses	1a. dose DPT(Difteria, Tétano,Pertussis) 1a. dose de antipólio (oral)
4 meses	2a. dose de DPT 2a. dose de antipólio (oral)
6 meses	3a. dose de DPT 3a. dose de antipólio (oral)
9 meses	Vacina contra sarampo
18 meses	1º reforço da DPT e da antipólio (oral)
36-48 meses	2º reforço da DPT e da antipólio (oral)
1a.série do 1º grau	Reforço da vacina contra tétano e difteria (dupla). Usar dupla, tipo adulto e aplicar também o BCG ID.
Fonte:	MACIEL ⁴³ , 1985

O índice de cobertura vacinal para provocar impacto epidemiológico deverá ser superior a 80%, proporção esta dificilmente atingível, devido principalmente a dificuldade em se conseguir os retornos necessários para se competir o esquema de imunização.

Diante do exposto, planejou-se a realização do presente trabalho o qual pretende fornecer elementos que

poderão servir de base para a preparação de vacinas associadas, e a uma possível melhor adequação na operacionalização dos programas de imunização. Para isto, serão objetivos desta investigação, avaliar:

1. A possibilidade da vacina BCG ser associada à tríplice (DPT) e a vacinação ser realizada intradermicamente.
2. As reações locais e gerais causadas pela associação destas vacinas.
3. A influência do BCG e hidróxido de alumínio como adjuvantes na soro conversão da fração diftérica.
4. A influência do BCG e do hidróxido de alumínio como adjuvantes na soro conversão da fração Pertussis.
5. A influência do BCG e hidróxido de alumínio como adjuvantes na soro conversão da fração tetânica.
6. A influência da vacina tríplice adsorvida em hidróxido de alumínio ou não adsorvida na conversão tuberculínica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Vacinas

No presente estudo foram empregadas as seguintes vacinas concentradas, preparadas no Instituto Butantan, conforme os fluxogramas apresentados no anexo I:

- Toxóide diftérico não purificado.
- Toxóide diftérico não purificado adsorvido em hidróxido de alumínio.
- Toxóide diftérico purificado.
- Toxóide diftérico purificado adsorvido em hidróxido de alumínio.
- Toxóide tetânico não purificado.
- Toxóide tetânico não purificado adsorvido em hidróxido de alumínio.
- Toxóide tetânico purificado.
- Toxóide tetânico purificado adsorvido em hidróxido de alumínio.
- Vacina pertussis.
- Vacina pertussis com hidróxido de alumínio.
- Vacina BCG liofilizada.

Para o primeiro experimento

Foram utilizadas duas vacinas quádruplas com as seguintes concentrações finais de antígenos para constituir uma dose de inoculação de 0,1 ml.

DPT AL(OH)₃ + BCG - Toxóide diftérico não purificado
(2UI/0,1 ml).
Toxóide tetânico não purificado
(2UI/0,1 ml).
Vacina pertussis (4UI/0,1 ml).
Vacina BCG (0,1 mg/0,1 ml).

DPT + BCG - mesma composição, porém, preparada
com toxóides tetânico e diftérico
não adsorvida em hidróxido de alu-
mínio.

Para o segundo experimento

Foram empregadas as vacinas abaixo relaciona-
das, contendo as seguintes concentrações de antígeno pa-
ra constituir uma dose de inoculação de 0,1 ml:

D - Toxóide diftérico purificado (80
Lf/0,1 ml).
D + AL(OH)₃ - Toxóide diftérico purificado (80
LF/0,1 ml).
D + BCG - Toxóide diftérico purificado (80
Lf/0,1 ml).
Vacina BCG (0,1 mg/0,1 ml)
P - Vacina pertussis (4 UI/0,1 ml)
P + AL(OH)₃ - Vacina pertussis com hidróxido de
alumínio (4 UI/0,1 ml).
P + BCG - Vacina pertussis (4 UI/0,1 ml)
Vacina BCG (0,1 mg/0,1 ml)

- DPT**
- Toxóide diftérico purificado (80 Lf/0,1 ml).
 - Toxóide tetânico purificado (60 Lf/0,1 ml).
 - Vacina pertussis (4 UI/0,1 ml).
- DPT + AL(OH)₃**
- Toxóide diftérico purificado adsorvido em hidróxido de alumínio (80 Lf/0,1 ml).
 - Toxóide tetânico purificado adsorvido em hidróxido de alumínio (60 Lf/0,1 ml).
 - Vacina pertussis (4 UI/0,1 ml).
- DPT + BCG**
- Toxóide diftérico purificado (80 Lf/0,1 ml).
 - Toxóide tetânico purificado (60 Lf/0,1 ml).
 - Vacina pertussis (4 UI/0,1 ml).
 - Vacina BCG (0,1 mg/0,1 ml).
- BCG**
- Vacina BCG (0,1 mg/0,1 ml).

Deve ser salientado que foram preparados 12 lotes da Vacina DPT + BCG. Por outro lado, a concentração de hidróxido de alumínio adicionada às vacinas adsorvidas foi de 2,4 mg/dose de 0,1 ml.

2.2. Determinação da potência das vacinas

2.2.1. Verificação da potência dos toxóides diftérico e tetânico.

As provas de potência para os toxóides diftérico e tetânico foram realizadas em cobaias e também através de provas de floculação, segundo as técnicas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde ⁹⁰(1982).

2.2.2. As unidades protetoras da fração pertussis foi determinada pela prova de potência, segundo as técnicas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde ⁹⁰(1982).

2.2.2.1. Imunização

Para cada lote de vacina a ser testada, os camundongos a serem inoculados constituíram 10 grupos 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 em exame e da vacina padrão, 1/5, 1/25, 1/125, 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 inoculados 0,5 ml por via intraperitoneal, para a vacina padrão e para as vacinas em exame.

2.2.2.2. Inoculação da dose desafiante de B. pertussis

A cultura original foi feita a partir da cepa de B. pertussis liofilizada nº 18.323, em meio de Bordet-Gengou a 35°C durante 48 horas, sendo a seguir realizado um segundo repique de 24 horas, à mesma temperatura para ser utilizado nas inoculações. Para isto, após a prova de pureza bacteriocópica, foi determinada a concentração da cultura virulenta, 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 inoculada após 14 dias, em todos os lotes de camundongos que receberam as vacinas padrão e em exame, correspondeu a 1:3000 da concentração inicial (dose teste), sendo que cada camundongo recebeu 0,03 ml desta suspensão por via intracerebral. Decorridas 48 horas, de cada lote de 20, foram mantidos apenas 16 animais. O lote de 40 camundongos utilizados para o teste de virulência dividido em 4 grupos, foi inoculado por via intracerebral, com 0,03 ml das seguintes diluições de germes virulentos: 1º lote, dose teste; 2º lote, dose teste diluída a 1/50; 3º lote, a 1/250, e 4º lote, a 1/1250. Os animais vacinados previamente e aqueles não vacinados foram observados por um período de 14 dias. Durante este período anotou-se o número de mortes, considerando-se ainda como mortos aqueles que apresentaram paralisia.

2.2.2.3. Determinação das unidades protetoras

Para a verificação da potência foram considerados o número total de sobreviventes e de mortos, correspondentes as diferentes diluições da vacina, e aplicado o método de WORCESTER-WILSON para calcular as unidades de proteção por ml. O valor da unidade protetora de uma dada vacina sob teste, foi determinado com base nos valores relativos de DE_{50} desta vacina e da padrão. A dose efetiva foi calculada pela diferença entre o número de sobreviventes na maior dose e na menor dose, e o número total de sobreviventes.

Para calcular as unidades de proteção por ml usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{unidades/ml} = \frac{DE_{50} \text{ vacina padrão}}{DE_{50} \text{ vacina teste}} \times \text{nº de U/ml vacina padrão}$$

A vacina foi considerada satisfatória quando possuía, no mínimo, 4 UI por dose.

2.2.3. A potência do BCG foi determinado através da prova de vitalidade e do consumo de oxigênio (WHO ⁸⁹, 1979).

2.2.3.1. Prova de vitalidade:

Para esta prova o conteúdo de 5 ampolas de BCG foi diluída com vacina DPT, de forma a se obter uma concentração de BCG de 0,1 mg/0,1 ml do produto final. A seguir, foram feitas diluições deste produto a 1/20.000, 1/40.000 e 1/80.000, usando-se como diluente o meio de Sauton diluído a 1/4. As diluições foram inoculadas na quantidade de 0,1 ml para cada tubo, em meio de Lowens - tein-Jensen, sendo utilizados 10 tubos para a mais diluída e 5 tubos para cada uma das demais diluições. Após um mês de incubação a 37°C procedeu-se a contagem do número de colônias sendo, posteriormente obtido o número de unidades viáveis por mililitro, conforme a metodologia recomendada pela WHO ⁸⁹ (1979).

2.2.3.2. Prova de consumo de oxigênio:

Para esta prova foi utilizado um respirômetro, aparelho de Warburg, procedendo-se da seguinte maneira : para realização de cada teste, foram usados quatro termobarômetros, sendo que dois foram controles e nos outros dois foi colocada a vacina BCG associada. Para isto, inicialmente foi anotado o número de cada frasco e termobarômetro, procurando-se na tabela, a constante correspondente. No poço central de cada frasco foi colocada uma tira de papel de filtro sanfonada. Colocou-se no poço central, 0,2 ml de solução aquosa de KOH a 20% para fixar o CO₂ e medir o O₂ absoluto. Em dois termobarômetros

foram colocados 2,8 ml de solução de cloreto de sódio a 0,85% e nos manômetros 2,8 ml de vacina BCG diluída com DPT. Os termobarômetros e manômetros foram mantidos em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Após esse período foi realizada a leitura de zero hora e, a seguir, foram feitas as leituras com intervalos de 30 minutos, até completar duas horas.

2.3. Imunização

2.3.1. Primeiro experimento

Foram imunizados com 0,1 ml por via intradérmica 180 cobaias com 300 a 400 g divididos em três grupos, sendo 70 animais imunizados com vacina DPT Al (OH)₃ + BCG, 80 com vacina DPT + BCG e 30 (grupo controle) imunizado somente com BCG. Posteriormente, de acordo com o quadro 3, foram realizadas, através de punção cardíaca, as tomadas de amostras de sangue para obtenção de soros, a fim de serem efetuadas as determinações quantitativas de antitoxinas diftérica e tetânica e de aglutininas anti-pertussis. Os cobaios, inoculados com BCG, isoladamente ou em associação, foram posteriormente, submetidas ao teste de tuberculina.

Quadro 3. Cobaios imunizados com DPT A1 (OH)₃ + BCG, DPT + BCG e BCG e períodos para obtenção de amostras de sangue e teste de tuberculina.

Antígenos	Animais Inoculados	Nº de animais sangrados para a pesquisa de anticorpos contra as frações			Teste de tuberculina após 45 dias
		Diftérica	Pertussis	Tetânica	
		após 30 dias	após 45 dias	após 45 dias	
DPTA1(OH) ₃ +BCG	70	35	62	62	62
DPT + BCG	80	39	77	62	80
BCG	30	-	-	-	30

2.3.2. Segundo experimento

Foram imunizados 200 cobaios com 300 a 400g com 0,1 ml por via intradérmica de vacina contendo antígeno Diftérico, Pertussis, Diftérico + hidróxido de alumínio , Pertussis + hidróxido de alumínio, Diftérico + BCG, Pertussis + BCG, DPT, DPT + hidróxido de alumínio e DPT + BCG . As amostras de sangue foram tomadas por punção cardíaca para a obtenção de soros, a fim de serem determinados os teores de antitoxina diftérica e de aglutininas anti-pertussis. Posteriormente foram realizados testes com tuberculina nos animais inoculados com BCG, isoladamente, ou em associação (Quadro 4).

2.3.3. A determinação da resposta imune nos cobaios para as frações diftérica e tetânica foram realizadas através de teste imunoenzimático; para a fração pertussis empregou-se a reação de imunofluorescência indireta; para a fração BCG foi utilizada a reação de tuberculina (PPD Rt 23 10 UI).

2.3.3.1. Teste imunoenzimático para a fração diftérica (Segundo a técnica utilizada no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo).

Quadro 4. Cobaios imunizados com D, D+Al(OH)₃, D + BCG, P, P+Al(OH)₃, P + BCG, DPT, DPT + Al (OH)₃, DPT + BCG e BCG e períodos para a obtenção de amostras de sangue e teste de tuberculina.

Antígenos	Animais Inoculados	Nº de animais para a pesquisa de anticorpos contra as frações		Teste de tuberculina após 45 dias
		Diftérica após 30 dias	Pertussis após 45 dias	
D	20	19	-	-
D+Al(OH) ₃	20	18	-	-
D + BCG	20	20	-	20
P	20	-	20	-
P+Al(OH) ₃	20	-	20	-
P + BCG	20	-	20	20
DPT	20	20	18	-
DPT + Al(OH) ₃	20	19	20	-
DPT + BCG	20	20	18	18
BCG	20	-	-	20

Antígeno

Foi utilizada uma toxina diftérica purificada (Instituto Butantan), contendo 16ug de proteína, dosada pelo método da absorção em ultra violeta, com comprimento de onda de 280 nm.

Conjugado

A toxina diftérica foi conjugada pelo método do periodato de sódio na proporção de 10 ug de proteína por ml com 6 mg de peroxidase tipo VI (Sigma nº P-8375). Após filtração em Sephadex G 200, o antígeno conjugado foi submetido a uma titulação tendo sido obtido um título 1/320. Assim sendo, para as reações com os soros obtidos dos cobaias, o antígeno conjugado foi utilizado em diluição a 1/320.

Técnica da reação imunoenzimática

Os orifícios da placa usada neste método, foram revestidos com 200 ul de toxina diftérica (0,16 mg/ml) diluída em tampão de carbonato e bicarbonato 0,05 M, com pH 9,5 e mantida a 4°C por uma noite. Após este período, a placa foi lavada três vezes por 3 minutos em cada lavagem, com solução tampão de fosfatos pH 7,4, contendo 0,05 de Tween 20.

O soro de cada cobaio imunizado foi diluído ini

cialmente, a 1/5 com solução tampão de fosfatos pH 7,4 contendo 0,05 de Tween 20. A partir desta diluição a 1/5 foi preparada uma série de diluições com fator 2, até 1/1.280. De cada diluição do soro (1/5 a 1/1280) foram distribuídos volumes de 200 ul, em dois orifícios da placa, impregnados com toxina diftérica. Foram utilizados, na reação, um soro normal de cobaio como controle negativo e um soro, também de cobaio, contendo 600 Lf/ml de anatoxina diftérica, como controle positivo. A seguir a placa foi incubada a 56°C por 40 minutos. Após a incubação a placa foi lavada, durante 3 minutos, por 3 vezes, com solução tampão de fosfatos, pH 7,4, contendo tween 20.

Posteriormente, foram distribuídos em todos os orifícios 200 ul do conjugado, diluído a 1/320 em solução tampão de fosfatos pH 7,4 contendo 0,05% de tween 20. A seguir a placa foi lavada, durante 3 minutos, por 3 vezes em solução tampão de fosfato contendo tween 20. Foram colocados, em cada orifício, 200 ul de solução de ortofenileno-diamino a 0,4 mg/ml em tampão fosfato-citrato pH 5,0, sendo a placa mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, foram adicionados 25 ul de solução de ácido sulfúrico 2N, a fim de ser interrompida a reação.

2.3.3.2. Teste imunoenzimático para a fração tetânica

Antígenos

Toxina tetânica purificada (Biosys-França)

Conjugado

Foi empregada toxina tetânica conjugada com peroxidase. A conjugação foi realizada de acordo com as instruções que acompanhavam o "Kit" obtido do Laboratô - rio Biosys-França.

Técnica da reação imunoenzimática

As placas que foram utilizadas, que compunham o "kit", foram fornecidas já impregnadas com toxina tetânica. Para a realização do teste, foram depositados 50 ul dos soros de cobaios, a serem testados, nos orifícios da placa. Simultaneamente, em outros orifícios eram colocados os controles positivo e negativo que acompanhavam o "Kit".

Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, as placas eram lavadas com solução tamponada de fosfatos pH 7,4 contendo 0,05 de tween 20 durante 3 minutos. Esta operação foi repetida duas vezes. Foram adicionadas em cada orifício, 50 ul de toxina conjugada, e a seguir a placa foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada, novamente de acordo com o descrito anteriormente. Posteriormente, foram depositados em cada orifício, 500 ul de solu -

ção do substrato (10 ml de tampão fosfato-citrato, 4 mg ortofenilenodiamina, 40 ul de H_2O 3%). Após incubação por 10 minutos, a temperatura ambiente e no escuro, a reação foi interrompida adicionando-se a cada orifício, 0,1 ml de solução de H_2SO_4 2N.

A leitura foi realizada empregando-se um espectrofotômetro - Spectron 88 Bausch & Lomb, comprimento de onda de 435 nm.

2.3.3.3. Imunofluorescência indireta para a fração pertussis

Antígeno

Antígeno de B.pertussis, contendo 10 bilhões de germes/ml (10 UO), produzido no Instituto Butantan.

Conjugado

Foi utilizado IgG total anticobaio em caprino, produzida no Instituto Adolfo Lutz, marcada com isotiocianato de fluoresceína e adicionado de solução de azul de Evans a 10%.

Técnica da reação de imunofluorescência

As lâminas foram sensibilizadas com o antígeno de B.pertussis (10 UO) e secas a temperatura ambiente. Os soros de cobaia foram diluídos inicialmente a 1/16 em solução tampão de fosfatos pH 7,4. Em seguida, a partir desta diluição inicial foi preparada uma série de diluições,

com fator 2, até 1/1024. Foram depositados nas lâminas 0,02 ml de cada diluição de soro, seguido de incubação a 37°C por 30' em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas, em solução tampão de fosfatos pH 7,4 por imersão duas vezes durante 10 minutos. Após a lavagem as lâminas foram enxugadas com papel de filtro. A seguir foram colocadas 0,02 ml do conjugado diluído, segundo o seu título nas áreas de reação. A diluição do conjugado, foi feita em tampão de fosfatos pH 7,4 contendo azul de Evans na proporção de 1 mg%. A lâmina foi incubada por 30 minutos a 37°C.

As leituras foram realizadas em microscopia fluorescente, usando-se filtro BG 12 ou KP 500 como excitadores e filtro 50 com barreira. As reações foram consideradas positivas quando ocorria fluorescência das partículas, especialmente localizadas em sua periferia. Para os soros negativos, as partículas se apresentam não fluorescentes e de cor avermelhada.

2.3.3.4. Teste de tuberculina para BCG

Foi empregado PPD RT 23 10 UI (procedente da Dinamarca). Os testes de tuberculina foram realizados através da inoculação de 0,1 ml de PPD por via intradérmica, na região abdominal, previamente depilada dos cobaias, 45 dias após a vacinação. A leitura dos testes foi realizada após 48 horas, sendo considerada positiva quando ocorria uma endureção igual ou maior a 5 milímetros.

2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada segundo Marascuillo ⁴⁶ (1971).

Anexo I

FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE ANATOXINA DIFTERICA PURIFICADA

Amexo II

FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE ANATOXINA TETÂNICA PURIFICADA

Anexo III

FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DA VACINA PERTUSSIS

Anexo IV

FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DA VACINA BCG LIOFILIZADA

3. RESULTADOS

Tabela 1. Potência da fração pertussis contida na vacina simples e na vacina DPT usando-se como adjuvantes hidróxido de alumínio e BCG.

Os resultados dos testes de proteção para a fração pertussis foram determinados em 8 lotes de vacina tríplice associada ao BCG, comparando-se a fração pertussis simples com a fração pertussis associada à diftérica e tetânica, usando hidróxido de alumínio ou BCG como adjuvante.

Tabela 1. Potência da fração pertussis contida na vacina simples e na vacina DPT usando-se como adjuvante hidróxido de alumínio e BCG., S.P.,1985.

Lotes de Vacinas	PERTUSSIS SIMPLES	DPT	DPT $Al(OH)_3$	DPT + BCG
A	4,0 u/0,1	4,0 u/0,1	12,0 u/0,1	5,0 u/0,1
B	8,0 u/0,1	10,0 u/0,1	9,0 u/0,1	20,0 u/0,1
C	4,0 u/0,1	10,0 u/0,1	12,0 u/0,1	4,0 u/0,1
D	8,0 u/0,1	10,0 u/0,1	9,0 u/0,1	20,0 u/0,1
E	19,0 u/0,1	13,0 u/0,1	18,0 u/0,1	10,4 u/0,1
F	8,0 u/0,1	8,0 u/0,1	7,0 u/0,1	4,0 u/0,1
G	19,0 u/0,1	7,0 u/0,1	6,0 u/0,1	4,0 u/0,1
H	17,0 u/0,1	16,0 u/0,1	13,0 u/0,1	12,0 u/0,1

Tabela 2. Testes de consumo de oxigênio e de vitalidade da vacina associada DPT + BCG.

Verificou-se em 12 lotes de vacina DPT + BCG a vitalidade e o consumo de oxigênio da fração BCG.

Tabela 2. Testes de consumo de oxigênio e de vitalidade da vacina associada DPT + BCG, S.P., 1985.

Lotes de Vacinas	Vitalidade unidades viáveis p/mg	Consumo de O₂ µl/mg/h
A	3.300.000	0,5718
B	2.080.000	0,5814
C	3.200.000	0,5564
D	1.600.000	0,5957
E	1.600.000	0,5516
F	1.200.000	0,5648
G	1.540.000	0,5552
H	1.560.000	0,5302
I	4.200.000	0,5158
J	1.040.000	0,8653
K	1.220.000	0,8091
L	4.180.000	0,8254

Tabela 3. Cobaios inoculados pela via i.d. com vacinas DPT, com e sem Al(OH)₃, associadas ao BCG, de acordo com os resultados da conversão específica.

Foram determinados a soro conversão pelo teste imunoenzimático(ELISA) específica para a fração diftérica e tetânica, reação de imunofluorescência para fração pertussis e reação tuberculina para o BCG.

Tabela 3. Cobaios inoculados pela via i.d., com vacinas DPT com e sem $Al(OH)_3$ associadas ao BCG segundo resultado da conversão específica, S.P., 1935.

Antígenos	Conversão específica	Difteria			Pertussis			Tétano			Tuberculina		
		+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total
DPT $Al(OH)_3^*$ + BCG		34 (97%)	1 (3%)	35	62 (100%)	0	62	61 (98%)	1 (2%)	62	32 (52%)	30 (48%)	62
DPT ^{**} + BCG		33 (85%)	6 (15%)	39	77 (100%)	0	77	61 (98%)	1 (2%)	62	69 (86%)	11 (14%)	80
BCG											23 (77%)	7 (23%)	30

* Contendo formol residual

** D e T purificados

+ positivo

- negativo

Tabela 4. Cobaies inoculados pela via i.d. com antígenos correspondentes as frações diftérica e pertussis com ou sem $Al(OH)_3$, associada ou não ao BCG de acordo com o resultado da conversão específica.

Foi determinada a soro conversão pelo teste imunoenzimático (Elisa) para a fração diftérica, em relação ao antígeno diftérico isoladamente e com hidróxido de alumínio ou BCG, a vacina DPT e a vacina DPT com hidróxido de alumínio ou BCG.

Para a fração pertussis, a soro conversão foi determinada pela reação de imunofluorescência para o antígeno pertussis isoladamente e com hidróxido de alumínio ou BCG, para vacina DPT e para vacina DPT com hidróxido de alumínio ou BCG.

Para o BCG foi determinada a conversão tuberculina, em relação as vacinas D + BCG, P + BCG e BCG isoladamente.

Tabela 4. Cobaíes inoculados com antígenos correspondentes as frações Diftérica e Pertussis com ou sem $Al(OH)_3$, associada ou não ao BCG, segundo resultado da conversão específica*.

Antígeno	Conversão específica								
	Difteria		Total	Pertussis		Total	Tuberculina		Total
	+	-		+	-		+	-	
D	15 (79%)	4 (21%)	19	-	-	-	-	-	-
D+ $Al(OH)_3$	17 (94%)	1 (6%)	18	-	-	-	-	-	-
D + BCG	19 (95%)	1 (5%)	20	-	-	-	12 (60%)	8 (40%)	20
P	-	-	-	19 (95%)	1 (5%)	20	-	-	-
P + $Al(OH)_3$	-	-	-	20 (100%)	0	20	-	-	-
P + BCG	-	-	-	20 (100%)	0	20	16 (80%)	4 (20%)	20
DPT	18 (90%)	2 (10%)	20	18 (100%)	0	18	-	-	-
DPT+ $Al(OH)_3$	19 (100%)	0	19	20 (100%)	0	20	-	-	-
DPT + BCG	17 (85%)	3 (15%)	20	18 (100%)	0	18	18 (100%)	0	18
BCG							16 (80%)	4 (20%)	20

* Toxóide tetânico e diftérico purificados

Tabela 5. Tolerância às vacinações avaliada a través de reação geral em camundongos inoculados pela via intraperitoneal.

Os camundongos foram observados durante 14 dias para a verificação da ocorrência de reação geral causada pelas vacinações.

Tabela 5. Tolerância às vacinações avaliadas através de reação geral em camundongos inoculados pela via intraperitoneal, observados durante 14 dias, S. P., 1985.

Lote Vacina	Pertussis Simples	DPT	DPT Al(OH) ₃	DPT + BCG
A	—	—	—	—
B	—	—	—	—
C	—	—	—	—
D	—	—	—	—
E	—	—	—	—
F	—	—	—	—
G	—	—	—	—
H	—	—	—	—

— Ausência de reação (sem ocorrência de morte, sintomatologia ou alteração de desenvolvimento).

Tabela 6. Tolerância às vacinações avaliadas a través de reações local e geral em cobaias inoculados por via intradérmica.

Os cobaias inoculados com as vacinas DPT Al(OH)₃

+ BCG, DPT + BCG, D; D Al(OH)₃, D + BCG, P, P Al(OH)₃, P + BCG, DPT, DPT + Al(OH)₃, DPT + BCG e BCG, foram observados durante 45 dias para a verificação da presença de reações.

Tabela 6. Tolerância às vacinações avaliadas a través de reação local e geral em cobaios inoculados por via intradérmica, observados durante 45 dias, S. P., 1985.

Vacina	Reação	
	Local	Geral
DPT Al(OH) ₃ + BCG	Eritema, nódulo e necrose	—
DPT + BCG	Eritema e necrose	—
D	—	—
D Al(OH) ₃	Nódulo	—
D + BCG	Necrose	—
P	Eritema	—
P Al(OH) ₃	Eritema e nódulo	—
P + BCG	Eritema e necrose	—
DPT	Eritema	—
DPT Al(OH) ₃	Eritema e nódulo	—
DPT + BCG	Eritema e nódulo	—
BCG	Necrose	—

Figura 1. Correlação entre a vacina DPT+Al(OH)₃ + BCG e DPT + BCG.

Figura 3. Títulos de anticorpos anti-pertussis com relação a diferentes imunógenos.

4. DISCUSSÃO

O interesse quanto a associação de vacinas, aumentou durante a segunda Guerra Mundial, tendo em vista a necessidade da vacinação de soldados no menor tempo possível, evitando-se desta maneira inoculações repetidas.

SELLERS et alii⁷⁴ (1950) usaram uma combinação das vacinas tífica e paratífica A e B (TAB) com os toxóides tetânico e diftérico (TABTD), sem prejuízo na resposta antigênica contra os mesmos. CVJETANOVIC et alii¹³ (1972), procuraram melhorar os esquemas de vacinação, diminuindo o número de doses ou, ainda, associando a vacina DPT à vacina tifóidica, sem perda de antigenicidade para nenhum dos antígenos, mostrando ser a combinação satisfatória.

Os toxóides diftérico e tetânico são considerados proteínas inertes. A potência destes antígenos não se mostraram alteradas quando combinadas a outros antígenos, conforme foi demonstrado em experimentos realizados entre outros por ARAKAWA et alii² (1965); STANFIELD et alii⁷⁵ (1972) e CVJETANOVIC et alii¹⁵ (1972). GULD et alii³⁴ (1978), no entanto, verificaram que a resposta primária e ra baixa para os toxóides diftérico, tetânico e BCG associados, quando comparados com os toxóides contendo hidróxido de alumínio sem BCG, porém, após a inoculação de uma dose de reforço, a resposta era idêntica, empregando-se as duas combinações.

Na presente pesquisa, quanto ao antígeno pertussis, quando combinado, formando a associação DPT + BCG, os resultados mostraram-se satisfatórios tanto na mistura DPT + BCG, quanto na DPT com hidróxido de alumínio, em comparação com a vacina simples, pois, nos testes de potência nunca apresentaram resultados inferiores a 4 UI por dose (Tabela 1), tais valores estão de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION ⁹⁰, 1982).

Verificamos que houve variação nas unidades protetoras da fração pertussis, cujos valores variaram de 4 a 20 unidades. Convém notar que isto é observado com todos os tipos de vacinas estudados, sendo a variação, para a vacina pertussis simples de 4 a 19 unidades, para o DPT de 4 a 16 unidades, para o DPT $Al(OH)_3$ de 6 a 18 unidades e para DPT + BCG de 4 a 20 unidades.

Os números de unidades protetoras constatados para os lotes de vacinas testados não foram constantes, porém, os valores obtidos não invalidam a prova. Isto se deve a que o significado de maior ou menor proteção com a vacina pertussis, em relação ao número maior ou menor de unidades protetoras obtidos, ainda não é conhecido. A este respeito ZAKHAROVA et alii ⁹²(1981) citando outros autores, afirma que a eficácia da vacina é variável, não estando na dependência do número de unidades protetoras.

É fato conhecido que as propriedades antigêni -

cas de vacina pertussis não são aumentadas quando se usa a associação DPT. Porém, podem diminuir diante de concentrações maiores dos demais componentes da combinação, fato este constatado em experimentos realizados em coelhos ou camundongos. O poder protetor da vacina pertussis, varia, também, da mesma maneira, em função da quantidade dos produtos associados, porém, se a concentração da vacina é reduzida abaixo do limite, a capacidade antigênica e o poder protetor são diminuídos (ANDREESCU et alii¹, 1970).

Para o BCG, no presente estudo, através das provas de vitalidade e de consumo de oxigênio realizadas para as diferentes partidas de vacinas associadas, não se constatou efeito deletério para aquela bactéria demonstrando ser possível a combinação BCG + DPT purificado. Porém isto ocorreu, realmente, os antígenos associados não poderiam ter algum efeito sobre o BCG, dado não conterem formol residual (Tabela 2).

É importante, portanto que os toxóides usados na combinação não contenham formol residual, sendo necessário removê-lo na preparação da anatoxina, porque pequena quantidade desta substância terá efeito nocivo sobre o BCG. A suspensão de B.pertussis, também, deve ser preparada de maneira que não contenha preservativo.

GULD et alii³⁴ (1978) em seu estudo verificaram redução do número de bacilos e relatam que na combinação vacina tríplice + BCG, por eles utilizada, poderiam

ter restado traços de formol, com algum efeito deletério sobre o BCG. Entretanto, para os autores o mais importante, foi o cloreto de benzalcônio usado como bacterios_utático nos toxóides o qual não foi removido antes dos ex_uperimentos.

A Organização Mundial da Saúde (WHO⁸⁹, 1979)recomenda considerar uma vacina BCG satisfatória, quando se apresenta com 1.000.000 ou mais de unidades viáveis por mg. Na presente investigação, nos 12 lotes de vacina DPT associada ao BCG, testadas, os números obtidos destas bactérias revelaram-se de acordo com os requisitos mínimos exigidos. Os microorganismos continuaram vivos, mesmo depois de misturados a vacina DPT, tendo sido constatado que partidas de vacinas apresentavam desde 1.040.000 unidades viáveis p/mg até 4.200.000 p/mg. O consumo de oxigênio permaneceu estável, dentro do limite aceitável ou seja, de até 0,5000 µl/mg/h.

Utilizando-se a vacina DPT, como diluente, constituída de toxóides purificados isentos de formol e suspensão de B.pertussis sem preservativo, sendo os antígenos de modo a conter 80 Lf/0,1 ml de toxóide diftérico, 60 Lf/0,1 ml de toxóide tetânico a 10 bilhões de B.pertussis por 0,1 ml, foi possível ressuspender o BCG liofilizado na concentração recomendada. REY et alii⁶⁵(1968) verificaram que toxóides concentrados podem ser utilizados para ressuspensão de vacinas vivas liofilizadas.

Os nossos resultados mostraram ser possível combinar a vacina DPT ao BCG, sem nenhum inconveniente para os quatro antígenos usados, tomando-se, entretanto, o cuidado de não empregar vacina triplíce contendo preservativo ou formol residual (Tabela 3).

Em nossos experimentos, quando se usou a combinação DPT adsorvida pelo hidróxido de alumínio para ressusender o BCG, verificamos que a taxa de conversão tuberculínica foi baixa (52%) devido, provavelmente, à redução do número de bacilos, decorrente da presença do formol residual. A combinação DPT + BCG, usando-se toxóides diftérico e tetânico purificados e portanto, não contendo formol residual, a conversão tuberculínica foi satisfatória (86%) (Tabela 3).

Por outro lado na tabela 4, pode-se verificar que as taxas de conversão tuberculínica para outras combinações de antígenos foram de 60% para D + BCG, 80% para a P + BCG e de 100% para a DPT + BCG, enquanto para o BCG, aplicado isoladamente, a conversão foi de 80%. Estes resultados mostram ser possível a associação DPT + BCG.

A soro conversão, constatada através dos níveis obtidos de antitoxina diftérica e tetânica e de aglutininas anti-pertussis (Tabela 3) demonstrou que o antígeno diftérico produziu conversão na associação DPT $Al(OH)_3$ + BCG de 97% e na DPT + BCG de 85%, sendo a diferença encontrada estatisticamente não significativa. 0

antígeno pertussis nas duas associações, deu conversão de 100% e o antígeno tetânico de 98% para ambas as associações. Estes resultados mostram que não houve prejuízo para nenhum dos antígenos usados e que os mesmos não perderam sua capacidade imunogênica. Estes resultados estão demonstrados na Figura 1.

Na tabela 4, para os antígenos usados isoladamente ou combinados constata-se que, para a fração diftérica, isoladamente, a conversão mostrou-se percentualmente mais baixa do que quando associada: 79% isoladamente, 94% para a combinação com hidróxido de alumínio; 95% quando combinada ao BCG, 90% na DPT, 100% na DPT Al (OH)₃ e 85% na DPT + BCG. Quanto a fração pertussis, os resultados foram de 95% para o antígeno isolado e de 100% para todas as outras combinações. Chamamos a atenção para estes resultados, pois, sabemos que a B.pertussis, tem a propriedade de agir como adjuvante (Tabela 4 e figuras 2 e 3).

A via usual de administração da vacina tríplice (DPT) é a via intramuscular. Porém DICK et alii¹⁸(1966) em ensaios controlados, usando inoculação intradérmica, mostrou que os níveis de anticorpos produzidos eram semelhantes aos obtidos através da administração da vacina por via intramuscular, não tendo sido observada nenhuma reação local.

O toxóide tetânico adsorvido em gel de alumínio e concentrado 400 vezes foi utilizada como diluente da va

cina BCG administrada com "dermo-jet" (REY et alii⁶⁵ 1868). Entretanto BROLIO et alii⁸ (1976) verificaram que a utilização do dermo-jet na vacinação BCG, provoca a morte dos microorganismos devido a pressão, reduzindo, com isto, a taxa de conversão tuberculínica.

A aplicação da vacina tríplice (DPT) não adsorvida e adsorvida em hidróxido de alumínio foi realizada por STANFIELD et alii⁷⁵ (1972) em crianças de 2 a 12 meses de idade, com o "dermo-jet" e comparativamente por via intradérmica aplicada com agulha hipodérmica, sendo a dose utilizada nas inoculações consideravelmente menor que a usada pela via intramuscular. Os autores verificaram que as reações locais observadas foram insignificantes e que os níveis de anticorpos foram satisfatórios, para as frações diftérica e tetânica nas amostras de sangue tomadas depois da aplicação da terceira dose, porém a resposta a fração pertussis não foi pesquisada.

Com o intuito de diminuir o número de doses na imunização com a vacina tríplice, MANGAY-ANGARA et alii⁴⁵ (1980) realizaram, nas Filipinas, um ensaio controlado com, somente, duas doses, sendo a soro conversão, as três frações de antígenos satisfatória.

Os adjuvantes adicionados aos toxóides são necessários para estimular a resposta imunológica nas anatoxinas. Sobre este assunto, VERONESI⁸³ (1966) demonstrou que uma anatoxina tetânica não concentrada, adicionada de

um adjuvante potente como o óleo metabolisável, poderia ser usada em uma única inoculação, tendo obtido uma primeira imunização, com resultado excelente. Infelizmente o emprego destes adjuvantes são limitados. A este respeito segundo a "Organização Mundial da Saúde" esse adjuvante provoca abscessos estéreis devidos a retenção duradoura do óleo nos tecidos e sendo, por este motivo, limitado o seu uso no homem.

A ação adjuvante das bactérias Gram negativas na produção de anticorpos já é conhecida porém, o efeito da B.pertussis como adjuvante quando adicionada ao toxóide diftérico, foi demonstrado por FARTHING et alii²³(1962) em experimentos em cobaia e em crianças. A produção de antitoxina diftérica foi constatada após 28 dias, porém, ocorrendo, a seguir, o declínio do título, de anticorpos. Os autores comentam que a B.pertussis agiu no estímulo primário, e que não houve a absorção entre o toxóide e a vacina pertussis.

SHOENBERG et alii⁷³(1965) observaram que a inoculação intravenosa de toxóide diftérico e adjuvante completo de FREUND em coelhos resultou em uma proliferação celular, estimulando a produção de anticorpos.

Os adjuvantes mais comumente usados, fosfato e hidróxido de alumínio, não aumentam a potência da fração pertussis da vacina tríplice (DPT), contudo, aumentam a potência das frações diftérica e tetânica (CAMERON⁹, 1980),

fato este observado com relação ao hidróxido de alumínio no presente trabalho (Tabela 4).

PITTMAN et alii⁶⁰ (1967) usando toxóide tetânico adsorvido em fosfato de alumínio e toxóide simples, em imunizações realizadas na Nova Guiné, contra o tétano neonatal, obtiveram níveis de anticorpos variando de 197 a 226 unidades com relação ao toxóide adsorvido, aplicado em duas doses, enquanto que com toxóide simples obtiveram níveis de 26 a 36 unidades usando três doses. Embora as mulheres imunizadas com os dois tipos de toxóides tivessem desenvolvido níveis de antitoxina tetânica comparáveis, em duas semanas após a última inoculação, os níveis antitóxicos relativos a vacina simples, começaram a declinar em seis meses, enquanto para os toxóides adsorvidos tais níveis mantiveram-se acima do considerado protetor, (0,01 ua/ml) por dois anos.

UNGAR et alii⁸⁰ (1967) estudaram o efeito potencializador de diversos adjuvantes na produção de anatoxinas, inoculando cobaias e coelhos com toxóide diftérico e tetânico. Verificaram que os toxóides adicionados de adjuvantes revelaram-se superiores aos simples, isto demonstrado pelo aumento dos níveis de anticorpos produzidos após a inoculação da primeira dose, e particularmente, depois da segunda.

PRESTON et alii⁶³ (1974) verificaram que em crianças imunizadas com vacina pertussis simples ou ad-

sorvida em hidróxido de alumínio, pertencentes a mesma partida e administrada em 3 doses, os títulos de aglutininas no soro das inoculadas com vacina adsorvida eram mais elevadas do que nas que receberam vacina simples. Não constatarem, entretanto, diferenças entre os títulos de aglutininas obtidos nos soros das crianças de três a quatro meses de idade que receberam três doses de vacina em intervalos de 1 a 2 meses e naquelas em que a terceira dose de vacina foi aplicada até seis meses depois da segunda dose.

A este respeito os resultados por nós obtidos na presente pesquisa também mostraram não haver diferenças estatisticamente significante entre os títulos de aglutininas observados no soro dos cobaias imunizadas com vacina pertussis simples ou combinada com hidróxido de alumínio ou BCG e revelaram não ser necessário o uso de adjuvantes para obtenção de uma resposta satisfatória. A resposta em termos de soro conversão para a fração pertussis, foi sempre mais elevada que a fração diftérica administrada com hidróxido de alumínio ou BCG, embora para esta fração as diferenças entre os resultados obtidos para os dois adjuvantes usados, não tenham se mostrado, também, estatisticamente significante. Desta maneira, podemos considerar que o BCG pode ser usado como adjuvante da fração diftérica sem apresentar nenhum prejuízo para os demais antígenos combinados ou sejam o toxóide tetânico e a vacina pertussis (Tabela 3 e 4).

Analisando-se a tabela 5 pode-se constatar que em camundongos, usando-se a via de inoculação intraperitoneal, os resultados foram adequados, tendo os animais, durante o período observado, permanecido em bom estado geral, assim como não apresentaram qualquer tipo de reação.

A tabela 6, referente aos ensaios em cobaias, quanto a tolerância para os antígenos inoculados, isoladamente e nas associações DPT, DPT $Al(OH)_3$; DPT + BCG, DPT $Al(OH)_3$ + BCG, verificou-se ausência de reação geral, entretanto, embora sem maior significado constatou-se a presença de reação no local de aplicação das vacinas. Esta reação local caracterizou-se pela formação de nódulo quando o antígeno continha hidróxido de alumínio, eritema quando o antígeno continha a fração pertussis e necrose quando a vacina era adicionada de BCG.

Resultados encorajadores tem sido obtidos com uma vacina pertussis purificada, a qual já vem sendo usada no Japão desde 1981 (SATO et alii ⁷², 1984). É provável que futuramente esta vacina possa substituir, em associações e com vantagens, a vacina pertussis celular, pois é sabido que esta última, usada atualmente, pode produzir efeitos colaterais como, reações locais como eritema, edema e induração, reações sistêmicas como febre, vômito e diarreia e ainda reações mais sérias, como convulsões e choque, embora raramente.

Na presente investigação a associação do BCG à vacina tríplice (DPT) não provocou aumento quanto a ocorrência de reação local ou geral, em comparação com a inoculação do BCG isoladamente, embora, tenha sido constatado o eritema fugaz, devido a fração pertussis (Tabela 6).

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos na presente investigação e na discussão por nós desenvolvidas, acreditamos ter contribuído com algumas informações quanto a possível associação do BCG a vacina tríplice contra a difteria, tétano e coqueluche. Tais informações podem ser sumarizadas nas conclusões que serão abaixo discriminadas.

1. A vacina Tríplice associada ao BCG pôde ser administrada intradermicamente.
2. A vacina Tríplice pode ser usada como diluente da vacina BCG, tendo-se o cuidado de que a primeira não contenha nenhum preservativo.
3. Os toxóides purificados podem ser concentrados e associados ao antígeno pertussis e BCG na dose de 0,1 ml.
4. O BCG na associação com a vacina Tríplice tem dupla finalidade, de antígeno e de adjuvante.
5. Tanto a conversão da prova de tuberculina para o BCG quanto a soro conversão para a vacina Tríplice (DPT) obtidas em animais, foram satisfatórias.
6. A associação do BCG à vacina Tríplice não causou reações locais ou gerais significantes nos animais imunizados por via intradérmica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREESCU, V.; CAFFÈ, I.; MARION, M.; POZSGI, N.; STANICA, E.; STOIAN, C.; KRANZDORF, H. Valeur immunisante du trivacin diphtéro-tétano-pertussis en fonction des variations quantitatives des composants antigéniques. IV. Propriétés immunisantes du composant Pertussis. Arch.roum,Path.exp., 29: 487-92, 1970.
2. ARAKAWA, S.; KANEKO, T.; SEKI, T.; MASUNO, S.; IIJIMA, T.; NORO, T.; IWAKAWA, L.K.; YOSHIDA, Z.; CHANG, C. T.; AKAWA, K.; YAMAMOTO, A.; OGATA, S.; MIYAZAKI, S. A study of diphtheria, pertussis, tetanus and measles combined vaccine. Jap.J.exp.Med., 35(6) : 481-9, 1965.
3. BARROS FILHO, S.D.; ALVIN, B.E.M.; BACIGALUPO, J.F.C. Diphtheria. In: FARHAT, C.K. Fundamentos e prática das imunizações em clínica médica e pediatria. 2ªed. Rio de Janeiro, Livraria Athenei, 1985, p.79-94.
4. BENENSON, A.S. VIII. The present and future of immunization. Prospects of effective control of bacterial diseases by vaccination. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE APPLICATION OF VACCINES AGAINST VIRAL, RICKETTSIAL AND BACTERIAL DISEASES OF MAN. Washington, DC. 14-18 December, 1970, p. 561-5.

5. BIER, O. Bacilos esporulados gram positivo\$. In: BACTERIOLOGIA E IMUNOLOGIA. 16.ed. São Paulo, Melhoramentos/ Ed.da Universidade de São Paulo, 1975, cap. 30, p.548-571.
6. BIER, O. Corinebactérias. In: BACTERIOLOGIA E IMUNOLOGIA. 16.ed. São Paulo, Melhoramentos/Ed.da Universidade de São Paulo, 1975, cap.31, p.572-584.
7. BONFORD, R. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. I - Effect on the antibody response to bovine serum albumin and complete adjuvants, pertussis, muramyl dipeptide and saponin. Clin.exp.Immunol., 39: 426-34, 1980.
8. BROLIO, R.; ALVES, H.A.C. Análise dos resultados de vacinação de crianças pelo BCG intradérmico, com agulha e seringa e com o dermo-jet. Rev. Divisão Nac. Tuberculose, 20 (77): 4-11, 1976.
9. CAMERON, J. The potency of whooping cough (pertussis) vaccines in Canada. J.biol.Stand. 8:297-302, 1980.
10. CHRISTENSEN, H.; KJLBYE, E.; AUNG TUN, U. Effect of simultaneous BCG and Smallpox vaccination in schoolchildren. Report of a WHO-sponsored preliminary study. Bull.Wld.Hlth.Org., 35:633-40, 1966.

11. CHRISTIE, A.B. Immunization against whooping-cough.
Community Hlth, 2 (5): 241-4, 1971.
12. COMSTOCK, G.W. & PALMER, C.E. Long-term results of
BCG vaccination in the southern United States.
Amer.Rēv.resp.Dis., 93: 171-83, 1966.
13. COMSTOCK, G.W. & WEBSTER, R.G. Tuberculosis studies
in Muscogee County, Georgia.Amer .Rēv.resp.Dis.,
100: 839-45, 1969.
14. CSIZER, A.; JOO, I.; ZSIDAI, J.; HEGEDUS, L. Factors
influencing the potency of standard pertussis
vaccines. J.biol.Stand.1: 347-55, 1973.
15. CVJETANOVIC, B.; IKIC, D.; LANE, W.R.; MANHALTER, T.;
TAPA, S. Studies of combined quadruple vaccines
against diphtheria, pertussis, tetanus and typhoid
fever: reactogenicity and antigenicity. Bull.Wld.
Hlth.Org., 46: 47-52, 1972.
16. CVJETANOVIC, B. Programmes d'immunisation. Chron.Wld.
Hlth.Org., 27: 68-9, 1973.
17. DAM, H.G. & PIO, A. Pathogenesis of tuberculosis and
effectiveness of BCG vaccination W.H.O./TRI/ScG/
79-14, 1979.
18. DICK, G. Combined vaccines. Canad publ.Hlth, 57:435
-446, 1966.

19. DOWNHAM, M. Immunisations. Brit.med.J., 1:1063-6, 1976.
20. ELDERING, G.; HORNBECK, C.; BAKER, J. Serological study of Bordetella pertussis and related species. J.Bact., 74(2):133-6, 1957.
21. EDWARDS, M.L. Infection with M.avium intracellulare and the protective effects of bacille Calmette - Guerin. J.infect.Dis., 145:733-41, 1982.
22. FARHAT, C.K. Preceitos Básicos da Imunização. In: FARHAT, C.K. Fundamentos e prática das imunizações em clínica médica e pediátrica. 2a.ed. Rio de Janeiro, Livraria Ateneu, 1985, p.3-7.
23. FARTHING, J.R. & HOLT, L.B. Experiments designed to determine the mechanism of the adjuvant activity of gram-negative organism upon antibody production. J.Hyg., Camb., 60(4):411-26, 1962.
24. FOCACCIA, R. & VERONESI, R. Tétano. In: FARHAT, C.K. Fundamentos e prática das imunizações em clínica médica e pediatria, 2ª ed. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, 1985, p.69-78.
25. FOEGE, W.H. & FOSTER, S.O. Multiple antigen vaccine strategies in developing countries. Amer.trop.Med. Hyg., 23(4): 685-9, 1974.

26. FREUND, J. & BONANTO, M.V. The effect of paraffin oil, lanolin-like substances and killed tubercle bacille on immunization with diphtheric toxoid and bact. typhosum. J.Immunol., 48: 325-34, 1944.
27. FREUND, J. Sensitization with organ specific antigens and the mechanism of enhancement of the immune responses. Journal of allergy, 28: 18-29, 1957.
28. FRIMODT MOLLER, J., et al. Observations on the protective effect of BCG vaccination in a South Indian rural population. Bull.Wld.Hlth.Org., 30 : 545-74. 1964.
29. GALASKA, A. & COOK, R. Neonatal tetanus today and tomorrow. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TETANUS, 7, Copanero (Catanzaro) Italy, September, 10-15 , p.17-8, 1984.
30. GALBRAITH, N.S.; CROSBY, G.; BARNES, J.M.; FERNANDES, R. Simultaneous immunization with BCG, diphtheria-tetanus and oral poliomyelitis vaccines in children aged 13-14. Brit.med.J., 2:193-7, 1971.
31. GATEFF, C.; RELYVELD, E.H., Le GONIDEC, G.; VINCENT, J.; LABUSQUIERE, R.; McNEAN, M.; MONCHICOURT, D.; CHAMBON, L. Etude d'une nouvelle association vaccinale quintuple. Ann.Microbiol., 124:387-409, 1973.

32. GROUPE SCIENTIFIQUE DE L'O.M.S. Adjuvants de l'immunité. Org.mond.Santé Sér.Rapp.techn., n° 595, p. 3 a 16, 1976.
33. GROUPE D'ÉTUDE DE L'O.M.S. Les politiques de vaccination par le BCG. Org.mond.Santé Sér.Rapp.techn. n° 652, 1980.
34. GULD, J.; LADEFOGED, A.; RAMHOJ, W. Combined vaccination with BCG and toxoid antigens. Bull.Wld.Hlth.Org., 56 (6) : 957-64, 1978.
35. HERBERT, W.J. Some investigations into the mode of the water-in-mineral-oil emulsion antigen adjuvants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS OF IMMUNITY, Utrecht, 1966; Symp.Series Immunobiol. Standard., Basel, Karger, 1967, Vol. 6, p.213-20.
36. HERBERT, W.J. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. In: WEIR, DM. Handbook of experimental immunology. London, Blackwell Scientific Publications, 1973, vol.3, app.2, p.A.2.1.A2 , 14.
37. HITZE, K.L. BCG vaccination and chemoprophylaxis in the control of tuberculosis. Trop.Doctor,4: 175-7, 1974.

38. IARIA, S.T. Pesquisa de antígenos aglutinantes "major" 1,2 e 3 em cepas de B.Pertussis, isolados de crianças com coqueluche atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, Brasil. Rev.Saúde pública, S.Paulo, 11 : 410-5, 1977.
39. LAGRANGE, P. Present status of knowledge on immunity in tuberculosis. WHO/TB/80-110, 1980.
40. LESLIE, P.H. & GARDNER, A.D. The phases of Haemophilus pertussis. J.Hyg., 31(3) : 423-34, 1931.
41. LIN, H.T.; HYG, S.M. A study of effect of simultaneous vaccination with BCG and smallpox vaccine in newborn infants. Bull.Wld.Hlth.Org., 33:321-36, 1965.
42. MACIEL, W. Aspectos Históricos, Legais e Econômicos das vacinações. In: FARHAT, C.K. Fundamentos e prática das imunizações em clínica médica e pediátrica. 2a. ed., Rio de Janeiro, Livraria Ateneu, pg. 541-572 , 1985.
43. MACIEL, W. Calendário de vacinações. In: FARHAT, C.K. Fundamentos e prática das imunizações em clínica médica e pediátrica. 2a.ed. Rio de Janeiro, Livraria Ateneu, 1985, p.575-577.
44. MANCLARCK, C.R. & COWELL, J.L. For publication in: Bacterial vaccine. R.Germanier (Ed) academic Press, New York, 1983.

45. MANGAY-ANGARA, A.; FULGENCIO, L.; CASABAL, G.; GUDANI, L.; SUMPAICO, J.; OCAMPO, A.; NAGEL, J.; HAGENAARS, A.M.; VAN HEMERT & COHEN, H. A two-dose schedule for immunization of infants against diphtheria, pertussis and tetanus. J.Biol.Stand., 8: 87-96, 1980.

46. MARASCUILLO, L.A. In: Statistical methods for behavioral science research. New York, McGraw Hill, 1971. p.173-200.

47. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. The prevention of whooping cough by vaccination. Brit.med.J., 2: 1463-70, 1951.

48. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Vaccination against whooping cough. Relation between protection in children and results of laboratory tests. Brit.med.J., 2: 454-62, 1956.

49. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life; first report. Brit.med.J., 1: 413-27, 1956.

50. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis life; second report. Brit.med.J., 2: 379-96, 1959.

51. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life; third report. Brit.med.J., 1: 973-8, 1963.

52. MOODIE, A.S.; CHENG, G.K.K. Concurrent BCG and small-pox vaccination in newborn babies. Tubercle.Lond. .
43: 155-60, 1962.

53. MOORE, D. The history and development of the BCG .
The Practitioner, 227, 1983.

54. MUNOZ, J. & HESTEKIN, B.M. Antigen of Bordetella pertussis. III. The protective antigen. Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine.1963
vol.112, 799-805.

55. ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Stratégies mondiale de la santé pour tous d'ici l'an 2.000, Genève, OMS., 1981. (Santé pour tous, 4).

56. PALLEN, M.J. The immunological and epidemiological significance of environmental mycobacteria on leprosy and tuberculosis control. Int.J.Leprosy ,
52 (2):231-48, 1984.

57. PALMER, C.E. & LONG, M.W. Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. Amer.Rev.resp.Dis.,94: 553-68, 1966.

58. PAUWELS, R.; BAZIN, H.; PLATTEAU, B.; VAN DER STRAETEN, M. The influence of different adjuvants on the production of IgD and IgE antibodies. Ann. Immunol.(Inst.Pasteur) 130:49-58, 1979.

59. PHILLIPS, C.F. Children out of step with immunization.
Pediat.Clin. 55 (6): 751-905, 1975.
60. PITTMAN, M.; BARILE, M.F.; HARDEGREE, M.C. Comparison of human response with laboratory assays of tetanus toxoid with and without adjuvants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF ADJUVANTS OF IMMUNITY, Utrecht, 1966 . Symp. Series Immunobiol. Standard. Basel, Karger, 1967 , vol.6, p.295-302.
61. PRESTON, N.W. Potency tests for Pertussis vaccines: doubtful value of intracerebral challenge test in mice. J.Path.Bact., 91 (1): 173-9, 1956.
62. PRESTON, N.W. Type specific immunity against whooping cough. Brit.med.J., 21: 724-6, 1963.
63. PRESTON, N.W.; MACKAY, R.I.; BAMFORD, F.N.; CROFTS, J. E.; BURLAND, W.L. Pertussis agglutinins in vaccinated children: better response with adjuvant. J. Hyg.Camb., 73, 119-25, 1974.
64. RELYVELD, E.H., Immunological prophylactic and standardization aspects in tetanus. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TETANUS, 7 Copanero (Catanzaro) Italy , September, 10-15, 1984, p.39-42.

65. REY, M.; TRIAU, R.; CANTRELLE, P.; MAR, I.D.; DAUCHY, S.; LAFAIX, C.; ROBIN, Y.; GUEYE, T.; CODJIA, N. L'immunization antitetanique par injection unique d'anatoxine concentrée. Bull.Soc.med.Afr.noire Langue frang., 13 (4) : 852-72, 1968.
66. REY, M. Simultaneous administration of vaccines, ~~Kil~~led or live. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE APPLICATION OF VACCINES AGAINST VIRAL, RICKETTSIAL, AND BACTERIAL DISEASES OF MAN, Washington, DC. 14-18, December, 1970, p.407-12.
67. REY, M. Vaccination contre la diphteria. In: Vaccinations, Paris, Masson, 1980, p.54-57.
68. REY, M. Vaccination conte la coqueluche. In: Vaccinations, Paris, Masson, 1980, p.66-71.
69. RUBEN, F.L.; SMITH, E.A.; FOSTER, S.O.; CASEY, H.L. ; PIFER, J.M.; WALLACE, R.B.; ATTA, A.I.; JONES, W.L.; ARNOLD, R.B.; TELLER, B.E.; SHAIKZ, Z.Q.; LOURIE, E.; EDDINS, D.L.; DOKO, S.M.; FOEGE, W.H. Simultaneous administration of smallpox measles yellow fever and diphteria-pertussis-tetanus antigens to Nigerian children. Bull.Wld.Hlth.Org., 48: 175-81, 1973.

70. SAGAWA, I.; YOSHIDA, K.; SHINTANI, K.; ASANO, S.; HORI, M.; ASANO, T.; KIDA, T.; EGAMI, T.; TSUKADA, Y.; YOSHIDA, Z.; IIJIMA, T.; HONDA, T.; MASUNO, S.; OE, K.; ARAI, M.; AKAMA, K.; YAMAMOTO, A.; IIDA, T.; OGATA, S.; MIYAZARI, S.; KANEKO, T.; ARAKAWA, S. Inoculation with D (Diphtheria), P (Pertussis), T (Tetanus), M (Measles) or DPTMV (Vaccinia) Combined Vaccine. Z. Immun. Allerg. Klin. Immunol., 140:440-56, 1970.
71. SATO, Y.; COWELL, J.L.; SATO, H.; MANCLARCK, C.R. Separation and purification of the hemagglutinins from Bordetella pertussis. Infect Immun. 41:313-320, 1983.
72. SATO, Y.; KIMURA, M.; FUKUMI, H. Development of a Pertussis component vaccine in Japan. Lancet, 122 - 6, 1984.
73. SCHOENBERG, M.D.; STAVITSKI, A.B.; MOORE, R.D.; FREEMAN, M.J. Cellular sites of synthesis of rabbit immunoglobulins during primary response to diphtheria toxoid - FREUND'S adjuvant. J.exp.Med., 121:577-91, 1965.
74. SELLERS, A.H.; CALDBICK, G.D.; FRASER, D.T.; BROWN, M.H.; MOLONEY, P.J. The use of a combined antigen-TABTD. Canad.J.publ.Hlth., 41(4):141-5, 1950.
75. STANFIELD, J.P.; BRACKEN, P.M.; WADDELL, K.M.; GALL, D. Diphtheria-tetanus-pertussis immunization by intradermal jet injection. Brit.med.J., 2: 197-9, 1972.

76. STANFORD, J.L. & ROOK, G.A.W. Environmental mycobacteria and immunization with BCG. In: EASMON, C.S.F. & JELJASZEWICZ, J. Medical microbiology immunization against bacterial disease, 1983, v.2., p.43-69.
77. TAKANO, K. Immunological prophylactic and standardization aspects in tetanus. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TETANUS, 7 Copanero (Catanzaro) Italy, September, 1984, p.39-42.
78. TUBERCULOSIS prevention trial, Madras, Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention. Indian J.med.Res., 72 suppl. 1-74, 1980.
79. UBATUBA, A. & SALMITO, A. Bacteriologia da coqueluche. II. Determinação dos fatores aglutinantes "major" nas amostras de Bordetella pertussis isolados no Rio de Janeiro. Hospital, Rio de Janeiro, 78: 1301-10, 1970.
80. UNGAR, J.; HEITZ, R.; RENKER, H. Serological responses and sensivity reactions in guinea pigs inoculated with Diphteria and tetanus toxoids with and without adjuvants. Sump.Series immunobiol.Standard, 6: 303-316, 1967.
81. VAUGHAN, J.P.; LINDOVIST, K.; BROOKE, D.; DOYLE, R.F. Combined BCG and smallpox immunization: A preliminary report on a method using the W.H.O.bifurcated needle. Afr.med.J., 49:207-12, 1972.

82. VAUGHAN, J.P.; MENU, J.P.; LINDOVIST, K.J.; VENNEMA, A.
A trial with a mixed BCG/smallpox vaccine given intradermally. J.trop.med.Hyg., 76:262-4, 1973.
83. VERONESI, R. Importance of the jet injector in mass immunization, projects in Brasil. Results with antitetanus and smallpox vaccines. Rev.Hosp.Clin.Med. 21:92-95, 1966.
84. VERONESI, R. Naturally acquired tetanus immunity: still a controversial theme? In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TETANUS, 7, Copanero (Catanzaro) Italy, September 10-15, 1984, p.20.
85. YAMAMOTO, A.; KAMEYAMA, S.; KONDO, S.; MURATA, R. Studies on adjuvants for human prophylactics. III. Comparison of adjuvanticity in different animal species. Jap.J.med.Sci.Biol., 32:207-17, 1979.
86. YOUMANS, G.P. & YOUMANS, A.S. Recent studies on acquired immunity in tuberculosis. Curr.Top.Microbiol.Immunol., 48 : 129-78, 1969.
87. WARDLAW, A.C. & PARTON, R. Pertussis vaccine. In: EASMON, C.S.F. & JELJASZEWICZ, J., Medical microbiology immunization against bacterial disease, 1983, v.2, p. 207-53.

88. WEHRLE, P.F. Current immunization methods and precautions. Calif.Med., 101:153-9, 1964.
89. WHO Technical Report Series, n° 638, Geneva, 1979.
90. WHO. Manual of details of tests required on final vaccines used in the WHO expanded programme of immunization. BLG/UNDP/82.1, 1982.
91. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Immunological research in tuberculosis. Memorandum from a WHO meeting. Bull.Wld.Hlth.Org., 60 (5): 723-7, 1982.
92. 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 URSS and some other countries. J.Hyg.Epidem., Praha, 25: 439-48, 1981.