

TATIANE QUEIROZ ZORZETO

**RESPOSTA HUMORAL E CELULAR DE LACTENTES
VACINADOS COM PERTUSSIS CELULAR TOTAL
OU MODIFICADA PELA EXTRAÇÃO
DE LIPOPOLISSACARÍDEO**

CAMPINAS

Unicamp

2008

TATIANE QUEIROZ ZORZETO

**RESPOSTA HUMORAL E CELULAR DE LACTENTES
VACINADOS COM PERTUSSIS CELULAR TOTAL
OU MODIFICADA PELA EXTRAÇÃO
DE LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADORA: PROF^a DR^a MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Z78r Zorzeto, Tatiane Queiroz
Resposta humoral e celular de lactentes vacinados com pertussis
celular total ou modificada pela extração de lipopolissacarídeo /
Tatiane Queiroz Zorzeto. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Maria Marluce dos Santos Vilela
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Coqueluche. 2. Vacina. 3. Imunidade. I. Vilela, Maria
Marluce dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Humoral and cellular response in infants vaccinated with whole-cell pertussis or modified cellular pertussis with low lipopolysaccharide content

Keywords: • Whooping Cough
• Vaccine
• Immunity

Titulação: Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

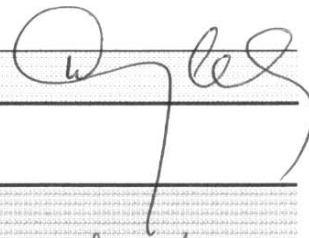
Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela
Prof Dr Ronei Luciano Mamoni
Prof Dr Francisco Eulógio Martinez

Data da defesa: 21 - 02 - 2008

Banca Examinadora da tese de Mestrado

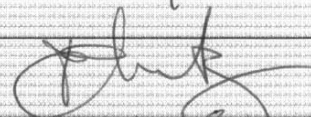
Orientadora:

Prof.(a) Dr.(a) Maria Marluce dos Santos Vilela

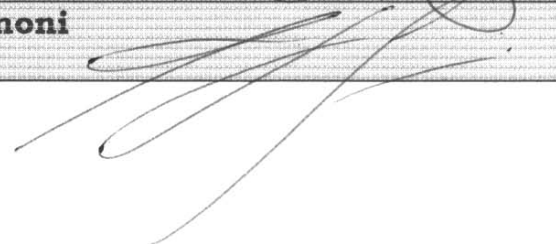


Membros:

1. Prof. Dr. Francisco Eulogio Martinez



2. Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni



**Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 2008

DEDICATÓRIA

*A meus pais, José Carlos e Marcia,
e minha “Dona Vó” querida.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela, pela confiança em mim depositada, pela sabedoria e generosidade.

Ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva, por sempre estar gentilmente disponível, pela valiosa contribuição nas análises de citometria de fluxo e no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. André Moreno Morcillo, pela colaboração na realização da análise estatística, pelo exemplo de profissionalismo e de conduta ética.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Stephano, pela presteza e auxílio no cálculo dos títulos de anticorpos antipertussis.

À Dr^a Hisako Gondo Higashi e ao Dr. Isaías Raw, pelo fornecimento das vacinas e viabilização do projeto.

Aos professores Dr. Ronei Mamoni Luciano e Dr. Francisco Eulógio Martinez, por aceitarem integrar a Banca Examinadora desta dissertação de Mestrado.

À Emília Faria Carniel e aos funcionários das Unidades Básicas de Saúde, pela dedicação ao trabalho de campo.

Às meninas do Laboratório de Imunologia Pediátrica, CIPED – UNICAMP, pela amizade e colaboração em todas as etapas deste estudo. À Taís Nitsch Mazzola, por me guiar até o CIPED e acompanhar meus primeiros passos no laboratório, e, em especial, à Simone Corte Batista Souza Lima e à Vanessa Domingues Ramalho, meus braços direito e esquerdo na bancada.

À Simone Cristina Ferreira, Milton César Souza, Tathiane Krahenbuhl e toda equipe do CIPED, pelo convívio e prontidão para ir além de suas obrigações.

À minha família, pelo apoio e incentivo permanentes, por me fazer acreditar que sempre é possível dar um passo a mais e seguir em frente, mesmo em momentos repletos de dificuldades.

Ao meu namorado, Gustavo Toresin Fava, pelo imensurável significado em minha vida, pelo companheirismo, dedicação e paciência.

A todos aqueles que participaram deste trabalho e cujos nomes deixo de citar, mas que ao lerem estas palavras incorporarão meus sinceros agradecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado.

*The important thing is not to stop questioning.
Curiosity has its own reason for existing.*

ALBERT EINSTEIN

	PÁG.
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1- INTRODUÇÃO.....	18
2- OBJETIVOS.....	25
3- SUJEITO E MÉTODOS.....	27
3.1- Desenho do estudo.....	28
3.2- População de estudo.....	28
3.3- Vacinas.....	28
3.4- Esquema de vacinação.....	29
3.5- Monitoramento de eventos adversos.....	29
3.6- Coleta de sangue.....	30
3.7- Titulação de anticorpos.....	30
3.7.1- Antipertussis.....	30
3.7.2- Antidifteria e tétano.....	30
3.7.3- Anti-hepatite B.....	31
3.8- Hemograma.....	31
3.9- Fenotipagem de linfócitos T em sangue total.....	31
3.10- Antígenos utilizados em cultura.....	31
3.11- Proliferação linfocitária <i>in vitro</i>	32
3.12- Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura.....	34
3.13- Análise estatística.....	35

4- RESULTADOS.....	36
4.1- População de estudo.....	37
4.2- Título de anticorpos antipertussis.....	38
4.3- Resposta humoral aos componentes tétano, difteria e hepatite B.....	39
4.4- Hemograma.....	41
4.5- Fenotipagem de linfócitos T em sangue total.....	43
4.6- Proliferação <i>in vitro</i> de linfócitos T.....	43
4.7- Produção de citocinas no sobrenadante.....	45
5- DISCUSSÃO.....	50
6- CONCLUSÃO.....	57
7- ASPECTOS ÉTICOS.....	59
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9- ANEXOS.....	72
Anexo 1- Monitoramento de eventos adversos.....	73
Anexo 2- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	77
Anexo 3- Roteiro para entrevista de acolhimento.....	79
Anexo 4- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
10- APÊNDICES.....	84
Apêndice 1- Trabalhos apresentados em Congresso.....	85
Apêndice 2- Equipe responsável pelo estudo.....	87
Apêndice 3- Suporte financeiro.....	89

	PÁG.
Tabela 1- Distribuição dos lactentes vacinados com pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP) quanto à idade (em meses) ao receber as três doses de vacina e no momento da coleta de sangue.....	37
Tabela 2- Título geométrico médio (TGM) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) de anticorpos IgG anti-PT de lactentes vacinados com três doses de pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).....	38
Tabela 3- Porcentagens e intervalos de confiança de 95% de sujeitos que receberam três doses de pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP) e responderam aos componentes tétano, difteria e hepatite B.....	40
Tabela 4- Valores hematológicos de 203 lactentes aos sete meses de idade, após terem recebido três doses de vacina pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).....	42
Tabela 5- Contagem de leucócitos e de suas subpopulações em sangue total ($10^{12}/L$) de 203 lactentes aos sete meses de idade, após terem recebido três doses de vacina pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).....	42
Tabela 6- Porcentagem de linfócitos T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ em amostras de sangue total de lactentes de sete meses de idade que receberam três doses de pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).....	43

Tabela 7-	Mediana das porcentagens de blastos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e γδ ⁺ em cultura de células mononucleares de sangue periférico incubadas por seis dias em meio RPMI sem estímulo (controle negativo), com <i>B. pertussis</i> inativada ou fitohemaglutinina (PHA), de lactentes vacinados com três doses pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).....	46
------------------	--	----

	PÁG.
Figura 1- Análise, por citometria de fluxo, da proliferação de células T basal (controle negativo) e sob estímulo da <i>B. pertussis</i> ou da fitohemaglutinina (PHA). As células com marcação positiva para CD3 (A) foram separadas em linfócitos pequenos (destacados em verde) e blastos (amarelo) por suas características de tamanho (<i>forward light scatter</i>) e granulosidade (<i>side light scatter</i>) (B).....	33
Figura 2- Intervalo de Confiança de 90%, representado pela barra horizontal, da razão entre os títulos geométricos médios (TGM) de anticorpos antitoxina pertussis de lactentes imunizados com pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP) (TGM_{DTPm} / TGM_{DTP}). A linha tracejada vertical corresponde à margem de não-inferioridade.....	39
Figura 3- Intervalo de Confiança de 90%, representado pela barra horizontal, da diferença entre as proporções de sujeitos imunizados com pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP) que responderam aos componentes tétano, difteria e hepatite B. A linha tracejada vertical corresponde à margem de não-inferioridade.....	41
Figura 4- Porcentagem líquida de blastos CD3+ em cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de lactentes vacinados com três doses de pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP), após seis dias de estímulo com células inativadas de <i>B. pertussis</i> (Bp: ■) ou com fitohemaglutinina (PHA: ▲). As barras indicam os valores de mediana n: número de indivíduos *: diferença significativa.....	44

- Figura 5-** Concentração de IL-10 em pg/mL no sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico em cultura sem estímulo (controle: ■), com *B. pertussis* inativada (Bp: ▲) ou fitohemaglutinina (PHA: ●), de lactentes vacinados com três doses pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP). As barras representam valores de mediana..... 47
- Figura 6-** Concentração de TNF- α em pg/mL no sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico em cultura sem estímulo (controle: ■), com *B. pertussis* inativada (Bp: ▲) ou fitohemaglutinina (PHA: ●), de lactentes vacinados com três doses pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP). As barras representam valores de mediana..... 48
- Figura 7-** Concentração de IFN- γ em pg/mL no sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico em cultura sem estímulo (controle: ■), com *B. pertussis* inativada (Bp: ▲) ou fitohemaglutinina (PHA: ●), de lactentes vacinados com três doses pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP). As barras representam valores de mediana..... 49

RESUMO

A associação temporal de eventos adversos de variada gravidade à imunização com pertussis celular total (DTP) tem estimulado o desenvolvimento de vacinas antipertussis menos reatogênicas. Este ensaio clínico fase I visou à avaliação da imunogenicidade da vacina pertussis celular modificada pela extração do lipopolissacarídeo (DTPm) em comparação com a vacina convencional (DTP). Um total de 234 lactentes foi imunizado aos dois, quatro e seis meses de idade com DTPm ou DTP. Os títulos de anticorpos para os componentes pertussis, tétano, difteria e hepatite B foram determinados um mês após a terceira dose de vacina. A proliferação de células T CD3⁺ foi avaliada por citometria de fluxo após seis dias de cultivo de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com células inativadas de *B. pertussis* ou com fitohemaglutinina (PHA). Células CD4⁺, CD8⁺ e TCR $\gamma\delta$ ⁺ foram identificadas no *gate* de blastos. Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 no sobrenadante de cultura foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA). A vacina modificada DTPm mostrou-se inferior à DTP quanto ao título de anticorpos antipertussis, mas não houve diferença de resposta aos outros componentes vacinais avaliados. A porcentagem líquida de blastos sob estímulo da *B. pertussis* foi menor no grupo que recebeu três doses de DTPm (mediana de 3,9% para DTPm e 6,2% para DTP, $p=0,029$), mas as frequências de células CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$ ⁺ em proliferação e as concentrações de citocinas não diferiram entre os grupos. A vacina DTPm não apresentou, portanto, imunogenicidade similar à da vacina DTP convencional nos ensaios laboratoriais.

ABSTRACT

Concerns about systemic reactions after immunization with whole-cell pertussis (wP) have stimulated efforts to produce less reactogenic vaccines. This phase I comparative trial aimed the efficacy evaluation of a cellular pertussis vaccine with low lipopolysaccharide (LPS) content (wP_{low}) in comparison to conventional wP vaccine. A total of 234 infants was vaccinated at 2, 4, and 6 months with conventional wP or wP_{low}. Serum antibody titers to pertussis, diphtheria, tetanus and hepatitis B were measured 1 month after the third dose of vaccine. Proliferation of CD3+ T cells was evaluated by flow cytometry after 6 days of peripheral blood mononuclear cells culture, with heat-killed *B. pertussis* or phytohemagglutinin (PHA) stimulation. CD4+, CD8+ and TCR $\gamma\delta$ + cells were identified in the gate of blast lymphocytes. IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-10 levels in supernatants were determined by ELISA. wP_{low} was inferior to wP in terms of anti-pertussis titers, but there was no difference in other serum antibody evaluations. Net percent blasts in cultures with *B. pertussis* was lower in the group vaccinated with wP_{low} (medians of 3.9% and for wP_{low} and 6.2% for wP; p=0.029), but the frequency of proliferating CD4+, CD8+ and $\gamma\delta$ + cells and the cytokine concentrations in supernatants were similar between vaccination groups. Therefore, wP_{low} wasn't as immunogenic as conventional wP in experimental evaluations.

1- INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de sete milhões de lactentes morrem anualmente por infecções antes de completar o primeiro ano de vida, sendo que as causas mais comuns são doenças do trato respiratório e diarreias, causadas tanto por patógenos virais quanto bacterianos (WHO, 2004).

A vacinação em massa representa a estratégia de maior sucesso e melhor custo-benefício para prevenir essas doenças, diminuindo drasticamente as taxas de morbidade e mortalidade. A eliminação do agente infeccioso, principal objetivo dos programas de imunização, é teoricamente possível para qualquer patógeno que não possua outro reservatório, seja animal ou ambiental. Esse objetivo já foi alcançado com a varíola há mais de duas décadas e a poliomielite, cuja vacina foi aprovada somente em 1955, está também muito próxima da erradicação (Del Giudice, 2003).

Pertussis ou coqueluche, popularmente conhecida como “tosse comprida”, é uma doença aguda do trato respiratório que afeta exclusivamente seres humanos, causado pelo coco-bacilo Gram-negativo *Bordetella pertussis*. Apesar de poder ocorrer em indivíduos de qualquer idade, é entre lactentes com menos de seis meses que são encontradas as maiores taxas de morbidade e mortalidade (Von König *et al.*, 2005). Cerca de 50 milhões de casos de pertussis e 300 mil óbitos ocorrem mundialmente a cada ano (Tan *et al.*, 2005) e estima-se que 90% desses aconteçam em países em desenvolvimento (WHO, 2001).

A despeito da ampla cobertura vacinal e da eficiência das vacinas utilizadas, a incidência de pertussis na maioria dos países desenvolvidos tem apresentado, nos últimos anos, crescimento em todas as faixas etárias (Campins-Martí *et al.*, 2001; Luz *et al.*, 2003). De acordo com Edwards (2005), um total de 11647 casos foi reportado ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos no ano de 2003, representando a maior incidência desde 1964. Assim como em outros países, como Canadá (Millord, 1995), Austrália (Andrews *et al.*, 1997) e Holanda (Melker *et al.*, 2000), o maior crescimento foi verificado nos grupos de adolescentes e de bebês com idade insuficiente para terem recebido as três doses iniciais da vacina.

A perda da imunidade adquirida entre adolescentes e adultos, a utilização de novos métodos de diagnóstico, a melhoria dos sistemas de vigilância epidemiológica e a emergência de novas variantes de *B. pertussis* são algumas das hipóteses sugeridas para explicar a atual reemergência de pertussis nesses países (Hijnen *et al.*, 2004).

Os esforços para se imunizar de maneira eficaz contra pertussis foram iniciados tão logo Bordet e Gengou (1906) tenham isolado o agente causador da doença. A primeira vacina contra a pertussis foi desenvolvida por Kendrick e colaboradores na década de 40. Essa vacina é composta por células bacterianas inteiras, obtidas a partir de centrifugação ou filtração da cultura de *B. pertussis* em meio líquido e, posteriormente, submetidas à inativação com formaldeído, timerosal ou tratamento térmico (Baker, 2004).

Por várias décadas, essa vacina celular, como componente da tríplice bacteriana (DTP), tem sido empregada nos programas de vacinação recomendados pela Organização Mundial da Saúde, reduzindo consideravelmente o impacto da doença em escala mundial. Em 2003, a utilização dessa vacina nos países em desenvolvimento preveniu cerca de 38 milhões de casos e 600 mil mortes entre crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2005).

No Brasil, a vacinação em massa contra a pertussis foi estabelecida pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI), em 1973 (Fundação Nacional de Saúde, 1993) e a vacina tríplice bacteriana, difteria-tétano-pertussis (DTP), produzida pelo Instituto Butantan tem sido empregada desde 1992. Embora as estatísticas oficiais demonstrassem taxas de cobertura inferiores a 75% até o início da década de 90 (Miranda *et al.*, 1995), nos últimos anos houve uma melhora sensível da cobertura vacinal, tendo-se alcançado uma taxa de 97,58% em 2001 (Base de Dados do SN-PNI). Conseqüentemente, o número de casos anuais, que era cerca de 40 mil na década de 80, caiu para menos de dois mil no final do século (Fundação Nacional de Saúde, 2002).

A vacina celular, entretanto, tem sido associada a eventos adversos de variada gravidade. Reações locais como eritema, inchaço e dor, febre e agitação são observadas a cada 2-10 injeções, enquanto choro prolongado e episódios hipotônico-hiporresponsivos são verificados a cada 100 e 2000 injeções, respectivamente. Raramente ocorrem casos de

encefalopatia aguda (<1 em 10,5 milhões) em associação temporal com a administração da vacina celular (WHO, 1999).

Nas décadas de 70 e 80, críticas à segurança da vacina DTP celular determinaram um declínio da cobertura vacinal e até mesmo a exclusão dessa vacina dos programas de imunização de alguns países, como Inglaterra (Cherry, 1984), Suécia (Romanus *et al.*, 1987) e Japão (Kanai, 1980). Como resultado, a incidência de pertussis aumentou para mais de 100 casos por 100 mil indivíduos nesses países (Ivanoff e Robertson, 1997), incentivando, dessa forma, a busca por uma nova geração de vacinas menos reatogênicas (Braun *et al.*, 2000; Donnelly *et al.*, 2001; Geier e Geier, 2004).

A primeira vacina acelular foi desenvolvida no Japão, através da separação, purificação e inativação com formaldeído de dois antígenos da *B. pertussis*: a toxina pertussis e a hemaglutinina filamentosa (Sato *et al.*, 1984). Em 1981 essa vacina foi licenciada para imunização de crianças com mais de dois anos e, em 1989, para lactentes acima de três meses. A primeira combinação DTP acelular foi introduzida nos EUA em 1991 como alternativa para o reforço de crianças que já haviam recebido as três doses de DTP celular do esquema básico (Miller, 1999). Atualmente, a vacinação com pertussis acelular a partir dos dois meses de idade, com ou sem os toxóides diftérico e tetânico, já faz parte do programa de vacinação de diversos países (Donnelly, 2001).

De maneira geral, todas as vacinas acelulares atualmente em uso contêm a toxina pertussis (PT), principal fator de virulência da *B. pertussis* (Parton, 1999), inativada e em diferentes concentrações, mas variam na inclusão e concentração de outros antígenos como hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN), uma proteína não-fimbrial denominada de proteína de 69kD de membrana externa, aglutinógenos (FIM tipo 2 e 3), fator de colonização de traquéia (TCF) e outros (Committee on Infectious Diseases, 1997).

Em um estudo conduzido em 1991 e 1992, foram avaliadas a segurança e a imunogenicidade de 13 vacinas acelulares na Suécia, Alemanha e Itália. Os eventos adversos após a administração dessas vacinas foram significativamente menos frequentes e menos graves que aqueles associados com as vacinas celulares (Committee on Infectious

Diseases, 1997). Um teste de campo realizado nos Estados Unidos, em 1995, também demonstrou que as vacinas acelulares eram seguras e eficientes (Miller, 1999).

A reatogenicidade aumentada das vacinas celulares pode ser explicada pelo fato de que essas vacinas contêm 3000 diferentes proteínas, enquanto as vacinas acelulares são compostas por somente duas a cinco proteínas altamente purificadas (Geier e Geier, 2004).

Além disso, as vacinas celulares possuem uma concentração de lipopolissacarídeo (LPS) de 10 a 2900 vezes maior que a concentração encontrada nas vacinas acelulares (Geier e Geier, 2002). O reconhecimento do LPS pelo complexo TLR4-MD2-CD14 inicia uma complexa cascata de transdução de sinais, que leva à ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e ao aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF) (Miller *et al.*, 2005).

A ligação do lipídio A, única região do LPS reconhecida pelo sistema imune, ao domínio extracelular do receptor leva à associação intracelular do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) ao domínio citosólico do TLR4, e ao posterior recrutamento das quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK1 e IRAK6) e do fator associado ao receptor de TNF (TRAF6). Através de uma série de etapas intermediárias, o complexo kinase I κ B (IKK) é fosforilado e, por sua vez, fosforila I κ B, permitindo que o fator NF- κ B seja translocado ao núcleo (Miller *et al.*, 2005).

O lipídio A é uma molécula altamente imuno-estimulatória, mesmo em baixas concentrações. Evidências sugerem que essa endotoxina, além de ser um fator pirogênico (Ishida *et al.*, 1989), pode estar também relacionada aos efeitos neurológicos observados após a exposição local a bactérias inativadas (Donnelly *et al.*, 2001). Loscher e colaboradores (2000) observaram que as concentrações de IL-1 β aumentam significativamente no hipocampo após a administração subcutânea da vacina celular ou somente do LPS. Simultaneamente, verificou-se também um aumento da atividade da quinase ativada por estresse e c-Jun-N-terminal (JNK), e uma diminuição da liberação de glutamato. Essas observações são consistentes com a hipótese de que a IL-1 β , induzida em

resposta ao LPS presente nas vacinas celulares, é capaz de mediar certas reações neurológicas decorrentes da imunização com DTP celular.

Contudo, tanto as vacinas celulares quanto acelulares não são capazes de induzir uma resposta imune protetora logo após a primeira dose, aos dois meses de idade, deixando uma janela aberta para a infecção nos primeiros seis meses de vida (Jefferson *et al.*, 2003). Os recém-nascidos e crianças que ainda não completaram o esquema básico de imunização representam o grupo de maior risco para desenvolver a forma clínica da doença e apresentar complicações que podem ameaçar a vida (Edwards, 2005). Em São Paulo, 94% dos casos confirmados de pertussis em 2000 ocorreram em menores de seis meses e 60% em menores de dois meses. A letalidade foi de 1% em menores de dois meses e 0,5% em crianças entre dois e 11 meses de idade (Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2001). Essas observações reforçam a importância desse grupo etário para a vigilância da infecção.

Além disso, o aumento do número de casos em adolescentes e adultos em populações imunizadas indica que a imunidade induzida pela vacina está abaixo do nível de proteção nesses grupos etários (Minh *et al.*, 1999; Dworkin, 2005; Hewlett e Edwards, 2005). Um estudo epidemiológico desenvolvido por Bisgard e colaboradores (2004) demonstrou o papel da família como reservatório e fonte de infecção para lactentes não completamente imunizados. O resultado da análise de 264 casos mostrou que em 32% desses casos a mãe era a fonte de infecção e em 43%, outro membro da família.

Desse modo, torna-se indiscutível a importância de reforçar a imunização de adolescentes e adultos, como forma de prevenir a transmissão de *B. pertussis* para os recém-nascidos e crianças que ainda não completaram o esquema básico de imunização. Entretanto, a alta reatogenicidade das vacinas celulares convencionais impede o seu uso como dose de reforço em indivíduos com mais de seis anos de idade (Immunization Practices Advisory Committee, 1991).

As vacinas acelulares, porém, parecem ser adequadas para essa finalidade (Pichichero, 2005). De fato, em resposta à atual mudança de epidemiologia da pertussis, a implementação de programas de imunização de adolescentes com essas vacinas já tem sido feita em alguns países como Alemanha, Austrália e Canadá (Halperin, 2005).

No entanto, devido ao elevado custo de produção das vacinas acelulares, essa estratégia não se demonstra adequada à realidade do Brasil e de outros países em desenvolvimento (Davis, 2005; Hay e Ward, 2005). Por essa razão, o Instituto Butantan desenvolveu uma vacina celular potencialmente menos reatogênica, preparada a partir de células de *B. pertussis* tratadas com solvente orgânico para extração do LPS de membrana. A vantagem inicial dessa vacina celular modificada (DTPm) está no baixo valor agregado do produto final e o presente trabalho se propôs a investigar se sua imunogenicidade é similar a da vacina tríplice (DTP) inclusa no calendário nacional de imunizações brasileiro.

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a resposta humoral e celular específica para *B. pertussis* de lactentes imunizados com a vacina tríplice celular com componente pertussis modificado pela extração de lipopolissacarídeo de membrana (DTPm) e compará-la com o grupo controle, vacinado com a tríplice celular convencional (DTP).

Objetivos específicos

1. Determinar o título sérico de anticorpos IgG antitoxina pertussis (PT);
2. Avaliar a resposta de anticorpos IgG aos toxóides tetânico e diftérico e ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B;
3. Analisar, após seis dias de cultivo de células mononucleares de sangue periférico, a proliferação *in vitro* de linfócitos T CD3⁺ sob estímulo específico de uma suspensão inativada de *B. pertussis*;
4. Quantificar a produção de IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico estimuladas por 48 horas com uma suspensão inativada de *B. pertussis*.

3- SUJEITO E MÉTODOS

3.1- Desenho do estudo

Para avaliar a imunogenicidade da vacina pertussis celular modificada, foi conduzido um ensaio clínico controlado, randomizado e duplo-cego no período de agosto de 2006 a julho de 2007.

3.2- População de estudo

Lactentes com idade inferior a dois meses foram recrutados em sete Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município de Campinas – SP: Anchieta, São José, DIC III, Florence, Valença, São Quirino e Taquaral. Em princípio, todos os lactentes eram elegíveis à participação do estudo. Os critérios de exclusão foram:

- peso de nascimento igual ou inferior a 2,5 kg;
- idade gestacional igual ou inferior a 34 semanas;
- mãe portadora de sorologia positiva para HIV, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus e/ou rubéola;
- história pessoal de crise convulsiva ou doença neurológica;
- portador de malformação congênita, doença genética ou condição clínica grave;
- utilização prévia de imunossupressores, imunoglobulina intravenosa ou transfusão de hemoderivados.

3.3- Vacinas

Ambas as vacinas utilizadas nesta pesquisa foram produzidas e fornecidas pelo Instituto Butantan. Cada dose de 0,5mL de vacina era composta por antígeno pertussis equivalente a 4UI, antígenos diftérico e tetânico suficientes para a indução de 2UI de antitoxina em cobaia, até 1,25mg de hidróxido de alumínio e até 0,2mg de timerosal em solução fisiológica tamponada em pH 6,4. Ambas as vacinas eram visualmente indistinguíveis e foram rotuladas apenas como “1” ou “2”. Ao concordar em participar do

projeto, cada lactente recebeu uma ficha, em envelope lacrado, com a informação de qual vacina deveria ser administrada.

Para formulação da vacina pertussis celular modificada, a cepa liofilizada 137 foi ressuspensa em meio de Stainer & Scholte modificado, semeada em tubos com o meio Bordet-Gengou e incubada a 35°C. Os crescimentos bacterianos foram, então, inoculados em meio líquido Stainer & Scholte modificado e mantidos a 35°C sob agitação a 150rpm até obtenção de quantidade suficiente de células.

O cultivo foi destoxificado pela adição de solução de formaldeído a 0,2% e a suspensão celular foi submetida à filtração tangencial (0,22µm), de forma a se obter a biomassa de *B. pertussis*. Por fim, as células foram tratadas com solvente orgânico e submetidas a um extenso processo de lavagem para retirada do lipopolissacarídeo (LPS) de membrana. Foram realizados testes de pureza durante todo o processo para avaliar a presença de microorganismos contaminantes. Embora ainda não publicados, os resultados de testes pré-clínicos realizados pelo Instituto Butantan demonstraram que a vacina modificada é segura para imunização de seres humanos.

3.4- Esquema de vacinação

Os lactentes de ambos os grupos receberam três doses de vacina tríplice bacteriana difteria-tétano-pertussis (DTP), com a vacina para *Haemophilus influenza* tipo B (HiB) adicionada à seringa e aplicada por via intramuscular no vasto lateral da coxa esquerda, aos dois, quatro e seis meses de idade. Aos dois e aos seis meses, foi também administrada a vacina de hepatite B, aplicada separadamente no vasto lateral da coxa direita. Todos os procedimentos foram realizados por vacinadores capacitados e com experiência quanto à técnica de administração de substâncias em crianças.

3.5- Monitoramento de eventos adversos

Os responsáveis pelos lactentes foram instruídos a comunicar imediatamente, por telefone, a ocorrência de qualquer reação inesperada à equipe responsável pelo estudo. Informações sobre eventos adversos sistêmicos (irritabilidade com choro persistente,

síndrome hipotônico-hiporresponsiva e febre), e locais (dor, edema, eritema) foram coletadas através de questionário padronizado (**Anexo 1**).

3.6- Coleta de sangue

A coleta de sangue foi efetuada 30 dias após a terceira dose de DTP. Foram utilizados cerca de 6mL de sangue periférico coletado com heparina para os ensaios de proliferação linfocitária e quantificação de citocinas. Para dosagem de anticorpos, o sangue, coletado em tubo com oxalato de silício, permaneceu em repouso por uma hora para retração do coágulo. A amostra foi então centrifugada por cinco minutos e o soro, dividido em três alíquotas, foi congelado a -80°C até a realização das titulações.

3.7- Titulação de anticorpos

3.7.1- Antipertussis

A quantificação de anticorpos IgG específicos para toxina pertussis (PT) foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com protocolo proposto por Meade *et al.* (1995). Os resultados foram calculados em Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL) por comparação ao soro humano de referência da Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA) identificado como lote 3.

3.7.2- Antidifteria e tétano

As dosagens de anticorpos específicos para os toxóides diftérico e tetânico foram feitas pelo teste *in vitro* de inibição da ligação de toxina (ToBI) no Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan, de acordo com protocolo padronizado e validado por Sonobe e colaboradores (2007).

3.7.3- Anti-hepatite B

A titulação de anticorpos para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (anti-HBs) foi realizada no Serviço de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas – UNICAMP, utilizando-se kit comercial (AxSYM Ausab Abbott GmbH Diagnostika, EUA) para equipamento automático (MEIA, AxSYM Abbott).

3.8- Hemograma

Foi realizado no Serviço de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas – UNICAMP, havendo a contagem de células global e diferencial em equipamento automático (SE 9500 ou XE 2100, Sysmecs Corporation, Japão).

3.9- Fenotipagem de linfócitos T em sangue total

A fenotipagem de linfócitos T foi realizada no dia da coleta de sangue. Primeiramente, 100µL de sangue total foram incubados com 10µL de cada anticorpo monoclonal de camundongo (anti-CD3 conjugado a fluoresceína, anti-CD4 conjugado a ficoeritrina e anti-CD8 conjugado ao complexo ficoeritrina-vermelho Texas, Beckman-Coulter, EUA) por 20 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Esse passo foi omitido nos controles negativos. A seguir, foi adicionada uma solução de cloreto de amônio para provocar hemólise, incubando-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagens em salina tamponada com fosfato (PBS) acrescida de 2% de soro bovino fetal inativado pelo calor (Sigma, EUA) e 0,1% de azida sódica, as células foram ressuspensas em 1mL dessa mesma solução para leitura em citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA).

3.10- Antígenos utilizados em cultura

Uma suspensão de *B. pertussis* inativada por calor e sem timerosal foi utilizada na concentração de 5.10^5 células/mL como estímulo específico. A fitohemaglutinina (Sigma, EUA) em 7,5µg/mL foi utilizada como controle positivo e o meio de cultura

completo (meio RPMI 1640 acrescido de glutamina, gentamicina e 10% de soro AB humano inativado) como controle negativo.

3.11- Proliferação linfocitária *in vitro*

O ensaio de proliferação foi modificado do protocolo de Gaines e Biberfeld (2000). Células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através da centrifugação em gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque 17-1440-02 (Amersham Biosciences, EUA), por 20 minutos a 1800rpm, com posterior lavagem e ressuspensão em meio de cultura completo RPMI (Sigma, EUA) na concentração de 1.10^6 células/mL. As células foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nunc, Dinamarca) em incubadora (CH-33M, Hitachi, Japão) a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ durante seis dias.

Após a colheita da cultura, foi realizada a marcação fenotípica dos linfócitos. As células foram coletadas e incubadas com 50uL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 20mM por 15 minutos, para desfazer possíveis agregados celulares. Em seguida, foram lavadas com tampão de lavagem (salina tamponada com fosfato (PBS), acrescida de 1% de soro bovino fetal inativado pelo calor (Sigma, EUA) e 0,1% de azida sódica), a 2200rpm à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspendido em PBS e incubado por 5 minutos com 20uL de Imunoglobulina Humana para bloquear os sítios Fc, seguido de incubação com anticorpos anti-CD3 (conjugado ao fluorocromo cooperativo ficoeritrina -PC5), anti-CD4 (conjugado a ficoeritrina - RD1), anti-CD8 (conjugado a isotiocianato de fluoresceína - FITC) (Beckman Coulter, EUA) e anti-CD3-FITC (Caltag Laboratories, EUA) e anti-TCR pan $\gamma\delta$ (conjugado a ficoeritrina - PE) (Immunotech, Beckman Coulter, France). Após centrifugação com tampão de lavagem a 2200rpm à temperatura ambiente, foi efetuada a leitura no citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA). Foram utilizados isotipos controle para estabelecer as populações positivas (Beckman Coulter, EUA).

A leitura das amostras foi realizada com aquisição de 30.000 a 50.000 eventos. Os resultados obtidos foram armazenados em arquivos FCS II e posteriormente analisados com o auxílio do programa computacional *EXPO* (EXPO Software ® 1997 Applied cytometry Systems, EUA). Após estabelecer o *gate* de células CD3⁺, linfócitos pequenos (*resting lymphocytes*) e blásticos foram identificados por observação em *forward* (tamanho celular) e *side light* (complexidade interna) *scatters* (**Figura 1**).

A proliferação linfocitária foi medida pelo percentual corrigido de células blásticas CD3⁺, calculado pela equação:

$$\text{Percentual corrigido de blastos CD3}^+ = \frac{\text{Percentual de blastos} \times 100}{\text{Percentual de blastos} + \text{Percentual de linfócitos pequenos}}$$

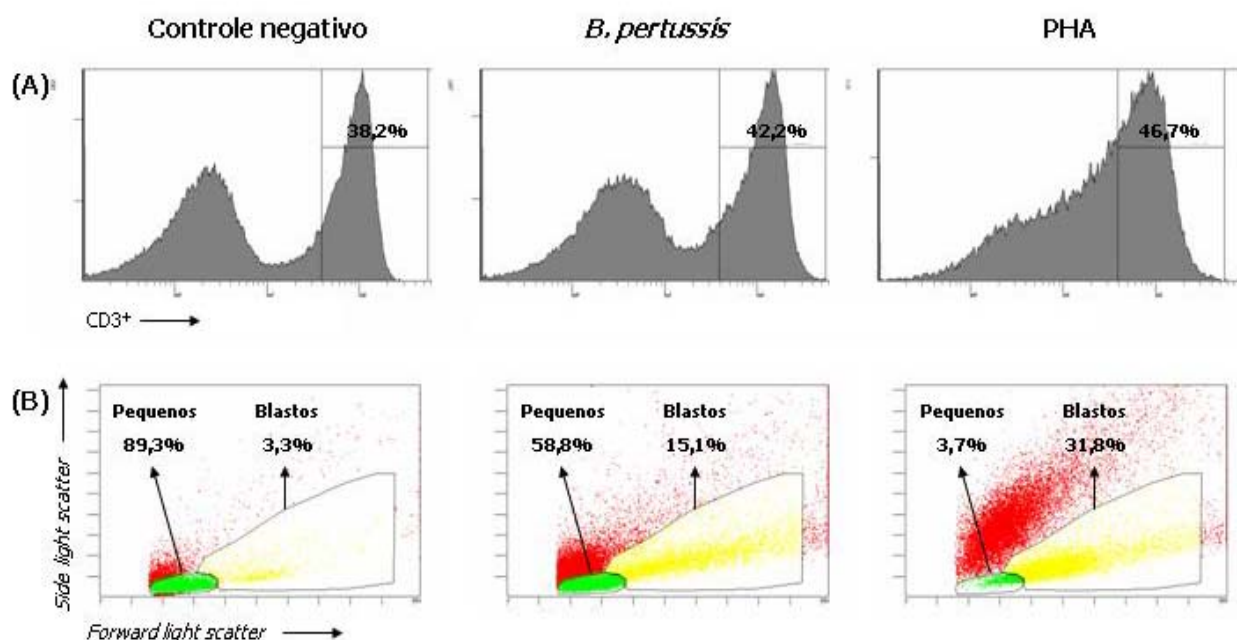


Figura 1- Análise, por citometria de fluxo, da proliferação de células T basal (controle negativo) e sob estímulo da *B. pertussis* ou da fitohemaglutinina (PHA). As células com marcação positiva para CD3 (**A**) foram separadas em linfócitos pequenos (destacados em verde) e blastos (amarelo) por suas características de tamanho (*forward light scatter*) e granulosidade (*side light scatter*) (**B**).

Por fim, o cálculo da porcentagem líquida de blastos para cada estímulo foi feito da seguinte forma:

$$(\% \text{ corrigido de blastos na cultura estimulada}) - (\% \text{ corrigido de blastos no controle negativo})$$

3.12- Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura

A análise da produção de citocinas foi feita a partir de cultura de CMSP conforme protocolo descrito anteriormente. As células, na concentração de 2.10^6 células/mL, foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nunc, Dinamarca) em incubadora a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ durante dois dias. O sobrenadante da cultura foi congelado a -80°C até a realização de ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA).

Foram utilizados kits comerciais (DuoSet, RD Systems, EUA) para dosagem de Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 10 (IL-10). Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca) segundo protocolo do fabricante. Sucintamente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, submetidas à incubação com amostras e diluições do padrão recombinante incluso no kit. Em seguida, foi feita a incubação com anticorpos de detecção, conjugados à biotina e, posteriormente, com uma solução de streptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB) e a parada ocorreu com a adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N). A leitura foi realizada em 450nm. O limite de detecção dos kits eram de 15.6pg/mL para IFN- γ e TNF- α , e de 31.2pg/mL para IL-4 e IL-10.

Em todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão através de gráfico de dispersão obtido com o programa Microsoft Excel, versão 2002 (Microsoft Corporation, EUA), no qual a variável X era a densidade óptica obtida nas leituras e Y, a concentração de citocinas. Para os cálculos, foi utilizada a equação correspondente à linha de tendência polinomial, que só era aceita se r^2 fosse maior que 0,95. Todas as amostras e pontos da curva padrão foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.13- Análise estatística

O banco de dados foi criado através do programa SPSS for Windows (SPSS Inc. 1999, EUA). As análises descritivas das variáveis foram apresentadas como média e desvio padrão (distribuição normal) ou mediana. O *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA) foi utilizado para confecção de gráficos.

Para o cálculo da média geométrica dos títulos de anticorpos antipertussis foi necessária a transformação dos dados em $\log_{10}$. Para cada grupo, foram calculados o título geométrico médio (TGM) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). A comparação dos grupos foi feita por análise de não-inferioridade da razão entre os títulos geométricos.

Os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e de Friedman foram aplicados nas análises dos resultados de proliferação e dosagem de citocinas. A significância estatística foi considerada como valor de p bicaudal inferior a 0,05.

4- RESULTADOS

4.1- População de estudo

Dos 247 lactentes inicialmente selecionados para participação na pesquisa, 234 tiveram seguimento e completaram todas as etapas do estudo. Os grupos estavam divididos da seguinte forma: 115 lactentes receberam três doses da vacina experimental DTPm (57 meninos e 58 meninas) e 119 lactentes foram incluídos no grupo controle (65 meninos e 54 meninas). Não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao sexo.

Tabela 1- Distribuição dos lactentes vacinados com pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP) quanto à idade (em meses) ao receber as três doses de vacina e no momento da coleta de sangue.

Tempo	Grupo	n ^a	Idade (meses)
			Média ± DP ^b
1ª dose	DTPm	124	2.1 ± 0.5
	DTP	123	2.1 ± 0.3
2ª dose	DTPm	121	4.2 ± 0.5
	DTP	121	4.2 ± 0.4
3ª dose	DTPm	120	6.3 ± 0.6
	DTP	119	6.3 ± 0.4
Coleta de sangue	DTPm	115	7.7 ± 0.7
	DTP	119	7.7 ± 0.6

(^a): número de indivíduos; (^b): desvio-padrão.

A distribuição dos lactentes quanto à idade ao receber as três doses de vacina e no momento da coleta de sangue é apresentada na **Tabela 1**. Também não foi observada diferença significativa em qualquer um desses tempos, demonstrando, dessa forma, que os grupos são comparáveis.

Nenhum dos lactentes apresentou convulsão, episódio hipotônico-hiporresponsivo ou outro evento adverso grave em associação temporal com a vacinação.

4.2- Título de anticorpos antipertussis

O título geométrico médio (TGM) de anticorpos IgG para toxina pertussis (PT), avaliado após as três primeiras doses de vacina tríplice que compõem o esquema básico de imunização, indicou uma resposta humoral robusta para ambas as vacinas testadas (**Tabela 2**).

Tabela 2- Título geométrico médio (TGM) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) de anticorpos IgG anti-PT de lactentes vacinados com três doses de pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).

Grupo	n ^a	TGM [IC 95%]
DTPm	114	12,649 UI/mL [10,457 – 15,301]
DTP	116	14,066 UI/mL [11,357 – 17,422]

P = 0,464 pelo teste t de Student; (^a): número de indivíduos.

Como não há definição de um ponto de corte para caracterização de proteção do componente pertussis, foi realizado um teste de não-inferioridade para a razão dos títulos geométricos médios. Para este caso, adotamos $\Delta = -10\%$ para a diferença entre as médias aritméticas dos valores dos títulos em log, que resulta em $\Delta = +0,794$ para a margem de não-inferioridade da razão entre os TGM. A razão entre os TGM foi 0,92 [IC 90%: 0,72 – 1,17]. Como o limite inferior do IC 90% foi menor que $\Delta = +0,794$, não foi possível rejeitar a hipótese de que a vacina modificada DTPm seja inferior à DTP quanto ao título de anticorpos anti-PT (**Figura 2**).

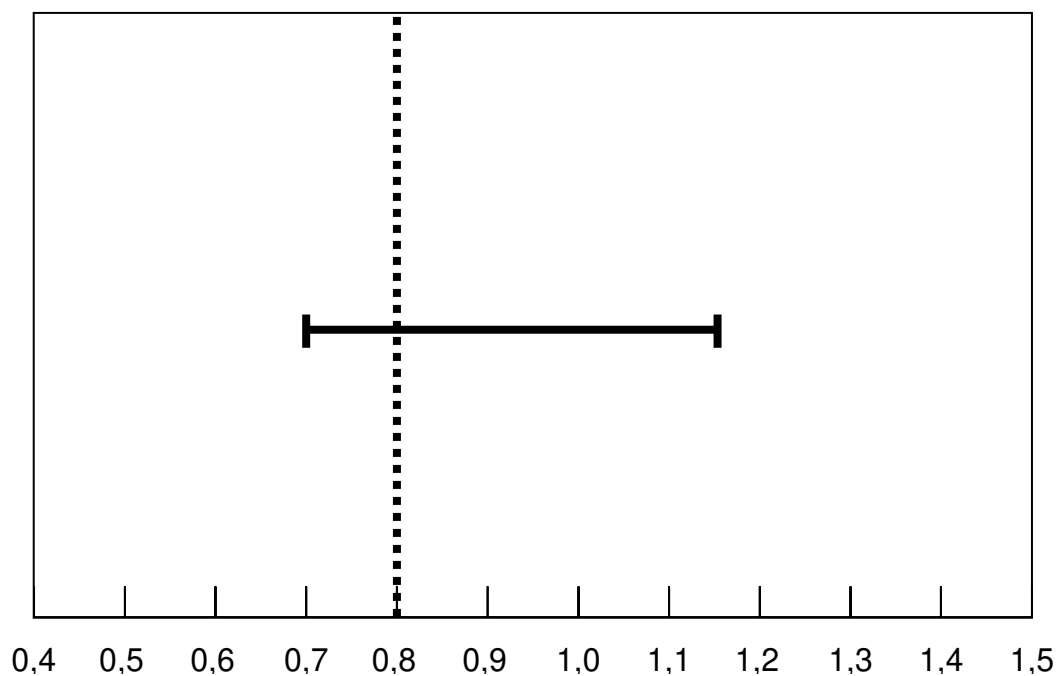


Figura 2- Intervalo de Confiança de 90%, representado pela barra horizontal, da razão entre os títulos geométricos médios (TGM) de anticorpos antitoxina pertussis de lactentes imunizados com pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP) (TGM_{DTPm} / TGM_{DTP}). A linha tracejada vertical corresponde à margem de não-inferioridade.

4.3- Resposta humoral aos componentes tétano, difteria e hepatite B

Na **Tabela 3** são apresentadas as porcentagens e respectivos IC95% de sujeitos que responderam aos componentes tétano, difteria e hepatite B.

Tabela 3- Porcentagens e intervalos de confiança de 95% de sujeitos que receberam três doses de pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP) e responderam aos componentes tétano, difteria e hepatite B.

	DTPm	DTP
Anti-Tétano $\geq 0,10\text{UI/mL}$		
n/N	108/113	114/116
% [IC 95%]	95,6 [90,0 – 98,5]	98,3 [93,9 – 99,8]
Anti-Difteria $\geq 0,10\text{UI/mL}$		
n/N	103/112	106/111
% [IC 95%]	92,0 [85,3 – 96,3]	95,5 [89,8 – 98,5]
Anti-HbsAg $\geq 10\text{mUI/mL}$		
n/N	109/113	112/116
% [IC 95%]	96,5 [91,2 – 99,0]	96,6 [91,4 – 99,1]

n: número de sujeitos que obtiveram valores maiores ou iguais ao ponto de corte; N: total de sujeitos avaliados.

Na **Figura 3** podemos observar que o limite inferior do IC90% da diferença entre as proporções de sujeitos que responderam aos componentes tétano, difteria e hepatite B são todos maiores que $\Delta=-10\%$. Considerando esses aspectos, pode-se afirmar que a vacina modificada não interferiu na resposta desses componentes.

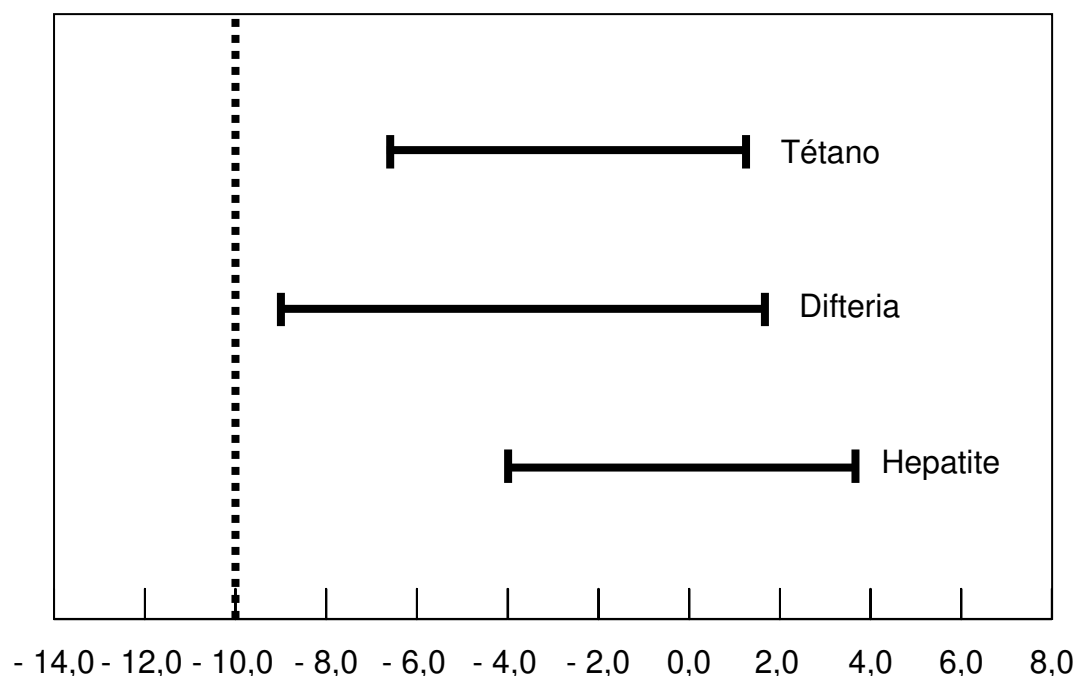


Figura 3- Intervalo de Confiança de 90%, representado pela barra horizontal, da diferença entre as proporções de sujeitos imunizados com pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP) que responderam aos componentes tétano, difteria e hepatite B. A linha tracejada vertical corresponde à margem de não-inferioridade.

4.4- Hemograma

As **Tabelas 4 e 5** apresentam, respectivamente, os resultados dos valores hematológicos e da contagem de leucócitos em sangue total dos lactentes 30 dias após o término do esquema de imunização. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos vacinais em nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 4. Valores hematológicos de 203 lactentes aos sete meses de idade, após terem recebido três doses de vacina pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).

Grupo	n ^a	Mediana dos valores hematológicos [IC 95%] ^b			
		Hemácias (10 ¹² /L)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	MCV (fL)
DTPm	98	4,61 [4,47 – 4,73]	11,50 [11,30 – 11,90]	34,75 [33,90 – 35,43]	75,85 [74,48 – 76,42]
DTP	105	4,63 [4,52 – 4,70]	11,50 [11,30 – 11,90]	34,40 [33,80 – 35,31]	75,90 [74,30 – 76,90]

(^a): número de indivíduos; (^b): intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5. Contagem de leucócitos e de suas subpopulações em sangue total (10¹²/L) de 203 lactentes aos sete meses de idade, após terem recebido três doses de vacina pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).

Grupo	n ^a	Concentração mediana de leucócitos [IC 95%] ^b			
		Leucócitos	Linfócitos	Monócitos	Neutrófilos
DTPm	98	10,80 [10,18 – 11,00]	6,66 [6,11 – 7,38]	0,83 [0,75 – 0,94]	2,27 [2,07 – 2,60]
DTP	105	10,60 [10,20 – 11,30]	6,53 [6,13 – 6,88]	0,91 [0,83 – 0,98]	2,55 [2,29 – 2,85]

(^a): número de indivíduos; (^b): intervalo de confiança de 95%.

4.5- Fenotipagem de linfócitos T em sangue total

A análise de populações de linfócitos T positivos para os marcadores CD4 e CD8 foi feita através de citometria de fluxo com amostras de sangue periférico total. As porcentagens de células CD4⁺ e CD8⁺ estão listadas na **Tabela 6**. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para ambos os marcadores fenotípicos (Teste *t* de Student, *p* = 0,230 para CD4⁺ e *p* = 0,303 para CD8⁺).

Tabela 6- Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em amostras de sangue total de lactentes de sete meses de idade que receberam três doses de pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).

Grupo	n ^a	% CD4 ⁺	% CD8 ⁺
		Média (IC 95%) ^b	Média (IC 95%) ^b
DTPm	115	66,7 (65,0 – 68,5)	26,3 (24,7 – 27,9)
DTP	119	65,3 (63,8 – 66,9)	27,4 (26,0 – 28,8)

(^a): número de indivíduos; (^b): intervalo de confiança de 95%.

4.6- Proliferação *in vitro* de linfócitos T

A proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliada através da cultura de CMSP de 205 lactentes (102 do grupo propósito e 103 do grupo controle), sob estímulo específico de uma suspensão inativada por calor de *B. pertussis*. Como controle positivo de proliferação, foi utilizada a fitohemaglutinina (PHA), dado o seu efeito mitogênico. A marcação de células TCR $\gamma\delta$ ⁺ foi feita em 55 culturas (28 do grupo propósito e 27 do grupo controle).

A mediana de proliferação (percentual corrigido de blastos CD3⁺) do controle negativo (*background*) foi 2,3% no grupo de lactentes imunizados com DTPm e 2,6% no grupo vacinado com DTP (Teste de Mann-Whitney, *p* = 0,660). A porcentagem líquida de blastos sob estímulo da *B. pertussis* foi maior no grupo que recebeu as três doses da vacina convencional (medianas de 6,2% para DTP e 3,9% para DTPm; Teste de Mann-Whitney, *p* = 0,029), mas não houve diferença entre os grupos nas culturas estimuladas com PHA (medianas de 82,5% para DTP e 81,4% para DTPm; Teste de Mann-Whitney, *p* = 0,166) (**Figura 4**).

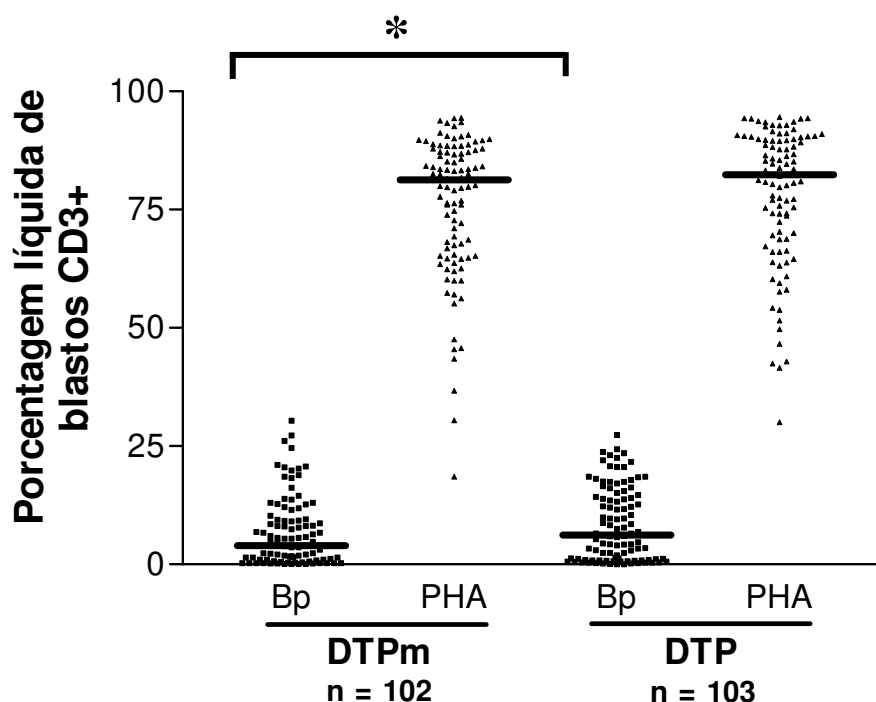


Figura 4- Porcentagem líquida de blastos CD3+ em cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de lactentes vacinados com três doses de pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP), após seis dias de estímulo com células inativadas de *B. pertussis* (Bp: ■) ou com fitohemaglutinina (PHA: ▲). As barras indicam os valores de mediana; n: número de indivíduos; *: diferença significativa.

As freqüências de blastos CD4⁺, CD8⁺ e γδ⁺ nas culturas estimuladas tanto com *B. pertussis* quanto com PHA foram similares entre os dois grupos (**Tabela 7**). No entanto, ao se comparar as porcentagens de marcação entre as diferentes condições de cultivo (controle negativo, *B. pertussis* e PHA), foi observada diferença significativa na distribuição das subpopulações de linfócitos T (Teste de Friedman, $p < 0,001$), com maior porcentagem de células γδ⁺ nas culturas estimuladas com *B. pertussis*.

4.7- Produção de citocinas no sobrenadante

As concentrações de IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de cultura foram determinadas por ELISA em cultura de células de 66 lactentes. Não obtivemos volume de sangue suficiente para avaliação de todos os participantes.

As concentrações de IL-4, tanto nas culturas estimuladas quanto no controle negativo, não puderam ser detectadas, pois estavam abaixo da sensibilidade (31,2pg/mL) do kit comercial utilizado.

A produção de IL-10 (**Figura 5**), TNF- α (**Figura 6**) e IFN- γ (**Figura 7**) no sobrenadante após 48 horas de incubação foi similar para ambos os grupos em todas as condições de cultivo testadas.

Tabela 7. Mediana das porcentagens de blastos CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta^+$ em cultura de células mononucleares de sangue periférico incubadas por seis dias em meio RPMI sem estímulo (controle negativo), com *B. pertussis* inativada ou fitohemaglutinina (PHA), de lactentes vacinados com três doses pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP).

Mediana da % de subpopulações de células T [IC 95%] ^a								
DTPm				DTP				
	n ^b	Controle	<i>B. pertussis</i>	PHA	n ^b	Controle	<i>B. pertussis</i>	PHA
CD4 ⁺	102	53,2	49,8	78,8	103	51,0	47,7	73,6
		[49,6 - 58,3]	[45,9 - 52,7]	[74,7 - 80,5]		[47,4 - 55,8]	[45,0 - 51,6]	[69,6 - 76,2]
CD8 ⁺	102	29,6	23,5	18,0	103	32,3	27,0	19,6
		[25,6 - 33,1]	[22,3 - 26,5]	[15,4 - 20,7]		[28,7 - 34,8]	[25,4 - 29,7]	[17,1 - 24,8]
$\gamma\delta^+$	28	5,7	16,8	1,9	27	5,9	20,3	1,9
		[4,0 - 7,0]	[13,0 - 24,4]	[1,4 - 3,4]		[4,1 - 8,1]	[15,0 - 24,8]	[1,3 - 2,7]

(^a): Intervalo de confiança de 95%; (^b): número de indivíduos.

Com relação à secreção de IL-10 nos controles negativos, foram detectadas medianas de 26,8pg/mL no grupo que recebeu a vacina DTP convencional e 34,4pg/mL no grupo imunizado com DTPm (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,533$). Nas culturas estimuladas com *B. pertussis*, os valores de mediana foram de 59,0pg/mL e 68,4pg/mL (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,559$), respectivamente, e sob estímulo da PHA, 45,5pg/mL e 65,7pg/mL (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,433$).

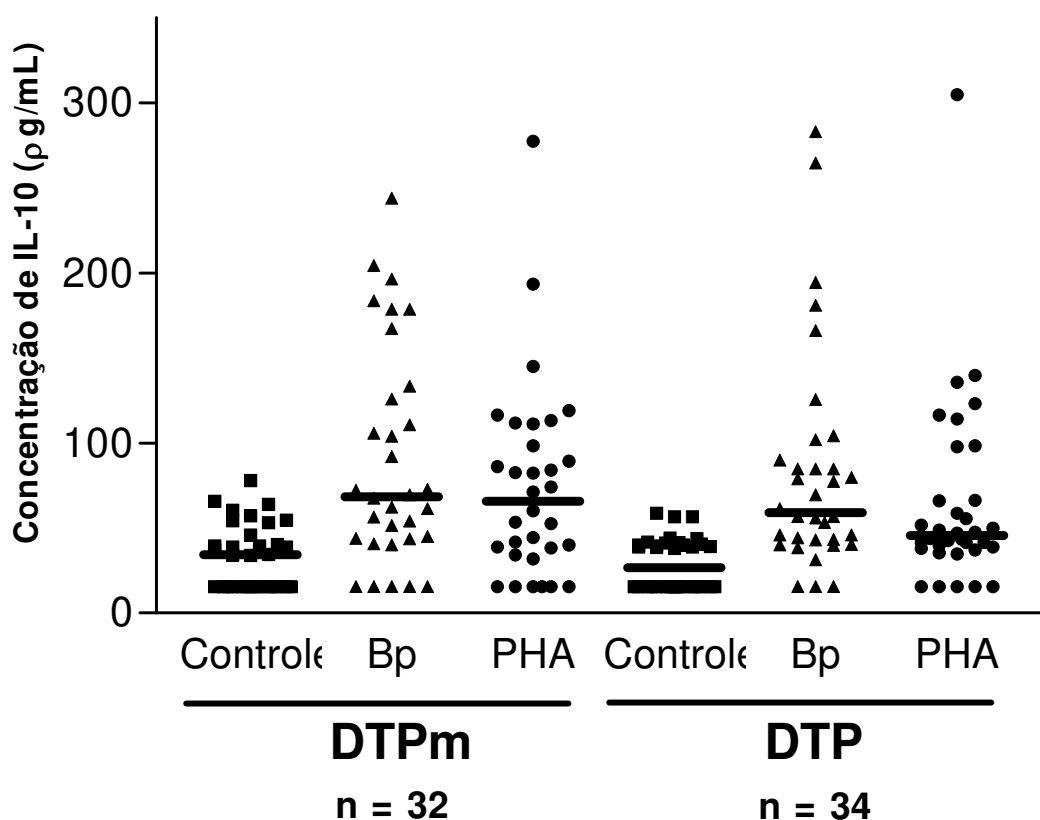


Figura 5- Concentração de IL-10 em pg/mL no sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico em cultura sem estímulo (controle: ■), com *B. pertussis* inativada (Bp: ▲) ou fitohemaglutinina (PHA: ●), de lactentes vacinados com três doses pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP). As barras representam valores de mediana.

As concentrações de TNF- α apresentaram, para os grupos DTP e DTPm respectivamente, medianas de 49,5 μ g/mL e 65,6 μ g/mL nos controles negativos (Teste de Mann Whitney, $p = 0,424$), 196,8 μ g/mL e 270,3 μ g/mL nas culturas com *B. pertussis* (Teste de Mann Whitney, $p = 0,594$), e 290,4 μ g/mL e 284,2 μ g/mL nas culturas com PHA (Teste de Mann Whitney, $p = 0,748$).

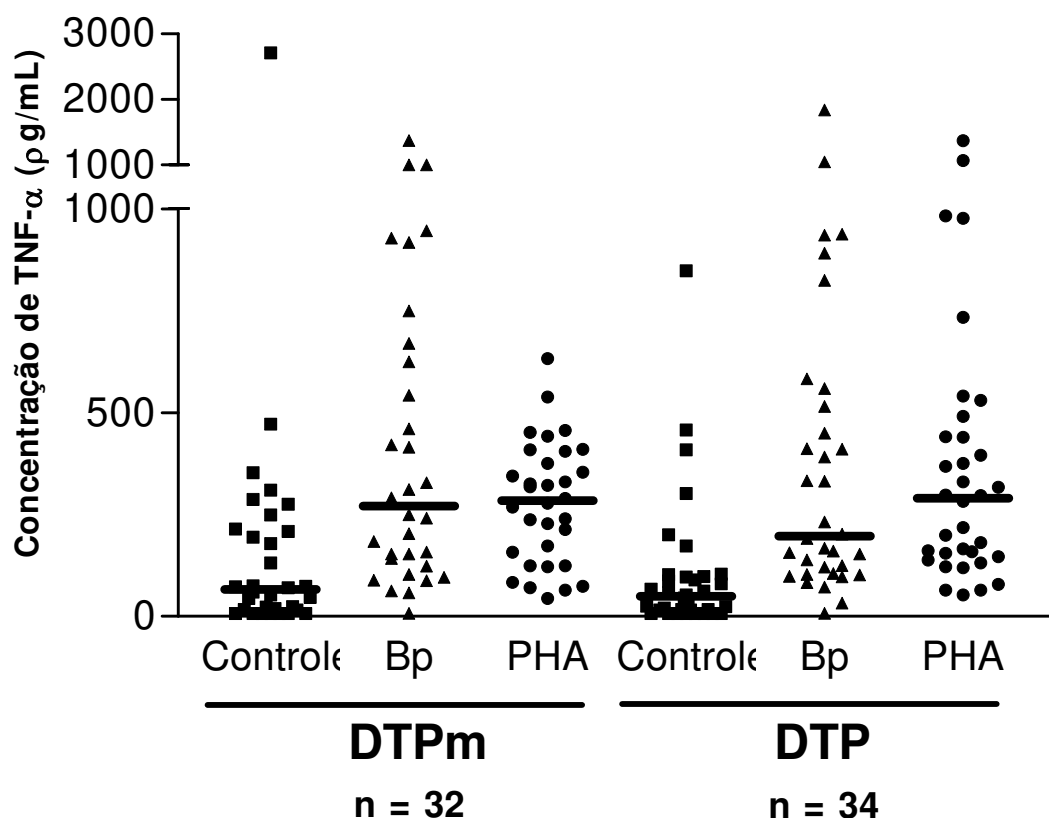


Figura 6- Concentração de TNF- α em μ g/mL no sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico em cultura sem estímulo (controle: ■), com *B. pertussis* inativada (Bp: ▲) ou fitohemaglutinina (PHA: ●), de lactentes vacinados com três doses pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP). As barras representam valores de mediana.

Por fim, quanto à produção de IFN- γ , foram observadas medianas de 7,8pg/mL no controle negativo de ambos os grupos (Teste de Mann Whitney, $p = 0,798$). O grupo DTP apresentou mediana de 66,6pg/mL sob estímulo da *B. pertussis* e 59,8pg/mL nas culturas com PHA, enquanto o grupo DTPm obteve valores de 21,0pg/mL (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,076$) e 22,4pg/mL (Teste t de Student, $p = 0,064$) respectivamente.

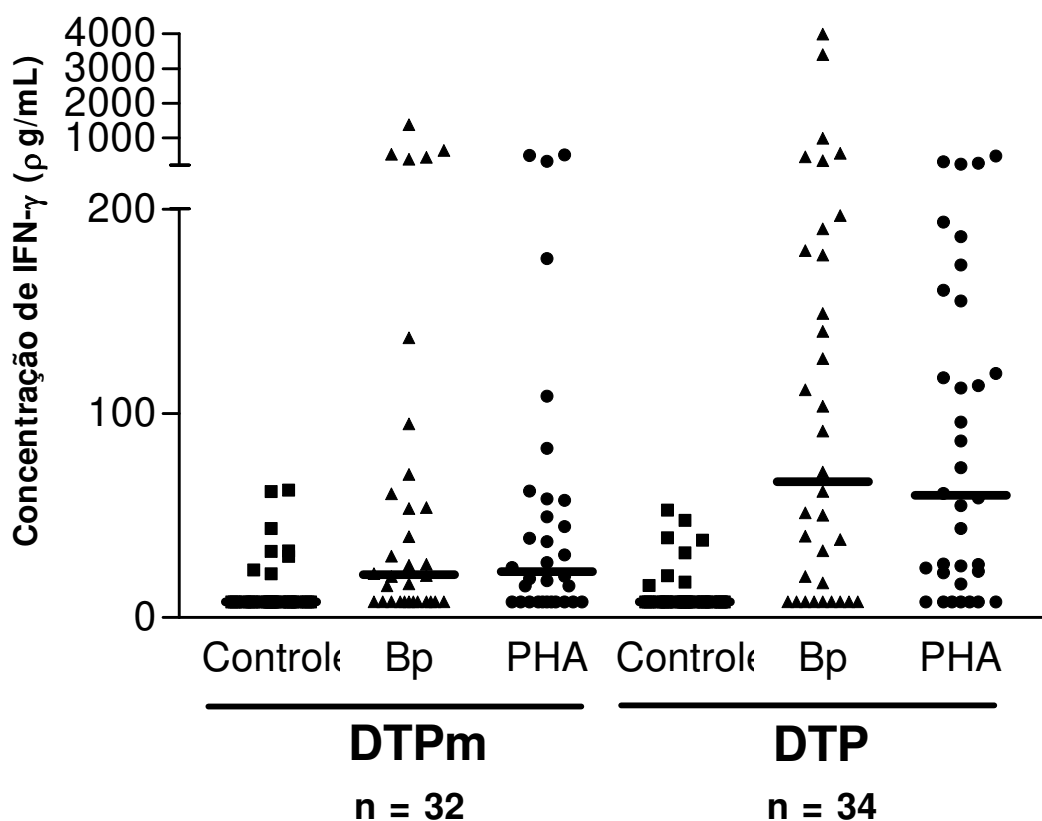


Figura 7- Concentração de IFN- γ em pg/mL no sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico em cultura sem estímulo (controle: ■), com *B. pertussis* inativada (Bp: ▲) ou fitohemaglutinina (PHA: ●), de lactentes vacinados com três doses pertussis celular modificada (DTPm) ou convencional (DTP). As barras representam valores de mediana.

5- DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune específica para *B. pertussis* de lactentes vacinados com três doses (aos dois, quatro e seis meses de idade) de uma vacina antipertussis modificada (DTPm), com baixo teor de LPS, e compará-la com a do grupo controle, imunizado com a vacina celular convencional (DTP). Ambas as vacinas foram produzidas pelo Instituto Butantan, São Paulo - SP.

Este é o primeiro trabalho, no Brasil, que avalia a resposta celular em lactentes imunizados com vacina antipertussis. Nossos resultados revelam que os lactentes de ambos os grupos apresentaram proporções semelhantes de células T $CD4^+$, $CD8^+$ e $\gamma\delta^+$ em proliferação frente ao estímulo específico. No entanto, a proliferação total de células T, avaliada pela porcentagem líquida de blastos $CD3^+$, foi menor no grupo imunizado com a vacina DTPm (mediana de 3,9% para DTPm e 6,2% para DTP; $p = 0,029$). Conseqüentemente, a quantidade circulante de células T de memória capazes de reconhecer e responder ao estímulo da *B. pertussis* é também menor nesse grupo de lactentes.

A literatura tem sugerido que tanto células B quanto células T participam da resposta à *B. pertussis* em seres humanos (Ausiello *et al.*, 1997a; Ausiello *et al.*, 2000; Cassone *et al.*, 1997) e em camundongos (Mills *et al.*, 1998; Ausiello *et al.*, 2003). Utilizando um modelo de infecção experimental, Leef e colaboradores (2000) demonstraram que a transferência adotiva de células T $CD4^+$ de camundongos imunizados é capaz de conferir proteção ao desafio com *B. pertussis*.

Além disso, a falta de correlação entre as concentrações de anticorpos antipertussis e o *status* de proteção à doença (Mills, 2001), a persistência de imunidade protetora após o desaparecimento de anticorpos específicos (Giuliano *et al.*, 1998; Mahon *et al.*, 2000) e a longa duração das respostas de células T aos antígenos da *B. pertussis* (Zepp *et al.*, 1997; Cassone *et al.*, 2000; Tran Minh *et al.*, 2000) suportam a hipótese de que a imunidade mediada por células provê proteção primária à doença.

A utilização da técnica de citometria de fluxo para avaliação da proliferação de linfócitos T foi capaz de revelar, pela primeira vez, que apesar de constituírem uma pequena porcentagem (1-5%) dos linfócitos T em circulação (Carding e Egan, 2002),

quantidades significativas de células $\gamma\delta^+$ são encontradas em resposta ao estímulo *in vitro* da *B. pertussis* (mediana de 16,8% para DTPm e 20,3% para DTP).

A subpopulação de linfócitos que expressa receptores do tipo $\gamma\delta$ foi identificada somente em meados da década de 80 (Saito *et al.*, 1984; Brenner *et al.*, 1986; Born *et al.*, 1987; Chien *et al.*, 1987) e é desproporcionalmente abundante em superfície epitelial, incluindo a dos pulmões (Augustin *et al.*, 1989; King *et al.*, 1999). Sua distribuição intraepitelial e capacidade de reconhecer antígenos não-protéicos, de modo não restrito ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC), têm atribuído aos linfócitos $\gamma\delta^+$ um papel importante na primeira linha de defesa a patógenos (Hayday, 2000). Em estudos envolvendo seres humanos, a proliferação expressiva de células $\gamma\delta^+$ durante infecção com *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella melitensis*, e *Ehrlichia chaffeensis* sugere sua importância na resposta do hospedeiro (Spada *et al.*, 2000).

O papel das células $\gamma\delta^+$ na infecção tem sido relacionado à sua capacidade em promover a migração de neutrófilos, macrófagos e células *natural killers* (NK) através da produção de citocinas e quimiocinas (Fu *et al.*, 1994; King *et al.*, 1999; Egan e Carding, 2000; Tagawa *et al.*, 2004). A ativação precoce das células $\gamma\delta^+$ leva à produção de IFN- γ e desencadeia a atividade microbicida de fagócitos antes do início da resposta mediada por linfócitos T $\alpha\beta$, promovendo, dessa forma, uma ponte entre os braços inato e adaptativo do sistema imunológico (Hayday, 2000).

A participação de células $\gamma\delta^+$ nos mecanismos de resposta à *B. pertussis* foi previamente sugerida pela observação, em crianças infectadas, de um menor número dessas células em circulação e sua suposta migração para as vias respiratórias (Bertotto *et al.*, 1997). A importância dos linfócitos $\gamma\delta$ na regulação da inflamação pulmonar decorrente da infecção por *B. pertussis* foi investigada por Zachariadis *et al.* (2006), utilizando modelo experimental murino. Nesse estudo, observou-se que camundongos TCR $\gamma\delta$ $-/-$ exibiam maior migração de leucócitos após desafio e que a ausência de células $\gamma\delta^+$ era capaz de influenciar a resposta adaptativa subsequente, proporcionando uma mudança de padrão Th1 para Th2 em resposta ao fator de virulência hemaglutinina filamentosa.

O padrão de citocinas Th1 é essencial na resposta à *B. pertussis*. Em camundongos, o controle da infecção e a proteção induzida pela vacinação são dependentes da produção dessas citocinas (Redhead *et al.*, 1993), em especial do IFN- γ , secretado em quantidades elevadas após ativação de linfócitos com células vivas ou inativadas de *B. pertussis* (Mills *et al.*, 1998). Camundongos deficientes na expressão de IFN- γ , de seu receptor ou de células NK, que infiltram o tecido pulmonar e secretam IFN- γ , desenvolvem infecção disseminada e letal (Mahon *et al.*, 1997; Byrne *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, a avaliação das concentrações de citocinas secretadas no sobrenadante de cultura de CMSP estimuladas com *B. pertussis* um mês após as três doses do esquema básico de imunização demonstrou, para ambos os grupos, aumento da produção de IFN- γ e TNF- α em comparação ao controle negativo. Uma vez que as quantidades de IL-4 foram indetectáveis mesmo nas culturas estimuladas, especula-se que predominou o padrão Th1 de resposta. Resultados similares foram encontrados em ensaios envolvendo adultos (Ausiello *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 2006) e crianças (Ausiello *et al.*, 1997b; Ryan *et al.*, 1997; Ausiello *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2007).

O sistema imune dos lactentes jovens é frequentemente considerado imaturo e relacionado a uma série de restrições funcionais que se manifestam principalmente no braço Th1 da resposta adaptativa, podendo limitar a indução de resposta protetora a antígenos vacinais. No entanto, a literatura tem demonstrado que esses lactentes são capazes de desenvolver uma resposta madura desde que haja o estímulo apropriado (Adkins *et al.*, 2004). Mascart e colaboradores (2003) concluíram que o sistema imunológico, logo aos dois meses de idade, é suficientemente maduro para induzir a secreção de IFN- γ em resposta à administração da primeira dose de vacina pertussis celular total.

A resposta Th1 desencadeada após infecção ou imunização com vacina pertussis celular total é caracterizada pela produção de anticorpos IgG e tem sido associada à presença de LPS e seu reconhecimento pelo receptor TLR4 (Mahon *et al.*, 1996; Kapsenberg, 2003). A sinalização do LPS via TLR4 nas células apresentadoras de antígenos resulta na produção de citocinas inflamatórias, IL-12, IL-23 e IL-1, que direcionam a resposta adaptativa para o padrão Th1, com produção e secreção

predominante de IFN- γ . Essa citocina promove atividade microbicida dos macrófagos, resposta que é potencializada pela ativação mediada diretamente pelo TLR4. Sendo assim, o TLR4 apresenta função crítica tanto na indução do padrão Th1 quanto na fase efetora da resposta adaptativa à *B. pertussis* (Higgins *et al.*, 2006).

Utilizando camundongos deficientes na expressão de MyD88, molécula adaptadora da via de transdução de sinais do TLR4, e outros modelos experimentais, Pasare e colaboradores (2005) demonstraram que a ativação e diferenciação das células CD4⁺ não é suficiente para geração de uma resposta ótima de anticorpos timo-dependentes. Além da interação com as células T auxiliares, a produção desses anticorpos requer a ativação do TLR nas células B. Adicionalmente, Banus e colaboradores (2007) demonstraram que o alelo rs2770150 do TLR4 pode ser associado a títulos reduzidos de IgG anti-PT em crianças vacinadas com pertussis celular total, dando suporte a hipótese de que o TLR4 desempenha papel fundamental na resposta de anticorpos.

Com relação ao título sérico de anticorpos IgG para o componente modificado, embora não seja detectada diferença estatística entre os títulos geométricos médios (TGM) na análise por teste de hipóteses (TGM = 12,649 UI/mL para o grupo DTPm e TGM = 14,066 UI/mL para DTP; teste t de Student, $p = 0,464$), o intervalo de confiança de 90% da razão entre os títulos de anticorpos antipertussis (TGM_{DTPm}/ TGM_{DTP}) demonstrou que a vacina DTPm é inferior à DTP.

É importante salientar, porém, que os lactentes imunizados com três doses de vacina pertussis celular modificada (DTPm) mantiveram o padrão de resposta à *B. pertussis* nos ensaios de avaliação *in vitro* da imunidade celular e foram capazes de produzir anticorpos específicos para toxina pertussis, demonstrando aptidão imunológica para reconhecer e responder ao patógeno. Além disso, a modificação do componente pertussis não interferiu na eficiência de resposta aos demais antígenos vacinais, uma vez que não foi observada diferença na concentração de anticorpos para difteria, tétano e hepatite B.

A menor imunogenicidade da vacina modificada DTPm pode ser explicada pelo seu baixo teor de LPS (12.500-25.000 UE/mL), em comparação com a vacina celular total (125.000-625.000 UE/mL). No entanto, uma série de vacinas acelulares, com

concentrações de LPS variando de 38 a 1.390 UE/mL (Geier e Geier, 2002), têm sido utilizadas nos programas de imunização de alguns países desenvolvidos. Os resultados apontados por este estudo, bem como dados epidemiológicos do Reino Unido, que alertam para o aumento na incidência de infecção por *Haemophilus influenzae* b simultaneamente à distribuição de vacinas combinadas DTP-Hib com componente pertussis acelular (Mc Vernon *et al.*, 2003), levantam dúvidas com relação à eficácia dessas vacinas acelulares.

De fato, tem sido proposta recentemente a utilização de adjuvantes derivados do LPS como alternativa para se aumentar a imunogenicidade dessas vacinas (Geurtsen *et al.*, 2007). O monofosforil lipídio A (MPLA) é uma das moléculas candidatas e tem apresentado resultados promissores em ensaios pré-clínicos, por ser capaz de se ligar ao TLR4 e induzir uma resposta adaptativa Th1 (Thompson *et al.*, 2005).

O reconhecimento do LPS ou do MPLA pelo TLR4 leva à ativação de uma cascata de sinalização intracelular que resulta na expressão de genes relacionados à defesa a patógenos microbianos. A interação com o LPS ou moléculas análogas promove a oligomerização do TLR4 e outras mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de moléculas adaptadoras que contêm o domínio TIR (Oshiumi *et al.*, 2003). As diferenças de respostas mediadas pelos ligantes do TLR4 podem ser explicadas pelo uso seletivo dessas moléculas adaptadoras. MyD88 e TRIF são responsáveis pela ativação de vias de sinalização distintas, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons α e β , respectivamente (Akira *et al.*, 2006). A reatogenicidade do LPS é resultado da ativação da via dependente de MyD88, mas Mata-Haro e colaboradores (2007) demonstraram que o papel adjuvante do MPLA está associado a uma supressão ativa dessa via e, portanto, a uma baixa toxicidade.

A substituição do hidróxido de alumínio pelo MPLA como adjuvante de uma vacina pertussis acelular foi avaliada recentemente em camundongos por Geurtsen *et al.* (2007). Os pesquisadores observaram melhora da resposta à vacina em dois pontos principais: a redução da colonização dos pulmões após desafio e o aumento dos títulos de IgG anti-PT, que evidenciam maior eficiência vacinal (1); e a diminuição do infiltrado

eosinofílico nos tecidos pulmonares, parâmetro indicativo de padrão Th2 e hipersensibilidade tipo I (2).

A vacina celular total, produzida pelo Instituto Butantan, tem se mostrado eficiente na proteção à doença e a sua segurança foi recentemente evidenciada pelo monitoramento de eventos adversos e episódios hipotônico-hiporresponsivos em 20.925 lactentes após vacinação com DTP-Hib (Martins *et al.*, 2007). Além disso, seu baixo custo possibilita a sua inclusão de modo universal e sustentado no Programa Nacional de Imunização. Sendo assim, tendo em vista nossos resultados e as informações disponíveis na literatura até o momento, propõe-se o aproveitamento do LPS extraído das células de *B. pertussis* para obtenção de MPLA e sua posterior utilização como adjuvante na formulação vacinal, como forma de agregar maior imunogenicidade à vacina DTPm com potencial redução da reatogenicidade observada na imunização com DTP convencional.

6- CONCLUSÃO

- Ambas as vacinas incitaram produção robusta de anticorpos IgG específicos para toxina pertussis, sem diferença nos títulos geométricos médios na análise estatística por teste de hipótese (teste t de Student). Contudo, foi detectada diferença na razão entre esses títulos pela avaliação de não-inferioridade.
- A modificação do componente pertussis não interferiu na resposta de anticorpos aos toxóides tetânico e diftérico e ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B;
- Não houve diferença com relação ao padrão de resposta de linfócitos T à *B. pertussis*, avaliado pela proporção de subpopulações $CD4^+$, $CD8^+$ e $\gamma\delta^+$ em proliferação, embora essa resposta tenha sido mais intensa no grupo que recebeu a vacina não modificada.
- A resposta celular específica para *B. pertussis* foi caracterizada por intensa proliferação de linfócitos TCR $\gamma\delta^+$;
- A produção de IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico foi semelhante em ambos os grupos e se aproximou do padrão Th1.

7- ASPECTOS ÉTICOS

O ensaio clínico apresentou operações independentes que possuem relevância do ponto de vista ético, como a imunização de lactentes com uma vacina modificada e a coleta de amostras de sangue, visando à caracterização da resposta imune. Todos os procedimentos obedeceram às recomendações para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos propostas pela Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde. O projeto inicial desta dissertação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (**Anexo 2**).

Os pais ou representantes legais das crianças foram informados sobre os objetivos, métodos (vacinação, coleta de sangue etc), benefícios, riscos e duração do estudo durante uma entrevista de acolhimento (**Anexo 3**). Uma vez cientes da natureza dos procedimentos e desconfortos aos quais as crianças seriam submetidas, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação, foi solicitado que os responsáveis assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 4**). Os representantes pela criança e o coordenador do projeto assinaram o termo em duas vias: a primeira foi arquivada na instituição e a outra, entregue aos pais ou responsáveis.

De acordo com o calendário nacional de imunizações, o primeiro reforço da tríplice bacteriana é feito aos 15 meses de idade. Tendo em vista a inferioridade demonstrada pela vacina modificada DTPm e o fato de não existir na literatura um ponto de corte para as concentrações séricas de anticorpos antipertussis que padronize o estado de proteção à doença, uma parcela dos lactentes de ambos os grupos, em especial os que apresentaram baixos títulos anti-PT, será recrutada para reavaliação das concentrações de IgG 30 dias após a dose de reforço com pertussis celular total.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; **4**: 553-564.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; **124**: 783-801.
- Andrews R, Hecceg A, Roberts C. Pertussis notifications in Australia, 1991 to 1997. *Commun. Dis. Intess.* 1997; **21**: 145-148.
- Augustin A, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the $\gamma\delta$ T-cell receptor. *Nature* 1989; **340**: 239-241.
- Ausiello CM, Urbani F, La Sala A, Lande R, Piscitelli A, Cassone A. Acellular vaccines induce cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis* antigens in infants undergoing primary vaccination against pertussis. *Dev. Biol. Stand.* 1997a; **89**: 315-320.
- Ausiello CM, Urbani F, La Sala A, Lande R, Cassone A. Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect. Immunol.* 1997b; **65**: 2168-2174.
- Ausiello CM, Lande R, La Sala A, Urbani F, Cassone A. Cell-mediated immune response of healthy adults to *Bordetella pertussis* vaccine antigens. *J. Infect. Dis.* 1998; **178**: 466-470.
- Ausiello CM, Lande R, Urbani F, Di Carlo B, Stefanelli P, Salmaso S *et al.* Cell-mediated immunity and antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens in children with a history of pertussis infection and in recipients of an acellular pertussis vaccine. *J Infect. Dis.* 2000; **181**: 1989-995.
- Ausiello CM, Lande R, Stefanelli P, Fazio C, Fedele G, Palazzo R *et al.* T-cell immune response assessment as complement to serology and intranasal protection assays in determinig the protective immunity induced by acellular pertussis vaccines in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; **10**: 637-642.
- Baker JP, Katz SL. Childhood vaccine development: an overview. *Pediatr. Res.* 2004; **55**: 347-356.

- Banus S, Bottema RWB, Siezen CLE, Vandebriel RJ, Reimerink J, Mommers M *et al.* Toll-like receptor 4 polymorphism associated with the response to whole-cell pertussis vaccination in children from the KOALA study. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; **14**: 1377-1380.
- Bertotto A, De Benedictis FM, Vagliasindi C, Radicioni M, Spinozzi F, Fabietti GM *et al.* Gamma delta T cells are decreased in the blood of children with *Bordetella pertussis* infection. *Acta Paediatr.* 1997; **86**: 114-115.
- Bisgard KM, Pascual FB, Ehresmann KR, Miller CA, Cianfrini C, Jennings CE, *et al.* Infant pertussis: who was the source? *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004; **23**: 985-989.
- Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur* 1906; **20**: 48-68.
- Born W, Miles C, White J, O'Brien R, Freed JH, Marrack P *et al.* Peptide sequences of T-cell receptor γ and δ chains are identical to predicted X and γ proteins. *Nature* 1987; **330**: 572-574.
- Braun MM, Mootrey GT, Salive ME, Chen RT, Elleberg SS, VAERS. Infant immunization with acellular pertussis vaccine in United States: assesment of the first two years data from de vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Pediatrics* 2000; **106**: 51-57.
- Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Owen FL, Seidman JG *et al.* Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 1986; **322**: 145-149.
- Byrne P, McGuirk P, Todryk S, Mills KH. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* 2004; **34**: 2579-2588.
- Campins-Marti M, Cheng HK, Forsyth K, Guiso N, Halperin S, Huang LM *et al.* Recommendations are needed for adolescent and adult pertussis immunization: rationale and strategies for consideration. *Vaccine* 2001; **20**: 641-646.
- Carding SR, Egan PJ. gd T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.* 2002; **2**: 336-345.

Cassone A, Ausiello CM, Urbani F, Lande R, Giuliano M, La Sala A *et al.* Cell-mediated and antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens in children vaccinated with acellular or whole-cell pertussis vaccines. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 1997; **151**: 283-289.

Cassone A, Mastrantonio P, Ausiello CM. Are only antibody levels involved in the protection against pertussis in acellular pertussis vaccine recipients? *J. Infect. Dis.* 2000; **182**: 1575-1577.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. Resurgence of pertussis in United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 1993; **42**: 952-953.

Cherry JD. The epidemiology of pertussis and pertussis vaccine in the United Kingdom and the United States: a comparative study. *Curr. Probl. Pediatr.* 1984; **14**: 1-78.

Chien YH, Iwashima M, Kaplan K, Elliott JF, Davis MM. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 1987; **327**: 677-682.

Committee on Infectious Diseases. Acellular pertussis vaccine: recommendations for use as the initial series in infants and children. *Pediatrics* 1997; **99**: 282-288.

Davis JP. Clinical and economic effects of pertussis outbreaks. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2005; **24**: s109-s116.

Del Giudice G. Vaccination strategies: an overview. *Vaccine* 2003; **21**: S83-S88.

Donnelly S, Loscher CE, Lynch MA, Mills KHG. Whole-cell but not acellular pertussis vaccines induce convulsive activity in mice: evidence of a role for toxin induced interleukin 1 β in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination. *Infect. Immun.* 2001; **69**: 4217-4223.

Dworkin MS. Adults are whooping, but are internists listening? *Annals Int. Med.* 2005; **142**: 832-835.

Edwards KM. Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2005; **24**: 104-108.

Egan PJ, Carding SR. Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. *J. Exp. Med.* 2000; **191**: 2145-2158.

Fu YX, Roark CE, Kelly K, Drevets D, Campbell P, O'Brien R *et al.* Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by $\gamma\delta$ T cells. *J. Immunol.* 1994; **153**: 3101-3115.

Fundação Nacional de Saúde. 1993. *Manual de procedimento para vacinação*. Brasília, DF.

Fundação Nacional de Saúde. 2002. *Guia de vigilância epidemiológica: AIDS e hepatites virais / coqueluche*. 5 ed.; pp 181-199.

Gaines MH, Biberfeld G. Measurement of lymphoproliferation at the single-cell level by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2000; **134**: 243-255.

Geier DA, Geier MR. Clinical implications of endotoxin concentrations in vaccines. *Ann.Pharmacother.* 2002; **36**: 776-780.

Geier DA, Geier MR. An evaluation of serious neurological disorders following immunization: a comparison of whole-cell pertussis and acellular pertussis vaccines. *Brain Develop.* 2004; **26**: 296-300.

Geurtsen J, Banus HA, Gremmer ER, Ferguson H, Blankestijn LJF, Vermeulen JP *et al.* Lipopolysaccharide analogs improve efficacy of acellular pertussis vaccine and reduce type I hypersensitivity in mice. *Clin. Vac. Immunol.* 2007; **14**: 821-829.

Giuliano M, Mastrantonio P, Giammanco A, Piscitelli A, Salmaso S, Wassilak SG. Antibody responses and persistence in the two years after immunization with two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *J. Pediatr.* 1998; **132**: 983-988.

Halperin SA. Canadian experience with implementations of an acellular pertussis vaccine booster dose program in adolescents: implications for the United States. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2005; **24**: s141-s146.

Hay JW, Ward JI. Economic considerations for pertussis booster vaccination in adolescents. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2005; **24**: s127-s133.

Hayday AC. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; **18**: 975-1026.

Hewlett EL, Edwards KM. Pertussis: not just for kids. *N. Engl. J. Med.* 2005; **352**: 1215-1222.

Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J. Immunol.* 2006; **177**: 7980-7989.

Hijnen M, Mooi FR, Gageldonk PGM, Hoogergout P, King AJ, Berbers GAM. Epitope structure of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infect. Immun.* 2004; **72**: 3716-3723.

Hoft DF, Brown RM, Rodman ST. Bacile Calmette-Guerin vaccination enhances human gamma delta T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype. *J. Immunol.* 1998; **161**: 1045-1054.

Hollinger FB. Factors influencing the immune response to hepatitis B vaccine, booster dose guidelines, and vaccine protocol recommendations. *Am. J. Med.* 1989; **87**: 36S-40S.

Immunization Practices Advisory Committee. Diphtheria, tetanus, and pertussis: recommendations for vaccine use and other preventive measures. *MMWR* 1991; **40**: 1-28.

Ishida S, Iwasa S, Fujiwara H, Chazono M, Akama K. The pyrogenicity of pertussis vaccine in mice and the factors in vaccine responsible for this effect. *J. Biol. Stand.* 1989; **17**: 41-51.

Ivanoff B, Robertson SE. Pertussis vaccine trials. Pertussis: a worldwide problem. *Develop. Biol. Stand.* 1997; **89**: 3-13.

Jefferson T, Rudin M, Dipietrantonj C. Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* 2003; **16**: 2003-2014.

Kanai K. Japan's experience in pertussis epidemiology and vaccination in the past thirty years. *Jpn J. Sci. Biol.* 1980; **33**: 107-143.

Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; **3**: 984-993.

King DP, Hyde DM, Jackson KA, Novosad DM, Ellis TN, Putney L *et al.* Protective response to pulmonary injury requires $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J. Immunol.* 1999; **162**: 5033-5036.

Leef M, Elkins KL, Barbic J, Shahin RD. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4 T cells for key functions other than specific antibody production. *J. Exp. Med.* 2000; **191**: 1841-1852.

Loscher CE, Donnely S, Mills KH, Lynch MA. Interleukin-1beta-dependent changes in the hippocampus following parenteral immunization with a whole cell pertussis vaccine. *J. Neuroimmunol.* 2000; **111**: 68-76.

Luz PM, Codeço CT, Werneck GL. A reemergência da coqueluche em países desenvolvidos: um problema também para o Brasil? *Cad. Saúde Pública* 2003; **19**: 1209-1213.

Mahon BP, Ryan MS, Griffin F, Mills KH. Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect. Immunol.* 1996; **64**: 5295-5301.

Mahon BP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KH. Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon- γ receptor or immunoglobulin γ -chain genes. *J. Exp. Med.* 1997; **186**: 1843-1851.

Mahon BP, Brady MT, Mills KH. Protection against *Bordetella pertussis* in mice in the absence of detectable circulating antibody: implications for long-term immunity in children. *J. Infect. Dis.* 2000; **181**: 2087-2091.

- Martins RM, Camacho LA, Lemos MC, de Noronha TG, de Carvalho MH, Greffe N *et al.* Incidence of hypotonic-hyporesponsive episodes associated to the combined DTP/Hib vaccine used in Brazilian National Immunizations Program. *J. Pediatr.* 2007; **83**: 523-528.
- Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Pierard D, Temerman S *et al.* *Bordetella pertussis* infection in 1-month-old infants promotes type 1 T cell responses. *J. Immunol.* 2003; **170**: 1504-1509.
- Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 2007; **316**: 1628-1632.
- McVernon J, Andrews N, Slack MP, Ramsay ME. Risk of vaccine failure after *Haemophilus influenzae* type b (Hib) combination vaccines with acellular pertussis. *Lancet* 2003; **361**: 1521-1523.
- Melker HE, Shellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Spaendonck MA. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg. Infect. Dis.* 2000; **6**: 348-357.
- Meyer CU, Zepp F, Decker M, Lee M, Chang SJ, Ward J *et al.* Cellular immunity in adolescents and adults following acellular pertussis vaccine administration. *Clin. Vac. Immunol.* 2007; **14**: 288-292.
- Miller E. Overview of recent clinical trials of acellular pertussis vaccine. *Biologicals* 1999; **27**: 79-86.
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Rev. Microbiol.* 2005; **3**: 35-46.
- Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immunol.* 1998; **66**: 594-602.
- Mills KH. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect.* 2001; **3**: 655-677.

Milord F. Resurgence of pertussis in Monteregie, Quebec 1990-1994. *Can. Commun. Dis. Rep.* 1995; **21**: 40-44.

Minh NNT, He W, Ramalho A, Kaufhold A, Viljanen MK, Arvilommi H *et al.* Acellular vaccines containing reduced quantities of pertussis antigens as a booster in adolescents. *Pediatrics* 1999; **104**: 70-75.

Ministério da Saúde / CENEPI: Banco de dados do SI-PNI. 2001. *Cobertura vacinal no primeiro ano de vida*. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>

Miranda AS, Scheibel IM, Tavares MRG, Takeda SMP. Avaliação da cobertura vacinal do esquema básico para o primeiro ano de vida. *Rev. Saúde Pública* 1995; **29**: 208-214.

Nagel J, De Graaf S, Schijf-Evers D. Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels. *Dev. Biol. Stand.* 1985; **61**:325-30.

Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon- β . *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 49751-49762.

Parton R. Review of the biology of *Bordetella pertussis*. *Biologicals* 1999; **27**: 71-76.

Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005; **438**: 364-368.

Pichichero ME, Casey JR. Acellular pertussis vaccines for adolescents. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2005; **24**: s117-s126.

Redhead K, Watkins J, Barnard A, Mills KH. Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* 1993; **61**: 3190-3198.

Reynolds E, Walker B, Xing D, Southern J, Asokanathan C, Dagg B *et al.* Laboratory investigation of immune responses to acellular pertussis vaccines when used for boosting adolescents after primary immunization with whole cell pertussis vaccines: a comparison with data from clinical study. *Vaccine* 2006; **24**: 3248-3257.

Romanus V, Jonsell R, Bergquist SO. Pertussis en Sweden after the cessation of general immunization en 1979. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1987; **6**: 664-671.

Ryan M, Murphy G, Gothegors L, Nilsson L, Storsaeter J, Mills KH. *Bordetella pertussis* respiratory infection in children is associates with preferential activation of type 1 Thelper cells. *J. Infect. Dis.* 1997; **175**: 1246-1250.

Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday A, Elsen H, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 1984; **309**: 757-762.

Sato Y, Kimura M, Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* 1984; **1**: 122-126.

Sonobe MH, Trezena AG, Guilhen FB, Takano VL, Fratelli F, Sakauchi D *et al.* Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007; **40**: 69-76.

Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melián A, Leslie DS *et al.* Self-recognition of CD1 by $\gamma\delta$ T cells: implications for innate immunity. *J. Exp. Med.* 2000; **191**: 937-948.

Tagawa T, Nishimura H, Yajima T, Hara H, Kishihara K, Matsuzaki G *et al.* Vdelta1 gammadelta T cells producing CC chemokines may bridge a gap between neutrophils and macrophages in innate immunity during *Escherichia coli* infection in mice. *J. Immunol.* 2004; **173**: 5156-5164.

Thompson BS, Chilton PM, Ward JR, Evans JT, Mitchell TC. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 2005; **78**: 1273-1280.

Tran Minh NN, He Q, Edelman K, Putto-Laurila A, Arvilommi H, Viljanen MK *et al.* Immune responses to pertussis antigens eight years after booster immunization with acellular vaccines in adults. *Vaccine* 2000; **18**: 1971-1974.

WHO (World Health Organization). WHO position paper: pertussis vaccines. *Weekly Epidemiological Record* 1999; **74**: 137-142. Disponivel em: <<http://www.who.int/wer/pdf/1999/wer7418.pdf>>

WHO (World Health Organization). WHO – Recommended standards for surveillance of selected vaccine. 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF01/pertussis.pdf>>

WHO (World Health Organization). Weekly Epidemiological Record: pertussis vaccines. Geneva, 2005; 80 (4): 29-40. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2005/en/wer8004.pdf>>

Zachariadis O, Cassidy JP, Brady J, Mahon BP. *Bordetella pertussis* infection in the murine respiratory tract. *Infect. Immun.* 2006; **74**: 1837-1845.

Zepp F, Knuf M, Habermehl P, Schmitt HJ, Meyer C, Clemens R *et al.* Cell-mediated immunity after pertussis vaccination and after natural infection. *Dev. Biol. Stand.* 1997; **89**: 307-314.

9- ANEXOS

ANEXO 1

Monitoramento de reações adversas pós-imunizações

1. Após a vacinação com as vacinas DPT + Hib + HepB + Rotavírus + Pólio, a criança deverá ser observada por 30 minutos para observação de algum evento adverso imediato: choque anafilático ou síndrome hipotônico-hiporresponsiva.
2. Os pais ou responsáveis pela criança receberão um cartão onde serão registradas reações locais ou sistêmicas. A criança deverá ser observada durante os três dias posteriores à vacinação e as ocorrências deverão ser anotadas no final da tarde de cada dia.
3. As reações locais solicitadas são: **eritema**, **edema** e **dor** no local da aplicação da injeção.
4. O **eritema** deverá ser medido com régua dividida em milímetros. A medida deverá ser feita no maior diâmetro da hiperemia e ser marcada na régua com caneta a ser fornecida. No retorno, o responsável pela criança entregará a régua para o responsável pela vacina, que transcreverá o valor para a ficha de monitorização de eventos adversos.
5. O responsável pela criança deverá anotar a presença ou ausência de **edema** na ficha de monitorização.
6. A **dor** deverá ser classificada por grau de gravidade de acordo o seguinte critério:

0: ausente
1: pequena e leve reação ao toque
2: chora ou protesta ao toque
3: chora quando a perna é movida
7. As reações sistêmicas solicitadas são: **febre e irritabilidade**.
8. **Febre**: a temperatura axilar deverá ser aferida diariamente, no final do tarde, independente de sinal ou queixa. Caso a temperatura seja aferida em outros horários, anotar sempre o valor mais alto. Será considerado febre $T \geq 38^{\circ} \text{C}$.

9. **Irritabilidade:** deverá ser classificada por grau de gravidade de acordo o seguinte critério:

0: a criança se comporta como de costume

1: mais irritável que de costume, mas com atividade normal

2: choro prolongado, recusa-se a brincar, há interferência nas atividades diárias

3: choro persistente e não pode ser confortada. Requer atenção médica

10. Anotar outros eventos que ocorrerem até o 3º dia, como **sonolência** (mais sonolenta que o normal), **anorexia** (com menos apetite que o normal), etc.

11. Anotar todos os outros eventos ocorridos com a criança no período de 60 dias após a vacina. Anotar data de início, duração, gravidade e evolução. Registrar também consultas médicas, em Pronto Socorro ou internações hospitalares. Anotar a data e os motivos.

12. No 2º dia após a vacinação, uma técnica de enfermagem entrará em contato com a família, por telefone, para saber sobre a ocorrência de eventos adversos e reforçar as instruções sobre as anotações na ficha de monitorização.

13. No retorno, recolher a ficha, anotar dados marcados na régua e questionar sobre outras ocorrências não anotadas. Para cada dose , repetir as orientações, fornecer novas fichas, termômetro e régua.

- **Classificação de gravidade**

- **Eritema grave:** ≥ 15 ou 20 mm(?)

- **Temperatura grave:** $\geq 39,5^\circ \text{C}$

- **Outros eventos:** 0: Nenhum

- 1: Leve: reação facilmente tolerada

- 2: Moderada: Reação desconfortável; interfere nas atividades diárias

- 3: **Grave:** impede atividades diárias normais; pode requerer atenção médica

- **CrITÉrios de inclusão**

- Os do projeto.
- Crianças com menos de 2 meses de idade, que não tomaram a 2ª dose de Hepatite b.
- Pais maiores de 18 anos, alfabetizados, preferencialmente moradores da região do CS.
- Pais ou responsáveis com capacidade para compreender e seguir instruções, relatar as reações da criança em relação à vacina e disponibilidade de comparecer ao CS, receber telefonemas e visitas domiciliares programadas.
- Crianças que não freqüentam instituição (creches, berçários, etc).

- **Rotina nos CS**

- Selecionar as crianças que se encaixam nos critérios de inclusão, entre aquelas que procuram o CS para iniciar o acompanhamento pediátrico ou para vacina BCG.
- No **primeiro contato** com os pais ou responsáveis:
 - Apresentar proposta do estudo e convidar para participar da pesquisa;
 - Deve ser assinado o consentimento livre e esclarecido;
 - Entregar os documentos (Consentimento, Proposta da pesquisa) aos pais;
 - Colocar na carteira de vacinação da criança o **ADESIVO** de participação na pesquisa;
 - Agendar retorno aos 2 meses de idade.
- No **segundo contato**:
 - Fazer o sorteio para alocação da criança em um dos grupos de estudo;
 - Orientar os pais ou responsáveis sobre quais vacinas são dadas, as possíveis reações e o próximo retorno;
 - Apresentar a ficha de monitorização de eventos adversos e orientar sobre os possíveis eventos e os critérios para fazer as observações e as medidas solicitadas;
 - Fornecer régua e termmetro, para medidas de eritema e temperatura;
 - Aplicar as vacinas indicadas;
 - Agendar retorno (com 4 meses de idade) nos cartões do PNI e nas fichas da pesquisa;
 - Observar a criança por 30 minutos após a vacinação;
 - Combinar com os pais sobre contato telefnico após 2 dias.

Após 2 dias: contato telefnico: perguntar sobre reações, se estão anotando na ficha, se há alguma dvida. Se necessário, agendar visita ao Centro de Saúde.

- No **terceiro contato**:
 - Recolher a ficha de monitorização e a régua;
 - Completar a ficha com informações adicionais sobre os 60 dias anteriores e anotar as medidas marcadas na régua (se houver);
 - Esclarecer dúvidas dos pais sobre as vacinas ou o estudo;
 - Aplicar a dose das vacinas agendadas;
 - Agendar retorno (com 6 meses de idade) nos cartões do PNI e nas fichas da pesquisa;
 - Fornecer nova ficha de monitorização e régua e reforçar as orientações;
 - Observar a criança por 30 minutos após a vacinação.

Após 2 dias: contato telefônico: perguntar sobre reações, se estão anotando na ficha, se há alguma dúvida. Se necessário, agendar visita ao Centro de Saúde.

- No **quarto contato**:
 - Recolher a ficha de monitorização e a régua;
 - Completar a ficha com informações adicionais sobre os 60 dias anteriores e anotar as medidas marcadas na régua (se houver);
 - Esclarecer dúvidas dos pais sobre as vacinas ou o estudo;
 - Aplicar a dose das vacinas agendadas;
 - Agendar retorno para continuidade do esquema vacinal nos cartões do PNI;
 - Fornecer nova ficha de monitorização e régua e reforçar as orientações;
 - Observar a criança por 30 minutos após a vacinação;
 - Agendar visita domiciliar (com 7 meses de idade) para coleta de sangue.

Após 2 dias: contato telefônico: perguntar sobre reações, se estão anotando na ficha, se há alguma dúvida. Se necessário, agendar visita ao Centro de Saúde.

- No **quinto contato**:
 - Recolher a ficha de monitorização e a régua;
 - Completar a ficha com informações adicionais sobre os 30 dias anteriores e anotar as medidas marcadas na régua (se houver);
 - Esclarecer dúvidas dos pais sobre as vacinas ou o estudo;
 - Coletar 6 ml de sangue de veia periférica;
 - Retirar o adesivo do cartão de vacina da criança;
 - Orientar sobre a continuidade do esquema vacinal no Centro de Saúde;
 - Agradecer, despedir e orientar que a família será informada sobre a resposta vacinal da criança, assim que possível.

ANEXO 2

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-7187

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 11/10/05.

(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 498/2005

CAAE: 1482.0.146.000-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E CELULAR DE LACTENTES VACINADOS COM PERTUSSIS CELULAR (DTP) E PERTUSSIS CELULAR MODIFICADA (DTPm), DO INSTITUTO BUTANTAN”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Marluce dos Santos Vilela

INSTITUIÇÃO: Postos de Saúde de Campinas

APRESENTAÇÃO AO CEP: 05/09/05

II - OBJETIVOS

Avaliar através da proliferação linfocitária e quantificação de anticorpos e citocinas específicas para *B. pertussis*, a resposta imunológica da vacina DTPm, e compará-la com a triplice tradicional, DTP.

III - SUMÁRIO

A vacina será administrada por via intramuscular em dois grupos de 244 lactentes saudáveis, sendo a primeira dose aos dois meses de idade, a segunda aos quatro meses e a terceira aos seis. A coleta de sangue para avaliação será feita 30 dias após a terceira dose.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um estudo com grande relevância social. O protocolo é adequado e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi adequado ao solicitado pelos relatores, estando de acordo com as normas vigentes. A pesquisadora esclareceu as questões levantadas de forma que a presente pesquisa está apta para aprovação

Recomendação: Acrescentar o telefone do Comitê de Ética no Termo de Consentimento.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de setembro de 2005.


Prof. Dr.ª Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 3

Roteiro para entrevista de Acolhimento

A entrevista de acolhimento deve abordar os seguintes aspectos:

- Os tipos de infecções respiratórias mais freqüentes e suas características principais.
- Formas de transmissão da coqueluche. Salientar que as crianças do estudo não correm risco imediato de infecção.

- Formas clínicas e potenciais complicações tardias da DTP.
- Apresentação dos objetivos do estudo.
- Apresentação dos procedimentos do estudo.
- Porque é importante a produção nacional da vacina modificada.
- Porque é importante combinar estas vacinas.
- Segurança da criança: todos os possíveis efeitos adversos serão monitorizados.

Informar que haverá uma retaguarda médica disponível para o atendimento de possíveis complicações ou para outros esclarecimentos.

- Riscos inerentes ao uso de uma vacina que é universalmente usada em criança.
- Espera-se redução dos eventos adversos com a DTPm quando comparada com a DTP tradicional, única disponível comercialmente.
- Chamar a atenção sobre o controle de qualidade da vacina durante o armazenamento e sobre o uso de material completamente descartável.
- Explicar porque é preciso haver um sorteio do grupo estudado.
- Informar aos pais que ao concordarem na participação da criança será oferecido o acompanhamento de puericultura durante o primeiro ano com a equipe do projeto.
- Finalmente, oferecer o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para ser assinado. As recusas e suas justificativas, assim como possíveis critérios de exclusão deverão ser prontamente registrados.

ANEXO 4

Consentimento Livre e Esclarecido (resolução 196/96-251/97)

Pesquisa Clínica:

TÍTULO: Avaliação da resposta humoral e celular específica de lactentes vacinados com pertussis celular modificada (DTPm) do Instituto Butantan

Pesquisadores: Professores Doutores: André Moreno Morcillo; Maria Ângela R. G. M. Antonio; Maria de Lurdes Zanolli; Marcos Tadeu Nolasco da Silva; Maria Marluce dos Santos Vilela. Enfermeiras; Emília de Faria Carniel e Silvana Dalgé Severino

LOCAL: Centro de Investigação Pediátrica (CIPED) – FCM-UNICAMP.

1. INTRODUÇÃO: As informações a seguir descreverão esta pesquisa e o papel que você terá como participante. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que você possa ter sobre este termo e sobre o estudo. Por favor, leia-o cuidadosamente, e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações abaixo.

2. PROPÓSITO: Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa clínica cujo objetivo é avaliar se a vacina modificada para coqueluche, com baixo teor de substância que causa eventos indesejáveis, tem a mesma eficácia e segurança da vacina tradicional para coqueluche. Ela será aplicada em três doses por via intramuscular, e será combinada com as vacinas contra tétano e difteria. A primeira e a terceira dose será combinada também com a vacina contra hepatite B. Será coletado 6 mililitros de sangue de veia periférica para realização de sorologia para coqueluche e hepatite B um mês após a última dose, aos sete meses de vida. Para você decidir se deseja ou não participar deste estudo de pesquisa, você deve entender o bastante para fazer uma decisão consciente. Este processo é conhecido como consentimento informado.

3. RETROSPECTIVA: A coqueluche, ou “tosse comprida” é uma doença infecciosa e acomete anualmente cerca de 60 milhões de crianças, sendo responsável por 600 mil mortes. Ela pode ser prevenida por uma vacina de elevada segurança e eficácia que é aplicada por via intramuscular em 3 doses nas idades 2, 4 e 6 meses de vida. Esta vacina está incluída na linha de produção do Instituto Butantan sendo reconhecida como segura e eficaz em crianças até os seis anos de idade.

Embora sejam muito eficientes e levem a cobertura vacinal, a destoxificação das preparações vacinais é um dos pontos cruciais no processo de produção, tendo sido descritos efeitos colaterais indesejáveis por vezes de gravidade considerável. Isso levou ao desenvolvimento de uma

vacina pertussis celular, a partir de células de *Bordetella pertussis*, tratadas por solvente orgânico, de modo a tornar a vacina menos tóxica e tão potente quanto a vacina pertussis celular tradicional.

4. DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Irão participar deste estudo, aproximadamente 240 crianças. Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa serão examinados clinicamente, entrevistados e serão coletadas amostras de sangue. As coletas e exames não interferirão nos atendimentos médicos. Cada coleta de sangue durará cerca de 5 minutos e o método de coleta utilizado não acarreta qualquer risco, custo ou dano imediato ou tardio ao paciente. Não serão realizadas intervenções terapêuticas durante o período de estudo, exceto as realizadas pela equipe médica.

5. DESCONFORTO, RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS: O método de coleta utilizado e o exame clínico aos quais os participantes da pesquisa serão submetidos não acarretam qualquer risco, custo ou dano imediato ou potencial ao participante. Por outro lado oferecem elevada possibilidade de gerar conhecimento para compreensão da prevenção da coqueluche, resultando em benefício na qualidade de vida e sobrevivência dos participantes da pesquisa.

6. ALTERNATIVAS: Imunizar com a vacina da coqueluche tradicional combinada com a anti-tetânica e anti-difteria e separadamente com a vacina contra hepatite B por via intramuscular.

7. EXCLUSÕES: critérios de exclusão no grupo desta pesquisa:

- Lactente filho de mãe portadora do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg).
- Lactente portador de qualquer doença neurológica, convulsão ou que esteja fazendo uso de anticonvulsivante.
- Lactente com quadro infeccioso agudo, ou com história de imunodeficiência
- Lactente filho de mãe portadora de sorologia positiva para HIV ou sífilis.
- Lactente portador de malformação congênita, doença genética ou condição clínica grave.
- Lactente prematuro com peso de nascimento igual ou inferior a 2,0Kg; ou com idade gestacional igual ou menor que 34 semanas.
- Lactente submetido à administração de imunoglobulina intravenosa ou exsanguíneo-transfusão até a data da vacinação.

8. COMPENSAÇÃO: Não existem danos imediatos ou futuros previsíveis decorrentes da pesquisa e, portanto, a mesma não inclui a possibilidade de indenização.

9. CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS: Você tem direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá confidencial nos âmbitos possíveis da lei, assegurando proteção de sua imagem, sigilo e respeitando valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. Como condição de sua participação nesta pesquisa, você permite acesso aos dados obtidos durante o estudo, aos pesquisadores envolvidos neste estudo, aos membros da Comissão de Ética responsáveis pela análise do projeto e a agência financiadora. Os resultados deste projeto de pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou em publicações, porém sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

10. DIREITO em PARTICIPAR, RECUSAR ou SAIR: Ao participar, você concorda em cooperar com os procedimentos que foram executados e que foram descritos acima, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado. Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais de outra forma tenha direito. O pesquisador tem o direito de desligá-lo do estudo a qualquer momento que julgar necessário. Se você sair voluntariamente ou for retirado pelo pesquisador, poderá ser solicitado que volte para eventuais coletas de sangue.

11. CONTATOS: Se ainda houver qualquer dúvida sobre o estudo você poderá receber mais esclarecimentos falando com os médicos: André Moreno Morcillo;; Maria Ângela R.G.M. Antonio; Maria de Lurdes Zanolli; Marcos Tadeu Nolasco da Silva; Maria Marluce dos Santos Vilela; ou com as enfermeiras: Emília de Faria Carniel e Silvana Dalgé Severino.

Endereço: Centro de Investigação em Pediatria (CIPED)- Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, Campinas cep 13083-970, fone: (XX-19) 3788- 8958 ou 3788-8959.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de _____, sob registro de nascimento _____, que se encontra sob responsabilidade de _____, com idade de ____ anos, com o RG de nº _____, residente em _____, cujo grau de parentesco é _____, na pesquisa intitulada “Avaliação da resposta humoral e celular de lactentes vacinados com pertussis celular (DTP) e pertussis celular modificada (DTPm), do Instituto Butantan”.

Esta pesquisa tem o objetivo de analisar a imunização aos antígenos de *Bordetella pertussis*, em crianças saudáveis.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- a) entrevista com profissional da área de medicina;
- b) imunização com a vacina celular modificada DTPm do Instituto Butantan;
- c) coleta de sangue periférico para a realização de exames.

Comprometo-me a respeitar o calendário de vacinação segundo as orientações recebidas, tendo a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável pelo participante: _____

Profª Drª Maria Marluce dos S. Vilela (Tel. 19 37888963): _____

Campinas, ____ de _____ de 2006.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas – UNICAMP: 19 37888936

10- APÊNDICES

APÊNDICE 1

Trabalhos apresentados em congressos

- **Zorzeto TQ**, Rollo AF, Dias WO, Mazzola TN, Carniel EF, Vilela MMS. *Títulos de anticorpos antitoxina tetânica e diftérica em lactentes sadios vacinados*, 33º Congresso Brasileiro de Pediatria, de 6 a 11 de outubro de 2006, em Recife – PE, Brasil.
- Mazzola TN, Moreno YMF, Silva MTN, Lima SCBS, **Zorzeto TQ**, Vilela MMS. *Imunidade celular reduzida para a vacina BCG em lactentes com exposição vertical e não infectados pelo HIV*, 33º Congresso Brasileiro de Pediatria, de 6 a 11 de outubro de 2006, em Recife – PE, Brasil.
- **Zorzeto TQ**, Rollo AF, Mazzola TN, Dias WO, Vilela MMS. *Tetanus and diphtheria serum antibody titers in vaccinated infants*, XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology, de 22 a 25 de outubro de 2006, em Búzios – RJ, Brasil.
- Mazzola TN, Silva MTN, Moreno YMF, Lima SCBS, **Zorzeto TQ**, Vilela MMS. *Low expansion of BCG primed T-cells following BCG vaccination in uninfected infants Born to HIV-infected mothers*, XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology, de 22 a 25 de outubro de 2006, em Búzios – RJ, Brasil.
- **Zorzeto TQ**, Lima SCBS, Ramalho VD, Silva MTN, Vilela MMS. *Análise da proliferação in vitro de linfócitos T frente à Bordetella pertussis por citometria de fluxo*, 2º Congresso Mineiro de Alergia e Imunologia Clínica, de 4 a 6 de maio de 2007, em Poços de Caldas – MG, Brasil.
- **Zorzeto TQ**, Ramalho VD, Lima SCBS, Silva MTN, Carniel EF, Raw I, Vilela MMS. *T cell proliferation in infants vaccinated with low lipopolysaccharide cellular pertussis (DTP low) or whole-cell pertussis (DTP) vaccines*, 13th International Congress of Immunology, de 21 a 25 de agosto de 2007, no Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

- **Zorzeto TQ**, Ramalho VD, Lima SCBS, Silva MTN, Mazzola TN, Carniel EF, Morcillo AM, Zanolli ML, Antônio MARGM, Higashi HG, Raw I, Vilela MMS. *Gamma delta⁺ T cell expansion in infants vaccinated with low lipopolyssacharide cellular pertussis (DTP low) or whole-cell pertussis (DTP) vaccines*, Vaccine Congress, de 9 a 11 de dezembro de 2007, em Amsterdã, Holanda.
- **Zorzeto TQ**, Rollo AF, Dias WO, Stephano MA, Carniel EF, Silva MTN, Morcillo AM, Zanolli ML, Antônio MARGM, Higashi HG, Raw I, Vilela MMS. *Immunogenicity of a low lipopolyssacharide (LPS) cellular pertussis vaccine among infants*, Vaccine Congress, de 9 a 11 de dezembro de 2007, em Amsterdã, Holanda.

APÊNDICE 2

Equipe multidisciplinar do projeto:

Resposta humoral e celular de lactentes vacinados com pertussis celular total ou modificada pela extração de lipopolissacarídeo.

I – Ensaio Clínico

Coordenação Geral

- Maria Marluce dos Santos Vilela – Prof^ª Titular do Departamento de Pediatria – Coordenadora do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) FCM – UNICAMP.

Trabalho de campo junto às Unidades Básicas de Saúde:

- Emília de Faria Carniel – gestora do trabalho de campo. Enfermeira do Departamento de Pediatria, FCM – UNICAMP.
- Brigina Kemp, Enfermeira coordenadora da Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde de Campinas-SP.
- Maria de Lurdes Zanolli – Prof^ª Dr^a do Departamento de Pediatria, FCM – UNICAMP.
- Maria Ângela Reis de Góes Monteiro Antonio – Prof^ª Dr^a do Departamento de Pediatria, FCM – UNICAMP.

Investigação laboratorial

- Marcos Tadeu Nolasco da Silva, gestor da investigação laboratorial. Prof. Dr. do Departamento de Pediatria, FCM – UNICAMP.
- Tatiane Queiroz Zorzeto – Executora da avaliação de imunidade celular. Aluna de pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, FCM – UNICAMP.
- Vanessa Domingues Ramalho – Colaboradora. Aluna de pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, FCM – UNICAMP.

- Simone Corte Batista Souza Lima – colaboradora. Biologista responsável pelo Laboratório de Imunologia e Citometria de Fluxo, CIPED – UNICAMP.
- Maria Heloisa Souza Lima Blotta. Colaboradora. Profª Associada de Imunologia em Patologia Clínica, FCM – UNICAMP.

Análise estatística

- André Moreno Morcillo – Gestor do banco de dados e análise estatística. Prof. Dr. do Departamento de Pediatria, FCM – UNICAMP.

II - Produção das vacinas

- Isaías Raw - Diretor-Presidente da Fundação Butantan.
- Hisako Gondo Higashi – Diretora da Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan.

APÊNDICE 3

Suporte financeiro

1. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

2. Instituto Butantan

Projeto FINEP-01040957/0.

3. FAPESP

Bolsa de mestrado 2005/03539-1.

