

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

FERNANDA OTAVIANO MARTINS

Avaliação da resposta imunológica humoral, em animais de experimentação, induzida pela combinação da vacina DTP-Hib com as vacinas meningocócicas B e C conjugada, desenvolvidas em Bio-Manguinhos

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

Rio de Janeiro

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M386

Martins, Fernanda Otaviano.

Avaliação da resposta imunológica humoral, em animais de experimentação, induzida pela combinação da vacina DTP-Hib com as vacinas meningocócicas B e C conjugada, desenvolvidas em Bio-Manguinhos. / Fernanda Otaviano Martins. – Rio de Janeiro, 2011. xviii, 125 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia em Imunobiológicos, 2011. Bibliografia: f. 95-125

1. Vacinas combinadas. 2. ELISA. 3. DTP-Hib. 4. Vacinas meningocócicas. I. Título.

CDD 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologias Bacterianas, sob a orientação das Dra. Ana Paula dos Santos e Dra. Ellen Jessouroun.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia em Imunobiológicos

FERNANDA OTAVIANO MARTINS

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL, EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO, INDUZIDA PELA COMBINAÇÃO DA VACINA DTP-HIB COM AS VACINAS MENINGOCÓCICAS B E C CONJUGADA, DESENVOLVIDAS EM BIO-MANGUINHOS

Orientadoras: Dra. Ana Paula dos Santos
Dra. Ellen Jessouroun

Dissertação aprovada em 06/Junho/2011

Examinadores:

Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna
Bio-Manguinhos/Fiocruz/Presidente

Prof^a. Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto
IOC/Fiocruz

Prof. Dr. José Mauro Peralta
IMPPG/UFRJ



RIO DE JANEIRO

2011

*Para Roberta, Joel e Francisca
por serem luz para os meus pés.
Vocês são os pilares sobre os quais
sustento minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Fundação Oswaldo Cruz;

A Bio-Manguinhos;

Ao Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos e seus funcionários;

A FIOTEC, pelo suporte financeiro;

Ao LAEAN e ao INCQS, pela colaboração na execução dos protocolos com animais de experimentação e realização das técnicas padronizadas, respectivamente;

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Bacteriana, pela constante alegria e ajuda nos momentos de desenvolvimento desta tese. Muito obrigada pela amizade e carinho;

A Dra. Ana Paula dos Santos, não só pela dedicada orientação mas, acima de tudo, por ser uma amiga e grande incentivadora. Sua confiança me deu forças para trilhar meu crescimento profissional, e sob sua valiosa tutela guiei meus passos! Seus valores e princípios serão lições levadas para toda vida;

A Dra. Ellen Jessouroun, pela orientação e sugestões sem as quais, certamente, esta tese não poderia ser realizada. Seu apoio durante esta jornada foi imprescindível para a conclusão deste trabalho;

Aos colegas do MPTI, em especial a minha amiga Iaralice, por dividir comigo mais este importante capítulo da minha história. Sem você, tudo seria mais difícil e bem menos divertido!

Ao meu amado Vitor! Namorado paciente, amigo confiante. Obrigada por me dedicar tanto amor e carinho, sempre me incentivando a perseguir meus sonhos! Te amo!

Ao meu querido cunhado Marcelo, um dos maiores entusiastas das minhas conquistas. Obrigada por sempre acreditar mais em mim do que eu mesma!

Ao irmão que eu pude escolher: Douglas! É até você que meu pensamento segue quando eu preciso de um ombro amigo!

A minha família e amigos, por entenderem os constantes momentos de ausência e que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho;

E, acima de tudo e de todos: obrigada Deus, por iluminar meus caminhos e me dar forças para continuar, ouvindo minhas preces quando eu queria desistir.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADROS.....	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Breve histórico	1
1.2. A importância da vacinação	6
1.2.1. O Programa Nacional de Imunizações - PNI.....	8
1.2.1.1. Calendário Nacional de Imunizações	9
1.3. Origem e importância de Bio-Manguinhos	10
1.4. Tipos de vacina	12
1.4.1. Vacinas combinadas.....	19
2. Sistema imunológico.....	22
2.1. Memória imunológica	27
2.1.1. Limitações da memória imunológica	28
2.1.1.1. Memória imunológica e vacinação	28
2.1.2. Imunidade às bactérias	30
2.1.2.1. Resposta imunológica a <i>Bordetella pertussis</i>	33
2.1.2.2. Resposta imunológica ao toxóide tetânico	34
2.1.2.3. Resposta imunológica a toxina diftérica	36
2.1.2.4. Resposta imunológica a <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.....	39
2.1.2.5. Resposta imunológica a <i>Neisseria meningitidis</i>	40
3. Vacinas propostas para combinação	41

3.1. Vacinas meningocócicas B e C conjugada.....	41
3.1.1. Processo de produção das vacinas meningocócicas B e C conjugada desenvolvidas em Bio-Manguinhos	44
3.1.1.1. Vacina meningocócica B.....	44
3.1.1.2. Vacina meningocócica C conjugada	45
3.2. Vacina DTP-Hib (<i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>Bordetella pertussis</i> e <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b)	46
4. OBJETIVOS GERAIS	50
4.1. Objetivos específicos	50
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
5.1. Vacinas e metodologias utilizadas	51
5.2. Imunização dos animais utilizados nos experimentos	52
5.3. Avaliação da resposta imunológica de camundongos suíços imunizados com as vacinas combinada completa (DTP-Hib/B/C) e meningocócicas B e C conjugada.....	53
5.3.1. ELISA para vesícula de membrana externa de <i>Neisseria meningitidis</i> grupo B das cepas N44/89 e N603/95	53
5.3.2. ELISA para o polissacarídeo de <i>Neisseria meningitidis</i> grupo C.	54
5.3.3. ELISA para <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	55
5.4. Avaliação da resposta imunológica de camundongos NIH imunizados com a vacina DTP-Hib e vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) pelo ELISA	56
5.4.1. Imunização de camundongos NIH para avaliação da resposta imunológica pelo ELISA	56
5.4.2. ELISA para <i>Bordetella pertussis</i>	56
5.5. Cobaias Short-hair imunizadas com a vacina DTP-Hib e a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) para avaliação da potência dos componentes tetânico e diftérico na combinação e a quantificação de IgG total pelo ELISA	57
5.5.1. Imunização de cobaias Short-Hair para a avaliação da resposta imunológica aos componentes tetânico e diftérico pelo ELISA.....	57

5.5.1.1. ELISA para toxóide tetânico.....	58
5.5.1.2. ELISA para toxina diftérica.....	59
5.5.2. Imunização de cobaias Short-Hair para avaliação da resposta imunológica pelos testes de soroneutralização <i>in vivo</i>	59
5.5.2.1. Determinação da potência das vacinas DTP-Hib e combinada completa (DTP-Hib/B/C) em cobaias pela soroneutralização <i>in vivo</i>	60
5.5.2.1.1. Soroneutralização – componente diftérico	60
5.5.2.1.2. Soroneutralização – componente tetânico	60
5.6. Teste de pirogenicidade.....	61
5.7. Análise estatística	61
6. RESULTADOS	62
6.1. Avaliação da imunogenicidade aos componentes vacinais, em camundongos suíços e NHI imunizados com as formulações propostas, pelo ELISA	62
6.1.1. ELISA para vesícula de membrana externa (cepas N603/95 e N44/89)	62
6.1.2. ELISA para o polissacarídeo de <i>Neisseria meningitidis</i> grupo C	67
6.1.3. ELISA para <i>Bordetella pertussis</i>	74
6.1.4. Elisa para <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.....	77
6.2. Avaliação da potência dos componentes diftérico e tetânico na vacina combinada completa pela soroneutralização <i>in vivo</i> em cobaias	80
6.3. Avaliação da potência dos componentes diftérico e tetânico na vacina combinada completa pelo ELISA a partir de amostras sanguíneas de camundongos suíços	81
6.4. Avaliação da pirogenicidade da vacina combinada completa realizada em coelhos	83
7. DISCUSSÃO.....	84
8. CONCLUSÕES.....	93
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Acs – anticorpos

a.C. – antes de Cristo

ACIP - Advisory Committee on Immunization Practices

AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

BSA – albumina sérica bovina

CBER - Center for Biologics Evaluation & Research

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

dLOS - lipooligossacarídeo detoxificado

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dT – difteria e tétano para adultos

DT – difteria e tétano para crianças

DTaP - vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche

DTP – vacina tríplice difteria, tétano e pertussis

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FDA – Food and Drug administration

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Hib – *Haemophilus influenza* tipo b

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV – Papiloma vírus humano

IFPMA - International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations

IgG – imunoglobulina G

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IPV – vacina inativada contra poliomielite

M – molar

mL – mililitro

MMR – Vacina contra sarampo, caxumba e rubéola

NIH – National Institutes of Health

Nm – nanômetros

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

OPV – vacina atenuada oral contra poliomielite

PB – Paraíba

PBS - Tampão fosfato-salino

pH –potencial hidrogeniônico

PNI – Programa Nacional de Imunizações

PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento

PRRP - polirribosil-ribitol fosfato

RNA – Ácido ribonucléico

SBA - anticorpos bactericidas séricos

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SFB – soro fetal bovino

T0 - tempo 0, correspondente ao soro pré-imune de animais que não receberam nenhuma imunização prévia com os grupos analisados

T15 - tempo 15, correspondente ao soro coletado 15 dias após a coleta do T0

T30 - tempo 30, correspondente ao soro coletado 30 dias após a coleta do T0

T60 – tempo 60, correspondente ao soro coletado 30 dias após a última imunização

TMB - tetrametilbenzidina

ToBI – Toxin Binding Inhibition

Tris/HCL – tris(hidroximetil)aminometano/ácido clorídrico

U/mL – unidades por mililitro

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

VME – Vesícula de membrana externa

µl – microlitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Quantificação dos níveis de IgG total anti-VME da cepa N603-95 avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina meningocócica B brasileira (Grupo 4). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30(antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$).....63
- Figura 2.** Quantificação dos níveis de IgG total anti-VME da cepa N603-95 avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$).....63
- Figura 3.** Comparação das respostas imunológicas a VME da cepa N603/95 de *Neisseria meningitidis* grupo B (entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo1) e meningocócica B (Grupo 4) ($p > 0,05$).64
- Figura 4.** Quantificação dos níveis de IgG total anti-VME da cepa N44-89 avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina meningocócica B (Grupo 4). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$).....65
- Figura 5.** Quantificação dos níveis de IgG total anti-VME da cepa N44-89 avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina combinada completa entre as amostras T0 (pré-imune) e T60 (30 dias após a última imunização) (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) ($p < 0,05$).66
- Figura 6.** Comparação das respostas imunológicas a VME da cepa N44/89 de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) e meningocócica grupo B (Grupo4) ($p > 0,05$).....67

Figura 7. Quantificação dos níveis de IgG total anti-polissacarídeo C avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina meningocócica C conjugada brasileira (Grupo 5). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$).

.....68

Figura 8. Quantificação dos níveis de IgG total anti-polissacarídeo C avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$).....68

Figura 9. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60) induzido pelas vacinas combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) e meningocócica C conjugada (Grupo 5) ($p < 0,05$).

.....69

Figura 10. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (Grupo 1) e da vacina meningocócica C conjugada (Grupo 5) ($p = 0,0577701$). 70

Figura 11. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pela vacina conjugada contra *Neisseria meningitidis* grupo C (Grupo 5) e da mesma combinada à vacina meningocócica B brasileira ($p = 0,05$)..... 71

Figura 12. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pela vacina meningocócica C conjugada (Grupo 5) e da mesma combinada à vacina Hib ($p < 0,05$). 72

Figura 13. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pela vacina meningocócica C conjugada (Grupo 5) e da mesma combinada a vacina DTP ($p < 0,05$). 73

Figura 14. Quantificação dos níveis de IgG total anti-*B pertussis* avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina DTP-Hib (Grupo 2). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). 74

- Figura 15.** Quantificação dos níveis de IgG total anti-*Bordetella pertussis* avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$)..... 75
- Figura 16.** Comparação das respostas imunológicas a *Bordetella pertussis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (Grupo 1) e DTP-Hib (Grupo 2) ($p < 0,05$). 76
- Figura 17.** Quantificação dos níveis de IgG total anti-Hib avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina Hib (Grupo 6). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30(antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$)..... 77
- Figura 18.** Quantificação dos níveis de IgG total anti-Hib avaliados em camundongos imunizados com a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$)..... 78
- Figura 19.** Comparação das respostas imunológicas a *Haemophilus influenzae* tipo b entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (Grupo 1) e Hib (Grupo 6) ($p > 0,05$). 79
- Figura 20.** Potência do componente tetânico na vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) e na DTP-Hib (Grupo 2) pelo teste da neutralização *in vivo* realizado com 5 cobaias ($p < 0,05$). 80
- Figura 21.** Potência do componente diftérico na vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) e na DTP-Hib (Grupo 2) pelo teste da neutralização *in vivo* realizado com 5 cobaias ($p < 0,05$). 81
- Figura 22.** Quantificação dos níveis de IgG total ao componente diftérico na vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) e na DTP-Hib (Grupo 2) avaliada pelo ELISA de amostras sanguíneas de 23 camundongos suíços ($p > 0,05$). 82
- Figura 23.** Quantificação dos níveis de IgG total ao componente tetânico na vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) e na DTP-Hib (Grupo 2) avaliada pelo ELISA de amostras sanguíneas de 23 camundongos suíços ($p > 0,05$). 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Cronologia do desenvolvimento e utilização das vacinas: de Jenner aos dias atuais.....	3
Quadro 1.2. Tipos e exemplos de adjuvantes.....	17
Quadro 5.3. Relação dos grupos e suas formulações correspondentes.....	52
Quadro 6.4. Pirogenicidade dos componentes presentes na vacina e após sua combinação	83

RESUMO

A combinação de vacinas é uma estratégia de grande relevância para o Programa Nacional de Imunizações. Através dela, é possível aumentar a proteção a múltiplas doenças em uma única vacina, bem como diminuir as constantes visitas ao posto de saúde. Contudo, uma das desvantagens em relação a esse tipo de estratégia é a possibilidade de ocorrer interferência antigênica entre os seus componentes, o que pode resultar na diminuição da resposta imunológica. Devido a este fato, foi realizada uma combinação com vacinas já presentes no calendário brasileiro de imunizações (DTP-Hib) a vacinas experimentais em desenvolvimento em Bio-Manguinhos (meningocócica B e meningocócica C conjugada), com a finalidade de apresentar uma nova perspectiva de produto a esta unidade bem como estabelecer a correlação antigênica entre esses componentes, comparando metodologias já padronizadas para este fim à metodologia alternativa (ELISA), além de avaliar a pirogenicidade e a interferência entre os componentes vacinais utilizados na combinação.

A resposta imunológica aos componentes vacinais foi avaliada em camundongos suíços, NIH e cobaias Short-Hair pelo ELISA (VME, polissacarídeo C, PRRP, *Bordetella pertussis*) e os testes de soroneutralização *in vivo* (componentes tetânico e diftérico).

Todos os componentes vacinais avaliados pelo ELISA induziram soroconversão nos animais 30 dias após a última imunização. Quando comparadas à vacina combinada completa, somente a resposta imunológica ao polissacarídeo C sofreu interferência de algum componente vacinal. Após novas combinações da vacina meningocócica C conjugada às outras vacinas, pode-se concluir que a vacinas DTP e Hib interagem positivamente na resposta daquela vacina. Em relação à soroneutralização *in vivo*, houve uma diminuição da potência dos componentes tetânico e diftérico quando cobaias Short-Hair foram imunizadas com a vacina DTP-Hib combinada às vacinas meningocócicas B e C conjugada. Em contrapartida, na quantificação de IgG total em camundongos suíços imunizados com as duas combinações (DTP-Hib e DTP-Hib/B/C), não ocorreu diferença significativa entre os dois grupos. O teste de pirogenicidade realizado em coelhos comprovou que, quando combinadas entre si, às vacinas são capazes de aumentar a temperatura destes animais, provavelmente, devido à presença de *Bordetella pertussis* e VME de *Neisseria meningitidis* grupo B.

Apesar de não ter sido possível à comparação com os testes padronizados, o ELISA mostrou-se muito satisfatório na pesquisa da resposta imunológica em camundongos. Embora preliminares, os resultados são muito importantes, pois introduzem novas perspectivas para a realização de outras combinações que atendam as demandas requisitadas pelo Programa Nacional de Imunizações.

ABSTRACT

The combination of vaccines is a great relevance strategy to the National Immunization Program. It enables increase protection to multiple diseases in a single injection, as well as reduces constant visits to health care. However, a disadvantage of this strategy is antigenic interference among vaccine components, resulting in immune response decreased. Due to this fact, a combination between vaccines of Brazilian immunization calendar (DTP-Hib) and experimental vaccines developed in Bio-Manguinhos (meningococcal B and meningococcal C conjugate) was performed, in order to present a new perspective of product to this unit and establish the antigenic correlation of these components, comparing standardized methodologies with alternative methodology (ELISA), besides evaluating pyrogenicity and interference of combined vaccine components.

The immune response to vaccine components was evaluated in Swiss and NIH mice and Short-Hair guinea pigs by ELISA (OMV, polysaccharide C, PRP, *Bordetella pertussis*) and *in vivo* neutralization test (tetanus and diphtheria components).

All vaccine components assessed by ELISA induced seroconversion rates 30 days after the last immunization in animals. The complete combined vaccine, interfered in the immune response to polysaccharide C. After new combinations of meningococcal C conjugate vaccine to other vaccines, we concluded that DTP and Hib vaccines induce a positive interaction in immune response to that vaccine. Regarding *in vivo* neutralization, there was a decrease of tetanus and diphtheria components potency when Short-Hair guinea pigs were immunized with DTP-Hib combined to B and C meningococcal conjugate vaccines. In contrast, when total IgG in Swiss mice immunized with the two combinations (DTP-Hib and DTP-Hib/B/C) was quantified, no significant difference was observed. Pyrogenicity test in rabbits proved that complete combined vaccine increase the temperature of these animals, probably due to the presence of *Bordetella pertussis* and *Neisseria meningitidis* group B outer membrane vesicle.

Although it was not possible comparison with standardized test, ELISA was a satisfactory test in studying immune response in mice. Although preliminary, the results are important because introduce new perspectives for other combinations could be done to attempt the required demands of National Immunization Program.

1. INTRODUÇÃO

1.1. BREVE HISTÓRICO

O surgimento da imunologia como ciência pode ser datado a partir de uma vacinação bem sucedida contra a varíola, realizada por Edward Jenner. A descoberta da vacina no século XVIII por este médico foi um dos maiores avanços da medicina, tornando-se um marco na história (Brown *et al.*, 1993; Andrade *et al.*, 2003, Morgan, 2007; Baxby 2011). Através da vacinação, milhões de vidas puderam ser salvas a cada ano utilizando, para isso, essencialmente os mesmos princípios que foram estabelecidos por Jenner há mais de 200 anos (Morgan, 2007; Baxby, 2011).

O conceito de imunidade é conhecido desde muito tempo. Na China do século X era comum o uso de uma técnica que consistia na escarificação de pústulas de varíola e posterior inoculação deste material no indivíduo saudável, prática conhecida por variolização (Henderson, 1997; Leung, 2011). Esta técnica induzia imunidade sem causar infecção porque o material era introduzido pela epiderme e não através da via natural de infecção do vírus. O procedimento, no entanto, não era isento de efeitos colaterais, incluindo morte (Geddes, 2006). As fatalidades eram bem significativas ocorrendo em 2% dos indivíduos imunizados (Morgan, 2007; Artestein, 2010).

A variolização atingiu a Europa no início do século XVIII, com a chegada de viajantes de Istambul. Jenner era familiarizado com esta técnica, que se tornou bastante comum e era extremamente efetiva, promovendo proteção duradoura (Riedel, 2005; Morgan, 2007; Artestein, 2010).

Acredita-se que o vírus da varíola, smallpox, apareceu na Terra há 10.000 a.C., na época dos primeiros assentamentos de agricultura do norte da África. É possível que tenha se espalhado de lá para a Índia por intermédio de antigos mercadores egípcios. A evidência mais antiga de lesões cutâneas variólicas foi encontrada nas faces das múmias egípcias. A cabeça mumificada do faraó Ramsés

V (morto em 1156 a.C.) é uma evidência da ocorrência desta infecção. Na mesma época, a doença foi introduzida nas culturas asiáticas, e em algum momento entre os séculos XV e XVII entrou na Europa (Riedel, 2005; Nasir, 2009).

Ainda desconhecida no Novo Mundo, a varíola foi introduzida nas Américas através dos conquistadores espanhóis e portugueses, e dos escravos provenientes de áreas endêmicas da África, sendo responsável pela queda dos impérios Inca e Asteca levando milhares de pessoas à morte (Riedel, 2005; Bhattacharya & Brimnes, 2009).

A varíola acometeu todas as classes da sociedade, causando a morte de 400.000 pessoas anualmente. Os sobreviventes geralmente apresentavam sequelas, com cicatrizes desfigurantes. Porém, era de conhecimento comum que pessoas infectadas que sobreviviam à doença se tornavam imunes (Henderson, 1997; Jastaneiah, 2009).

No ano de 1789, Jenner observou que as ordenhadoras que se recuperavam da varíola bovina jamais contraíam a forma mais grave da varíola humana. Com base nessa observação, ele injetou material de pústula de varíola no braço de um menino. Este apresentou febre baixa e anorexia, e nove dias depois houve melhora dos sintomas. Em julho do mesmo ano Jenner novamente inoculou o mesmo garoto, mas desta vez com material de lesões de uma vaca doente de varíola, verificando que a doença não se desenvolveu. Estava descoberta, assim, a propriedade de imunização que, até hoje, mantém os princípios essenciais estabelecidos por Jenner (Henderson, 1997; Riedel, 2005; Morgan, 2007; Baxby, 2011).

Este experimento foi o primeiro trabalho científico que demonstrou ser possível controlar uma doença infecciosa e Jenner, desta forma, situou suas pesquisas dentro de uma perspectiva clínica e epidemiológica (Guérin, 2007; Baxby, 2011).

Muitos pesquisadores e laboratórios voltaram seus esforços para a pesquisa e desenvolvimento de novas vacinas que permitissem o controle ou erradicação de certas doenças. A varíola, por exemplo, foi erradicada em 1977, graças às campanhas exaustivamente promovidas pela OMS, fazendo desta doença a primeira a ser erradicada no mundo (Geddes, 2006; Guérin, 2007; Fenner, 2011). Já com as vacinas contra poliomielite, difteria, coqueluche, sarampo e rubéola foi possível controlar a disseminação dessas doenças nos países desenvolvidos. Também foram

descobertas vacinas eficazes contra febre tifóide, cólera, peste bubônica, tuberculose, febre amarela, tétano, tifo, e hepatite, entre outras doenças. Para a saúde pública do Brasil, essa importância foi traduzida com a criação do PNI, o Programa Nacional de Imunizações.

Quadro 1.1. Cronologia do desenvolvimento e utilização das vacinas: de Jenner aos dias atuais

Anos	Evento
Pré-1950	
1798	Edward Jenner injeta a secreção das fístulas de uma vaca com varíola – ou seja, pus – em um menino. Semanas depois inocula a criança com varíola humana e ela não adoece. Daí o nome vacina, derivado da expressão latina <i>materia vaccinia</i> ("substância que vem da vaca")
1881	Louis Pasteur cria a primeira vacina bacteriológica contra o <i>Bacillus anthracis</i>
1885	Louis Pasteur cria a vacina anti-rábica, após descobrir que a raiva ataca o sistema nervoso central de mamíferos e é transmitida pela saliva
1897	Descoberta da vacina contra peste bubônica
1911	Começa a imunização contra a febre tifóide
1917	Primeiros experimentos com vacina contra cólera
1923	Desenvolvimento da vacina contra difteria
1926	Desenvolvimento da vacina contra coqueluche
1927	Descoberta da vacina contra tuberculose (BCG)
1927	Descoberta da vacina contra tétano
1935	A vacina contra febre amarela, doença típica de áreas silvestres, é introduzida nos Estados Unidos e sete anos depois passa a ser usada no Brasil.
1945	A primeira vacina contra o vírus Influenza começa a ser utilizada
1949	Pearl Kendrick descobre que a vacina contra coqueluche funciona melhor em presença dos toxóides diftérico e tetânico, já que os três componentes agiam como adjuvantes entre si. Combinou-os então para formar a vacina DPT ou tríplice bacteriana – a primeira a imunizar contra mais de um microrganismo
1950-1960	
1955	Licenciamento da vacina injetável inativada contra poliomielite (IPV).

	Sua eficácia ficou aquém das expectativas dos cientistas
1959	Assembléia Mundial da Saúde baixa resolução inicial pedindo a erradicação global da varíola
1961	Licenciamento da vacina monovalente contra poliomielite
1963	Licenciamento da vacina trivalente contra poliomielite (OPV)
1963	A primeira geração de vacinas contra sarampo é produzida. De 1967 a 1970, o preventivo ajudou a erradicar o sarampo em Gâmbia, na África. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), a doença voltou dois anos depois devido à suspensão da vacinação
1964	<i>Advisory Committee on Immunization Practices</i> (ACIP), projetado para cooperar com o CDC com recomendações sobre o uso de vacinas, realiza sua primeira reunião
1967	Introdução da vacina contra Caxumba
1969	Surge a vacina contra rubéola, mal que ataca principalmente crianças
1970-1980	
1970	Aprovada pelo FDA a vacina americana contra o <i>Bacillus anthracis</i> , conhecida como Anthrax Vaccine Adsorbed (AVA), um produto produzido a partir de células livres inativas
1971	Vacinação de rotina contra a varíola cessa nos Estados Unidos
1971	Introdução da vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola).
1976	Gripe suína: maior programa de vacinação pública nos Estados Unidos; interrompida por associação com síndrome de Guillain-Barré
1977	Último caso autóctone do vírus da varíola (Somália)
1979	Último caso de poliomielite, causada pelo vírus selvagem, adquirido nos Estados Unidos
1980	Varíola é declarada erradicada do mundo
1981	Estudos com conjugados de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
1981	Produção de conjugados contra meningococos A, B e C
1981	Vacina combinada polissacarídica contra meningococos A, C, Y, W135
1982	A vacina contra hepatite B é fabricada com a nova técnica de proteínas recombinantes – genes do vírus são mergulhados em culturas de células, que passam a produzir antígenos. Inoculados no organismo, eles estimulam a produção de anticorpos
1983	Vacina 23-valente contra Pneumococos é disponibilizada para a

	população
1985	Liberada nos EUA uma vacina constituída pelo polissacarídeo capsular purificado do <i>Haemophilus influenza</i> tipo b
1990-2000	
1990	Desenvolvimento da vacina oral contra febre tifóide
1991	Vacina contra hepatite B é recomendada para crianças
1991	Desenvolvimento da vacina acelular contra coqueluche (DTaP)
1993	Começam os testes, em ratos, das primeiras vacinas gênicas (ou de DNA), contra Influenza tipo B, malária e Aids. A meta é chegar à vacina polivalente, de dose única e ação permanente, com a transferência de genes de agentes patológicos para células do homem
1993	Produção de vacina contra a encefalite japonesa com vírus atenuados, liberada apenas em países orientais
1994	A eliminação da poliomielite é certificada nas Américas
1995	Comercialização, nos EUA, da vacina contra varicela
1995	Licenciada vacina contra hepatite A formulada com vírus inativados
1996	Vacina <i>pertussis</i> acelular licenciada para uso em crianças
1998	Primeira vacina contra rotavírus é licenciada
1999	A vacina contra rotavírus é retirada do mercado em decorrência de efeitos adversos
1999	Têm início os testes de vacinas de DNA em humanos. No Brasil, o experimento é feito com a vacina contra <i>Haemophilus influenza</i>
1999	FDA recomenda a remoção de mercúrio de todos os produtos, incluindo vacinas. Medidas para remover o Timerosal das vacinas, um aditivo a base de mercúrio, começam a ser tomadas
2000	Licenciada a primeira vacina conjugada contra Pneumococos
2000	Iniciativa mundial contra o sarampo; 800.000 crianças ainda morrem de sarampo por ano. Estados Unidos declaram o sarampo como não endêmico
2001	Os eventos de 11 de setembro resultam em uma maior preocupação com bioterrorismo. Os Estados Unidos estabelecem um plano de re-introduzir, se necessário, a vacina contra a varíola
2003	Sarampo é declarado não endêmico nas Américas
2003	Primeira vacina viva atenuada contra gripe é licenciada para pessoas de 5-49 anos
2003	Primeiro calendário de imunização de adultos é introduzido

2004	Licenciamento da Pediarix – DtaP, IPV e Hepatite B em dose única
2004	Vacina inativada contra gripe é recomendada para todas as crianças com 6-23 meses de idade.
2005	Estados Unidos declaram a rubéola como não endêmica
2006	Licenciamento da ProQuad – MMR e catapora em dose única
2006	Licenciada a primeira vacina contra HPV
2008	Licenciamento da Pentacel – DtaP, IPV e Hib
2009	Novartis produz o primeiro lote da vacina contra H1N1

Jennings & Lugowski, 1981; Mandell *et al*, 2005; Adaptado de CDC, 2006; Dhillon & Kearn, 2008; Novartis, 2009.

1.2. A IMPORTÂNCIA DA VACINAÇÃO

As doenças infecciosas são as principais causas de morte em populações humanas. As duas contribuições mais importantes para a saúde pública nos últimos 100 anos foram o saneamento básico e a vacinação, os quais, em conjunto, reduziram as mortes por doenças infecciosas, sendo as vacinas os agentes mais efetivos disponíveis no campo da prevenção, controle e erradicação destas enfermidades.

A época de ouro da vacinação aconteceu após a segunda guerra com a introdução de técnicas de culturas celulares por John Enders em 1949, fato que possibilitou o isolamento de vírus. A primeira vacina produzida através desta tecnologia foi a anti-poliomielite inativada, injetável, desenvolvida por Jonas Salk em 1954. Três anos depois Albert Sabin desenvolveu a anti-poliomielite por via oral (Guérin, 2007; Katz, 2009; Enders *et al.*, 2009; Katz, Wilfert & Robbins, 2011).

A vacinação sensibiliza o sistema imunológico, prevenindo o surgimento de doenças causadas por patógenos específicos. O processo imunológico pelo qual se desenvolve a proteção conferida pelas vacinas compreende o conjunto de mecanismos através dos quais o organismo humano reconhece uma substância como exógena, para, em seguida, metabolizá-la, neutralizá-la e/ou eliminá-la (Manual de Normas de Vacinação, 2001; Pulendran & Ahmed, 2011). Este procedimento permite ao sistema imunológico de um indivíduo imunizado reagir rápida e eficazmente quando exposto à doença prevenindo, assim, a infecção (Pulendran & Ahmed, 2011).

As decisões sobre a utilização de vacinas se baseiam no equilíbrio relativo entre riscos e benefícios que essa prática proporciona. Como exemplo, podemos citar a vacina oral contra a poliomielite (OPV) onde o risco das pessoas imunizadas e de seus contatos próximos desenvolverem a paralisia flácida aguda associada à vacina é de 1 a cada 2,4 milhões de doses de vacinas distribuídas. Este risco é pequeno frente às milhares de mortes ocasionadas pelo poliovírus selvagem. Com o advento das campanhas de vacinação em massa o vírus selvagem não é mais frequentemente isolado, reduzindo assim o risco de transmissão do patógeno (Miyoshi *et al.*, 2010; Kidd *et al.*, 2011; Adalja, 2011). No Brasil, o último caso foi registrado em 1989, no município de Souza (PB), recebendo, em 1994, o certificado Internacional de Erradicação da Transmissão Autóctone do Poliovírus Selvagem (ACIP, 1996; ACIP, 2000; Malone e Hinman, 2007; Mello *et al.*, 2010).

Uma característica importante da maioria das vacinas é que elas fornecem proteção tanto individual quanto de rebanho. A maioria das doenças contra as quais existem vacinas é transmitida de pessoa para pessoa. Assim, quando uma proporção suficientemente grande de indivíduos em uma comunidade é imunizada, essas pessoas servem como “barreiras de proteção” contra o risco de transmissão da doença e, indiretamente, protegem aqueles que não receberam a vacina ou aqueles para os quais a imunização não foi efetiva (Freed, Katz e Clark, 1996; Bauch *et al.*, 2009; Bonds & Rohani, 2010). A proporção da população que tem que ser vacinada para fornecer essa imunidade de rebanho varia de acordo com a infectividade do agente. Para a poliomielite, esta proporção é considerada em torno de 80%, enquanto para o sarampo é superior a 90% (Malone e Hinman, 2007; Smith, 2010).

Além disso, as vacinas têm se mostrado uma das medidas em saúde com melhor relação custo-benefício (Ehreth, 2003; IFPMA, 2003; Pichichero, 2009; Ebong & Levy, 2011). Com exceção da água potável, as vacinas são o meio mais efetivo de se reduzir e prevenir doenças infecciosas (IFPMA, 2003; Andre, 2005), tendo mostrado sua eficácia na erradicação e controle de muitas doenças (Schatzmayr, 2003; Andre, 2005; Pichichero, 2009; Ebong & Levy, 2011). A cobertura oferecida pela imunização tem aumentado de forma constante ao longo das últimas duas décadas, salvando milhões de vidas que em outros tempos poderiam vir a ser perdidas (Schatzmayr, 2003; Bärnighausen *et al.*, 2009; Duclos *et al.*, 2009) já que, todo ano, quase 3 milhões de mortes são prevenidas e 750 mil

crianças são salvas da incapacitação (Ehreth, 2003; IFPMA, 2003; Bärnighausen *et al.*, 2009).

Além da saúde pública, a vacinação também é uma medida de grande impacto na esfera econômica, já que as vacinas (Ehreth, 2003; IFPMA, 2003; Armstrong, 2007; Allen, 2011; Stack *et al.*, 2011):

- ✓ Diminuem o número de hospitalizações;
- ✓ Diminuem a necessidade de tratamentos médicos mais caros;
- ✓ Aumentam a produtividade;
- ✓ Previnem os efeitos em longo prazo das doenças;
- ✓ Reduzem a incidência de incapacitação permanente, entre outros.

Entretanto, algumas vezes, as vacinas são vítimas de seu próprio sucesso. Políticas públicas tendem a dar menor prioridade a programas de vacinação quando a incidência e a visibilidade da doença declinam, como consequência natural do aumento da cobertura vacinal. Em alguns casos, doenças que são preveníveis através da vacinação se tornam reemergentes (IFPMA, 2003; Andre, 2005; Greenfield & Bronze, 2010; Barreto *et al.*, 2011). Além disso, é importante que os governantes consigam divisar os benefícios que esta prática traz em longo prazo e atentem para o verdadeiro valor das vacinas (Ehreth, 2003; Kwok, 2011) e os próprios profissionais de saúde devem entender melhor a importância das doenças preveníveis em seus países e avaliar o custo-benefício das vacinas (Kimmel *et al.*, 2007; Kwok, 2011). Medidas desse porte certamente contribuirão para diminuir o tempo entre a pesquisa e desenvolvimento, disponibilidade comercial e o uso de vacinas pela população. No Brasil, um importante programa de sucesso que ilustra essa importância é o Programa Nacional de Imunizações (PNI) (Homma, 2009; Fagundes *et al.*, 2009; Homma *et al.*, 2011).

1.2.1 O PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES – PNI

Em 1973, por determinação do Ministério da Saúde brasileiro, é formulado o PNI com o objetivo de coordenar as ações de imunizações que se caracterizavam, até então, pela descontinuidade, pelo caráter episódico e pela reduzida área de cobertura (Risi Júnior, 2003; França *et al.*, 2009; Hochman, 2011).

Em 1975 foi institucionalizado o PNI, resultante do somatório de fatores, de âmbito nacional e internacional, que convergiam para estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes, buscando a integridade das ações de imunizações realizadas no país. O PNI passou a coordenar, assim, as atividades de imunizações desenvolvidas rotineiramente na rede de serviços e, para tanto, traçou diretrizes pautadas na experiência da Fundação de Serviços de Saúde Pública (FSESP), com a prestação de serviços integrais de saúde através de sua rede própria. A legislação específica sobre imunizações e vigilância epidemiológica (Lei 6.259 de 30-10-1975 e Decreto 78.231 de 30-12-76) deu ênfase às atividades permanentes de vacinação e contribuiu para fortalecer institucionalmente o programa (Moreira, 2002; Risi Júnior, 2003; França *et al.*, 2009; Hochman, 2011).

Após a erradicação da varíola, inicia-se em 1980 a 1ª campanha nacional de vacinação contra a poliomielite, com a meta de vacinar todas as crianças menores de 5 anos em um só dia (Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações, 2009).

O PNI é, hoje, parte integrante do Programa da Organização Mundial de Saúde, com o apoio técnico, operacional e financeiro da UNICEF e contribuições do Rotary Internacional e do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) (Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações, 2009)

1.2.1.1 CALENDÁRIO NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES

A vacina é capaz de imunizar os indivíduos contra doenças infecciosas causadas pelos microrganismos. Através da inativação ou atenuação de suas culturas, esses microrganismos perdem sua ação patogênica conservando sua propriedade de induzir uma resposta imunológica contra o agente agressor (Nature, 2011).

Com a vacinação pode-se atingir a eliminação da doença, ou seja, a interrupção da transmissão e o desaparecimento do agente causal de determinada área geográfica. A erradicação se refere à eliminação global da transmissão do agente infeccioso e, quando ela é alcançada, a vacinação não é mais necessária. Estas ações são coordenadas por meio de programas nacionais de imunização, com metas definidas e com implementação variada de país para país. Podem existir estratégias de emergência (adicionais), mas todos têm dentro de sua rotina seu próprio calendário de vacinação, que pode ser específico para diferentes situações – criança, idoso, viajantes, adolescentes, áreas de difícil acesso, durante epidemias,

peessoas que se encontram em situações especiais (alérgicos, com alterações de hemostasia, prematuros, etc.), entre outros (Aristegui *et al.*, 2005; Enserink, 2010; Tebbens *et al.*, 2010).

Entende-se por calendário vacinal a sequência cronológica de vacinas que são administradas sistematicamente em um país ou área geográfica e cuja finalidade é obter uma imunização adequada da população contra as doenças para as quais existe uma vacina eficaz (Bricks, Gomes e Dias, 1999; Aristegui *et al.*, 2005; Pugliesi, Tura & Andreazzi, 2010).

1.3. ORIGEM E IMPORTÂNCIA DE BIO-MANGUINHOS

A origem de Bio-Manguinhos se confunde com a história de combate a epidemias de grande impacto para a saúde pública brasileira e com o reconhecimento, por parte das instâncias governamentais, da necessidade de criar e fortalecer a produção de vacinas no país (Homma *et al.*, 2005; Homma, 2009).

Em julho de 1900, foi criado o Instituto Soroterápico Federal, como instituição do governo federal, com funções de desenvolver e produzir soros e vacinas requeridas para combater e controlar epidemias como a peste bubônica, febre amarela, varíola e outras que grassavam na cidade do Rio de Janeiro. Em março de 1908, foi transformado em Instituto Oswaldo Cruz e, em 22 de maio de 1970, recebeu a denominação atual de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), incorporando na sua estrutura o Instituto Oswaldo Cruz e outras instituições, como o Instituto Nacional de Endemias Rurais, o Instituto de Leprologia, o Instituto Fernandes Figueira e a Escola Nacional de Saúde Pública (Azevedo, 2000).

Até a década de 1950, o Instituto Oswaldo Cruz produzia dezenas de diferentes vacinas e soros, inclusive para uso veterinário. Os recursos obtidos da venda desses produtos eram investidos em novos laboratórios, no financiamento de pesquisas de novos imunobiológicos, na modernização de laboratórios, na aquisição de novos equipamentos, em pagamento de pessoal e em outras atividades relacionadas. Nas décadas seguintes, por razões de ordem política interna e governamental, diminuiu o foco dessas atividades, resultando em gradativa obsolescência tecnológica (Benchimol, 2001a).

Nos anos iniciais da década de 1970, ainda teve importante papel na produção da vacina contra a varíola, mas, com a erradicação desta virose, tal atividade também deixou de existir e a produção ficou reduzida a apenas um produto

importante: a vacina contra febre amarela. Mesmo esta vacina tinha grandes limitantes tecnológicos, de produção em escala e apresentação; sua produção continuou apenas porque recebia o apoio logístico da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), que financiava a aquisição de pequenos equipamentos e complementava os salários dos pesquisadores envolvidos na produção da vacina (Homma *et al.*, 2005).

A grande epidemia de meningite meningocócica de grupos A e C, na década de 1970, causou centenas de mortes e encontrou o país completamente despreparado para enfrentar essa dramática situação. Para o suprimento da vacina contra a doença, o governo brasileiro buscou o Instituto Mérieux na França que produziu, em operação emergencial, 80 milhões de doses, utilizadas para vacinação em massa da população brasileira (Homma *et al.*, 2005; Khatami & Pollard, 2010).

Ocorre, então, a decisão do governo federal de fortalecer a capacitação tecnológica nacional de produção de imunobiológicos essenciais e estratégicos para a saúde pública, com instalações apropriadas e incorporação de tecnologias contemporâneas. Nesse contexto, cria-se, em 4 de maio de 1976, pela Norma Regulamentar 02/76 do presidente da Fundação Oswaldo Cruz, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), que incorpora as atividades tecnológicas desenvolvidas até então pelo Instituto Oswaldo Cruz herdando, portanto, as funções e atividades do antigo Instituto Soroterápico Federal (Homma *et al.*, 2005).

As atividades assumidas por Bio-Manguinhos não estavam estruturadas como unidade de produção; eram executadas por pesquisadores que, com tecnologias obsoletas, sem condições adequadas de trabalho, sem apoio institucional e de forma artesanal, davam o melhor de si para produzirem as vacinas contra febre tifóide, cólera, antígeno *pertussis* e toxóides diftérico e tetânico. A produção da vacina contra a febre amarela era a única a dispor de uma planta planejada e dedicada para a finalidade. No entanto, as instalações não atendiam às normas internacionais que já norteavam as atividades nessa área, as metodologias de produção eram ultrapassadas, a apresentação da vacina era incompatível com a necessidade do campo e a capacidade de produção, limitada (Homma *et al.*, 2005).

Porém, a evolução de Bio-Manguinhos vem se procedendo de tal modo que possa enfrentar os desafios para atender as novas demandas geradas pelo quadro epidemiológico nacional e os avanços científicos e tecnológicos da área. As atividades desenvolvidas por Bio-Manguinhos são estratégicas para o país, e é

necessário dotar o Instituto de instrumentos legais que flexibilizem a administração de suas atividades. Hoje, Bio-Manguinhos, é uma importante indústria de produção de vacinas para uso humano e reativos para diagnóstico laboratorial (Homma *et al.*, 2005).

Atualmente, Bio-Manguinhos é o maior fornecedor de imunobiológicos do Ministério da Saúde, suprindo 47% da demanda de vacinas do Programa Nacional de Imunizações (PNI). Bio-Manguinhos produz mais de 100 milhões de doses anuais em forma de concentrado viral e cerca de 60 milhões de doses de vacina formulada para atender ao PNI e às Agências das Nações Unidas. Em Bio-Manguinhos, são produzidas as vacinas contra poliomielite, febre amarela, DTP, Hib, meningites A e C, sarampo, rubéola e caxumba (Bio-Manguinhos, 2007; Homma *et al.*, 2011).

Comprometido com os avanços na área de saúde e o acesso da população a imunobiológicos, Bio-Manguinhos tem um papel estratégico para o Brasil, destacando-se tanto no setor produtivo, quanto por seus investimentos em pesquisa e desenvolvimento para geração de novas tecnologias e produtos, conhecimento e economia de divisas para o país. Ao atender às demandas do país, o instituto ganha cada vez mais credibilidade e legítimas parcerias importantes (Bio-Manguinhos, 2007; Homma *et al.*, 2011).

1.4. TIPOS DE VACINA

O uso de vacinas de forma mais ampla foi introduzido a partir do início do século passado e contribuiu de forma inequívoca para a redução da incidência das doenças infecciosas. Nas últimas duas décadas o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas da imunologia e da biologia molecular, lançou as bases de um desenvolvimento sem precedentes para a implementação de novas vacinas e de novas estratégias de vacinação em todo mundo. Apesar dos grandes benefícios das vacinas existentes, há ainda muitas doenças para as quais não existem vacinas (Schatzmayr, 2003; Ulmer & Sztein, 2011; Rappuoli, Black & Lambert, 2011).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas. As vacinas de primeira geração são produzidas com microrganismos vivos e atenuados, como a vacina BCG contra a tuberculose, ou mortos e inativados como a vacina contra a *Bordetella pertussis* (Bloom, 1989; Kano *et al.*, 2007; Rappuoli, Black & Lambert, 2011). Na última década, o grande avanço da biologia molecular permitiu a introdução de novas estratégias para a obtenção e a

produção de antígenos e foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Estas estratégias permitiram o desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre estas estão as de subunidades, consideradas de segunda geração, constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais ou sintéticas, e antígenos recombinantes. As vacinas gênicas ou de terceira geração surgiram com a introdução de genes ou fragmentos de genes, que codificam antígenos potencialmente imunogênicos, em vetores virais ou em DNA plasmidial (Rodrigues Júnior *et al.*, 2004, Kano *et al.*, 2007; Rappuoli, Black & Lambert, 2011).

As vacinas atenuadas com o agente inteiro usam microrganismos vivos atenuados. As vacinas vivas mimetizam melhor uma infecção real. A imunidade vitalícia, especialmente com vírus, é frequentemente alcançada sem reforços e, não raro, com uma eficácia de 95%. Essa eficácia de longa duração ocorre, provavelmente, devido à proliferação dos vírus atenuados dentro do corpo, aumentando a dose original e agindo com uma série de imunização secundária (reforços) (Kaufmam, 1991; Brown *et al.*, 1993; Andrade *et al.*, 2003; Rappuoli, Black & Lambert, 2011). Os microrganismos atenuados são geralmente derivados de mutações acumuladas durante o cultivo de longa duração. Um dos perigos dessas vacinas é que os microrganismos atenuados podem sofrer mutação revertendo para uma forma virulenta. As vacinas atenuadas não são recomendadas para pessoas cujo sistema imunológico esteja comprometido, devendo ser substituídas pelas vacinas inativadas, quando disponíveis (Kaufmam, 1991; Marrack e Kappler, 1994; Andrade *et al.*, 2003; Rappuoli, Black & Lambert, 2011). Exemplos de vacinas atenuadas são as vacinas Sabin (poliomielite) e tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola). A vacina contra o bacilo da tuberculose (BCG), amplamente utilizada, e algumas das vacinas tifóides administradas oralmente contêm bactérias atenuadas.

As vacinas inativadas utilizam microrganismos mortos com formalina ou fenol e temos como exemplo, utilizadas em seres humanos, as vacinas contra a raiva, gripe e poliomielite (Salk). Entre as vacinas inativadas bacterianas estão a vacina contra pneumonia pneumocócica e a cólera (Kaufmam, 1991, Andrade *et al.*, 2003; Rappuoli, Black & Lambert, 2011). Essas vacinas oferecem como grande vantagem uma maior segurança, pois não há multiplicação do agente no organismo do vacinado, porém, tendem a induzir uma imunidade menos duradoura e a exigir, com isso, a aplicação de mais de uma dose no esquema de imunização, bem como a repetição das imunizações ao longo dos anos. Exemplo típico são as vacinas

inativadas contra a influenza, que devem ser aplicadas a cada ano. Este fato significa um custo mais alto na utilização desses produtos.

Os toxóides, toxinas inativadas, são vacinas dirigidas contra as toxinas produzidas por um patógeno (Andrade *et al.*, 2003; Grabestein, 2010). Essas vacinas são usadas quando uma toxina bacteriana é o principal agente causador da doença. As toxinas podem ser inativadas com o uso de formalina, uma solução de formaldeído e água esterilizada (Grabestein, 2010). Quando o sistema imune entra em contato com uma vacina contendo uma toxina inócua, ele torna-se apto a combater a toxina natural, produzindo anticorpos capazes de bloquear a toxina (Namur, 2007; Grabestein, 2010).

As vacinas de subunidades usam somente os fragmentos antigênicos de um microrganismo que melhor estimulam uma resposta imune (Donnelly *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 2003; Rigano *et al.*, 2009).

A partir de 1968 começaram a ser desenvolvidas vacinas utilizando fragmentos de cápsula bacteriana de natureza polissacarídica. Os polissacarídeos meningocócicos foram as primeiras vacinas bacterianas definidas quimicamente (Guérin, 2007; Rappuoli, Black & Lambert, 2011). Estas vacinas se mostraram imunogênicas em adultos e crianças acima de 2 anos de idade e foram objeto de vários ensaios clínicos em países da Europa, Américas e África (Frasch, 1995). Ainda hoje as vacinas polissacarídicas contra *Neisseria meningitidis* são produzidas e utilizadas no mundo em epidemias e surtos epidêmicos (Rappuoli, Black & Lambert, 2011).

As vacinas de subunidades são inerentemente mais seguras porque não podem se reproduzir no organismo receptor. Elas também contêm pouco ou nenhum material estranho e por isso tendem a produzir menos efeitos adversos (Brown *et al.*, 1993; Andrade *et al.*, 2003; Rigano *et al.*, 2009).

Entre as novas tecnologias destaca-se o uso do DNA recombinante para o preparo de antígenos protetores em larga escala (Schatzmayr 2003; Homma *et al.*, 2011). A tecnologia do DNA recombinante representou um grande avanço, pois permite inserir no DNA de um dado organismo o gene que codifica a produção do componente bioquímico causador da imunidade de outro microorganismo. O material geneticamente modificado pode então ser injetado em seres humanos e estimular a produção de anticorpos contra ele mesmo e contra o agente infeccioso

cujo gene a ele foi incorporado. Essa técnica permitirá que o vírus da varíola bovina, acrescido de fragmentos genéticos dos principais agentes infecciosos atue como uma vacina viva contra diversas doenças. Os vetores atenuados mais utilizados são o vírus da vaccínia, poliovírus, cepas atenuadas de *Salmonella*, cepas de BCG do *Mycobacterium bovis*, entre outros (Kalil *et al.*, 2008; Dougan, Gouling & Hall, 2011).

A vacina de ácido nucléico, ou vacina de DNA, é um dos mais novos e mais promissores tipos de vacinas, apesar de não ter ainda resultado em nenhuma vacina para seres humanos. Experimentos com animais mostram que a injeção intramuscular de plasmídeos contendo DNA, sem as histonas, resulta na produção da proteína modificada por esse DNA. Essas proteínas permanecem no organismo receptor e desencadeiam uma resposta imune. A segurança desse tipo de vacina é incerta, mas estão sendo consideradas muitas aplicações, especialmente contra câncer e vírus que possuem altas taxas de mutação (como *influenza* e HIV) (Donnelly *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 2003; Moraes, Luna & Grimaldi, 2010). Outros trabalhos também estão sendo realizados com vacinas compostas de RNA. A vantagem desse tipo de vacina seria a velocidade, pois, uma vez dentro das células, o RNA seria rapidamente traduzido em proteínas antigênicas. Entretanto, a molécula de RNA é menos estável que a de DNA, uma característica que pode dificultar a produção e a distribuição dessas vacinas (Weiner e Kennedy, 1999; Srivastava e Liu, 2003; Luke *et al.*, 2009; Diken *et al.*, 2011).

Porém, a integração do DNA plasmidial em cromossomos de células somáticas pode potencialmente gerar efeitos patológicos. A mutagênese por inserção poderia levar ao desenvolvimento de câncer, caso esse evento ative (proto-oncogenes) ou inative genes (supressores de tumor) implicados na regulação do ciclo celular. Essa inserção pode ocorrer ao acaso ou por meio da recombinação homóloga, sendo que o primeiro evento é o mais frequente. Para tentar diminuir a possibilidade destes eventos ocorrerem, deve-se evitar, se possível, que existam sequências nucleotídicas homólogas ao do genoma humano no plasmídio vacinal e que este não se replique nas células hospedeiras (Azevedo e Oliveira, 2001; Jackson & Bartek, 2009).

A mais moderna tecnologia aplicada na produção de vacinas é a denominada vacinologia reversa, desenvolvida nos últimos dez anos. É feito o sequenciamento do genoma do agente, a análise de suas proteínas, previstas através da bioinformática e com base nas características hidrofóbicas ou hidrofílicas,

determinando a posição provável das proteínas dentro do microorganismo. Finalmente é avaliada sua capacidade teórica de produzir resposta imune. Os peptídeos selecionados podem, então, ser sintetizados ou expressos em vetores para a comprovação de sua real capacidade de induzir imunidade em animais (Adu-Bobie *et al.*, 2003; Sette & Rappuoli, 2010). Essa tecnologia tende a substituir os métodos tradicionais de preparo de vacinas, em especial para bactérias nessa primeira fase, podendo ser aplicada também a vírus. Através dela elimina-se a necessidade de que os agentes sejam inicialmente cultivados e modificados em suas características de virulência ou os fragmentos dos vírus e bactérias sejam isolados e purificados previamente, antes de serem inoculados para a análise de sua resposta imune (Schatzmayr, 2003; D'Argenio & Wilson, 2010).

Novas tecnologias despontam no campo de desenvolvimento de vacinas. A produção de alimentos que funcionariam como vacinas é uma delas. Cereais e frutas seriam geneticamente modificados e, ao serem ingeridos, estariam imunizando o organismo de quem os consome. Estudos realizados com antígenos do vírus da hepatite B produzidos em batata indicam que camundongos que receberam tubérculos modificados eram capazes de produzir altos títulos de anticorpos HBsAg (Youm *et al.*, 2010).

A eficácia das vacinas depende, algumas vezes, da presença de um adjuvante na sua formulação. Entre os adjuvantes, os mais comumente utilizados são aqueles que contêm alumínio, descobertos em 1926 e ainda utilizados. No início dos anos de 1900, quando infecções por *Clostridium tetani* e *Corynebacterium diphtheriae* tornaram-se problemas de saúde pública, imunizações com conjugados de toxina-antitoxina apresentaram melhor proteção e menos efeitos colaterais do que doses da toxina somente. Inicialmente, pensava-se que o alumínio era um adjuvante efetivo, pois permitia que o antígeno permanecesse mais tempo no organismo, liberando-o em pequenas quantidades e estimulando o sistema imunológico por muito tempo (“efeito depósito”). Durante alguns anos, essa explicação foi dogmaticamente aceita. Porém, muitas pesquisas sobre a atuação dos adjuvantes no organismo descrevem diferentes modos de atuação que se assemelham ou vão contra a teoria do “efeito depósito” (Marrack, McKee & Munks, 2009). O progresso nessa área, no entanto, é comprometido, no entanto, por falta de conhecimento acessível referentes à química bioinorgânica dos adjuvantes de alumínio e, conseqüentemente, a aplicação e interpretação inadequadas de modelos experimentais referentes ao seu modo de ação (Exley, Siesjö & Eriksson, 2010).

Embora sejam os mais utilizados, os adjuvantes a base de alumínio não são os únicos. De acordo com o quadro 1.2, sais minerais, microbianos, particulados, emulsões em óleo e a base de surfactantes, sintéticos, citocinas, genéticos, entre outros, podem ser empregados como adjuvantes (Vogel & Hem, 2004; Lambrecht *et al.*, 2009; O'Hagan, Tsai & Reed, 2011).

Quadro 1.2. Tipos e exemplos de adjuvantes

Tipos de adjuvante	Exemplos
Sais minerais	Fosfato de cálcio (Sharp <i>et al.</i> , 2009)
Microbianos	Exotoxinas (McAleer <i>et al.</i> , 2010)
Particulados	Complexos imunoestimulatórios (Azevedo <i>et al.</i> , 2010) Lipossomos (Slütter <i>et al.</i> , 2011)
Emulsão em óleo e a base de surfactantes	Adjuvante de Freund (Rosenberg <i>et al.</i> , 2010) Emulsões microfluidizadas (O'Hagan, Tsai & Reed, 2011)
Sintéticos	Saponinas (Ragupathi <i>et al.</i> , 2011)
Citocinas	IL-2 (Sabbatini <i>et al.</i> , 2010) IFN- γ (Toporovski, Morrow & Weiner, 2010)
Genéticos	Genes em plasmídeos (Ramanathan <i>et al.</i> , 2009)

O desenvolvimento de novas vacinas segue a tendência atual de conjugação e combinação. Nas duas últimas décadas, novos conhecimentos no campo da imunologia e na tecnologia de produção de vacinas levaram ao desenvolvimento de vacinas conjugadas (Bruge *et al.*, 2004; Robbins *et al.*, 2011). A conjugação química de polissacarídeos bacterianos a proteínas carreadoras tem contribuído para o aumento da resposta imunológica contra polissacarídeos capsulares e na prevenção de doenças causadas por bactérias tais como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Este complexo polissacarídeo-proteína leva à produção de níveis mais elevados de anticorpos, sendo imunogênico já no lactente (Ebbert e Mascolo, 2004; Østergaard *et al.*, 2009).

As vacinas combinadas consistem em dois ou mais microrganismos vivos, inativados ou antígenos purificados combinados pelo fabricante ou imediatamente antes da administração. Uma vacina combinada é elaborada com a finalidade de prevenir múltiplas doenças, prevenir uma doença causada por diferentes cepas ou

sorotipos do mesmo microrganismo, diminuindo o custo com a imunização (Ebbert e Mascolo, 2004; Agmon-Levi, 2009).

A reatividade cruzada com um componente pode ocorrer em uma combinação de vacinas atenuadas, onde eventos de recombinação podem permitir microrganismos atenuados serem reconstituídos em formas virulentas. O CBER (Center for Biologics Evaluation & Research), órgão ligado ao FDA, aconselha que as combinações devam ser caracterizadas e seus componentes avaliados através de uma bateria de exames físico-químicos, bioquímicos e biológicos (Ebbert e Mascolo, 2004).

Segundo o CBER, é necessária a condução de estudos pré-clínicos em animais a fim de avaliar as consequências da combinação em relação à potência e a imunogenicidade. O produtor deve avaliar algumas das características físicas, incluindo a ressuspensão da vacina combinada e assegurar a qualidade dos recipientes que contem a vacina. Se o volume da vacina combinada é muito grande ou sua concentração é muito alta para ser seguramente administrada, o produtor pode, por exemplo, reduzir a dose de alguns ou de todos os componentes vacinais. Os efeitos de tais alterações devem ser avaliados antes do início dos ensaios clínicos (Ebbert e Mascolo, 2004).

Um dos principais problemas do desenvolvimento e da produção de novas vacinas tem sido o relativo baixo interesse das indústrias farmacêuticas, pois as vacinas representam apenas 2% do mercado mundial dessa indústria (Greco, 2002). A labilidade dos produtos, o risco da responsabilidade por reações adversas, o alto custo de desenvolvimento das novas vacinas e os preços não atrativos, em especial pela limitada capacidade de compra pelos países em desenvolvimento são outros entraves na produção de vacinas, limitando assim, os investimentos na área. Apesar de todos esses problemas globais, é reconhecido que poucas ações de saúde pública apresentam uma relação custo-benefício tão favorável como a utilização de vacinas em uma população (Schatzmayr, 2003).

Neste sentido, a elaboração de vacinas combinadas utilizando as vacinas já existentes pode contribuir para a melhoria dos agravos de saúde pública, pois uma imunização contendo pelo menos três formulações já seria suficiente para prevenir três infecções diferentes e, conseqüentemente, proporcionar grande impacto no controle destas doenças.

1.4.1 VACINAS COMBINADAS

A vacina é capaz de imunizar pessoas e animais contra doenças infecciosas causadas por bactérias ou vírus. Elas são culturas desses microrganismos que, inativados ou atenuados, perdem sua ação patogênica, mas conservam a propriedade de induzir o organismo a produzir anticorpos contra o agente agressor. Uma vez estimuladas por uma vacina, as células produtoras de anticorpos tornam-se sensíveis ao agente infeccioso e respondem a novas investidas com a produção de mais anticorpos, restabelecendo assim a resposta imunológica. Vacinas de microrganismos atenuados, tais como sarampo, hepatite e varíola, geralmente produzem uma forma branda ou subclínica da doença. As vacinas de bactérias ou vírus inativados, como a da gripe, a da raiva e a da febre tifóide, precisam ser administradas em grandes quantidades e produzem resposta imunológica após um período prolongado (Goldenthal *et al.*, 1995; Salusto *et al.*, 2010).

No fim do século XX, criaram-se novos tipos de vacinas com a ajuda de avançadas técnicas de laboratório onde se podem identificar, em um agente infeccioso, componentes bioquímicos que estimulam a resposta imunológica do organismo agredido. Esses componentes bioquímicos podem então ser sintetizados em laboratório e depois administrados em seres humanos, nos quais atuam como qualquer outro tipo de vacina. A tecnologia do DNA recombinante representou um grande avanço para esse método, pois permite inserir no DNA de um dado organismo, por exemplo, vírus da varíola bovina, o gene que codifica a produção do componente bioquímico ao qual será utilizado para a indução da resposta imunológica dos indivíduos vacinados (Guérin, 2007; Ross *et al.*, 2009; Luke *et al.*, 2009).

O anseio em melhorar a saúde pública e reduzir os custos para o país tem resultado no desenvolvimento de vacinas combinadas, que permitem a redução do número de imunizações necessárias para assegurar a proteção contra múltiplas doenças diminuindo, assim, o número de visitas aos órgãos de saúde e os gastos com a administração de vacinas. O grande desafio na combinação de vacinas é manter uma resposta imunológica tão eficaz quanto a vacina aplicada separadamente (Dagan, 2005).

Historicamente, a co-administração de vacinas com o intuito de imunizar simultaneamente contra múltiplos patógenos foi motivada por um número de fatores na prática clínica e nos avanços no *design* de vacinas conjugadas. Esses fatores

incluíam a necessidade de aplicar certos tipos de imunizações em determinadas faixas etárias, a sobreposição epidemiológica de certas infecções, compatibilidade e estabilidade das vacinas, considerações de segurança, benefícios imunológicos, entre outros (Igietseme *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2010).

As vacinas combinadas podem conter múltiplos produtos que são ativos na prevenção de mais de uma doença infecciosa e, alternativamente, ela pode combinar componentes ativos para a prevenção de uma doença causada por múltiplos sorotipos ou cepas de uma única espécie patogênica. Outros tipos de combinações de vacina incluem antígenos de patógenos causando diferentes doenças como, por exemplo, combinação do toxóide tetânico, toxóide diftérico e da *Bordetella pertussis*, além da vacina tríplice viral. A combinação pode ser formulada durante a fabricação ou os componentes podem ser formulados separadamente e combinados no momento da utilização (Goldenthal *et al.*, 1995; Parkman, 1995; Jatana & Nair, 2007). Neste contexto, um grande desafio da combinação de vacinas é manter uma resposta imunológica tão eficaz quanto àquela apresentada quando as vacinas são aplicadas separadamente.

Devem ser consideradas diferentemente a vacinação combinada, a vacinação associada e a vacinação simultânea. Na vacinação combinada, dois ou mais agentes, são administrados numa mesma preparação (por exemplo, vacina tríplice DTP, vacinas duplas DT e dT e vacina oral trivalente contra a poliomielite, que contém os três tipos de vírus atenuados da poliomielite). Na vacinação associada, misturam-se as vacinas no momento da aplicação, o que pode ser feito, por exemplo, entre determinadas apresentações das vacinas contra *Haemophilus influenzae* do tipo b e vacina tríplice DTP. Chama-se a atenção para o fato de que a autorização para o uso dessas misturas tem que ser precedida de estudos que autorizem seu emprego, específicos para cada produto a ser associado. Na vacinação simultânea duas ou mais vacinas são administradas em diferentes locais ou por diferentes vias num mesmo atendimento (por exemplo, a vacina tríplice DTP por via intramuscular, a vacina contra o sarampo por via subcutânea, o BCG por via intradérmica e a vacina contra a poliomielite por via oral) (Manual de Normas de Vacinação, 2001).

As vacinas combinadas a serem usadas são as registradas e licenciadas para uso no Brasil. A associação de vacinas só é permitida para vacinas e fabricantes específicos, de acordo com as recomendações de cada produto. Em relação às vacinas incluídas no PNI, as aplicações simultâneas possíveis não aumentam a

frequência e a gravidade dos efeitos adversos e não reduzem o poder imunogênico que cada componente possui quando administrado isoladamente (Manual de Normas de Vacinação, 2001).

A combinação de vacinas bacterianas visando proteção múltipla numa mesma injeção teve sua primeira iniciativa na vacina tríplice bacteriana (DTP), licenciada como vacina em 1949, protegendo crianças de 2 a 6 meses contra difteria, tétano e coqueluche (ECDC, 2009). A partir dessa iniciativa, a combinação de imunógenos originou a vacina tríplice viral (rubéola, caxumba e sarampo) e, mais recentemente, a vacina 23-valente contra *Streptococcus pneumoniae* (Lopes & Berezin, 2009; Homma *et al.*, 2011). Outro exemplo é a vacina trivalente contra poliovírus que contém todos os três tipos antigênicos, proporcionando proteção contra todos os poliovírus que causam paralisia. Esta ampla cobertura antigênica seria impossível se os componentes vacinais fossem monovalentes (Parkman, 1995; Minor, 2009).

A combinação de vacinas tem sido discutida e avaliada pelos principais produtores de vacina no mundo, já que as preparações obtidas destas combinações representam produtos com alto potencial de mercado, desde que sua eficácia e segurança sejam comprovadas (Gupta, 1999).

Bio-Manguinhos, há cerca de oito anos, negociou com o laboratório Glaxo Smith Kline a transferência de tecnologia de produção da vacina conjugada contra a bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b. Esta bactéria é responsável pelo maior número de casos de meningite em crianças no mundo, e sua introdução no programa de imunizações dos Estados Unidos reduziu drasticamente a ocorrência desta doença no país (Sáfadi, 2006). Seguindo a tendência mundial da combinação, a vacina produzida no Brasil, resultado desta transferência de tecnologia, foi incluída no Programa Nacional de Imunizações (PNI), combinada à vacina DTP. Esta combinação aliou dois dos principais produtores de vacinas no país, uma vez que reuniu a vacina produzida em Bio-Manguinhos à DTP produzida no Instituto Butantan.

A perspectiva de combinação de vacinas em Bio-Manguinhos, a partir da tetravalente DTP-Hib, com novas vacinas provenientes do desenvolvimento tecnológico surge como uma iniciativa interessante, principalmente com a possibilidade de obtenção de um produto que tenha ação importante contra meningites bacterianas. A redução da meningite causada por *Haemophilus influenzae* em crianças a partir da introdução da vacina conjugada no PNI abre um nicho para o crescimento de casos de meningites causadas por *Neisseria*

meningitidis e *Streptococcus pneumoniae*. Desta forma, a combinação destes imunógenos em uma mesma vacina e a avaliação da resposta protetora a cada um dos componentes aparece como um tema de grande importância, abordado neste estudo.

2. SISTEMA IMUNOLÓGICO

A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se constitui no principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, algumas vezes associadas com alto índice de mortalidade. É também conhecido o fato de que, para a quase totalidade das doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior ao dos que apresentam a doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de controlar esses microrganismos e impedir a progressão da infecção. Em contraste, as deficiências imunológicas, sejam da imunidade inata (disfunções de células fagocíticas e deficiência no sistema complemento) ou da imunidade adaptativa (comprometimento na produção de anticorpos ou na função de células T), são fortemente associadas com aumento de susceptibilidade a infecções (Janeway, 2001; Iwasaki & Medzhitov, 2010).

Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infectantes, têm sido acumuladas nos últimos anos evidências de que em muitas doenças infecciosas, os principais aspectos patológicos não estão relacionados como uma ação direta do agente agressor, mas sim como uma resposta imune anormal. Em muitas dessas situações existe uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exacerbada e não modulada que tem como consequência um dano tecidual. Em outros casos, agentes infecciosos, seja por mimetizar antígenos próprios, por induzir proliferação de células auto reativas ou por aumentar nas células infectadas a expressão de moléculas de MHC e moléculas coestimulatórias, podem desencadear doenças auto-imunes (Cooke *et al.*, 2004; Furuichi, Wada & Kaneko, 2011).

O conhecimento de que diferentes tipos de microrganismos são combatidos pelos componentes da resposta imunológica data do início dos anos 50, quando ficou documentada a importância dos anticorpos na destruição de bactérias extracelulares. Embora isoladamente os anticorpos por si só não tenham a capacidade de destruir bactérias, eles podem neutralizar os microrganismos,

impedindo sua ligação às células alvo do hospedeiro (Crane, Warner & Bosio, 2010). Adicionalmente, em associação com o complemento, os anticorpos podem lisar bactérias e funcionar como opsoninas, facilitando assim a fagocitose (Koch *et al.*, 2010).

Os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos exercem sua ação de destruição do microrganismo de forma mais ampla contra vários tipos de agentes e são células importantíssimas para a defesa do hospedeiro. Pelas células fagocíticas expressarem em sua membrana receptores, tais como receptores *toll-like* (TLR), que se ligam especificamente a padrões moleculares existentes em diversos agentes infectantes (PAMPs) (Pasare & Medzhitov, 2004; Kumar, Kawai & Akira, 2009), torna impróprio denominar inespecífica a resposta imune inata. Os neutrófilos têm um papel fundamental contra bactérias; os macrófagos são células importantes na defesa contra agentes intracelulares (protozoários e bactérias intracelulares); e os eosinófilos, não tanto pela atividade fagocítica, mas são importantes pela atividade citotóxica contra helmintos (Bell 2009; Balla *et al.*, 2010).

O sistema complemento é um dos principais efetores da imunidade humoral e é também um importante mecanismo efetor da imunidade inata. É a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos, e a ativação da cascata leva a deposição de C3 na superfície bacteriana. A opsonização do patógeno é seguida por fagocitose e formação do complexo de ataque à membrana (Joiner, 1988; Hallström *et al.*, 2008; Granoff 2009; Dunkelberger & Song, 2010). A via clássica do sistema complemento é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo e pela proteína reativa C (Hallström *et al.*, 2008; Volanakis, 2001; Demchenko *et al.*, 2010; Wallis *et al.*, 2010), enquanto a via alternativa é espontaneamente ativada através do contato direto com partículas ou células estranhas ao organismo (Hallström *et al.*, 2008; Walport, 2001; Demchenko *et al.*, 2010; Wallis *et al.*, 2010). Ambas as vias levam a formação de C3 convertase, com subsequente clivagem de C3 em C3a e C3b (Wallis *et al.*, 2010). Posteriormente a via terminal é ativada, o que é um passo fundamental na produção de resposta inflamatória. Para evitar danos não específicos pela excessiva ativação do complemento, a cascata do complemento é rigidamente controlada. Importantes reguladores do sistema complemento são o fator H e o fator H proteína-*like* (via alternativa) (Hallström *et al.*, 2008; Zipfel *et al.*, 2002; Abarategui-Garrido *et al.*, 2009), C4BP (vias clássica/lectina) (Hallström *et al.*, 2008; Blom, Villoutreix & Dahlback, 2004) e vitronectina (via terminal) (Hallström *et al.*, 2008; Schvartz, Seger

& Shaltiel, 1999). A meta do sistema complemento é depositar grandes quantidades de C3b em um alvo.

A ativação do complemento se dá por três vias principais: clássica, alternativa e das lectinas. Na via clássica, complexos imunes se ligam a C1 e a protease da subunidade C1s cliva C4 e C2. Os fragmentos de C4 e C2 se ligam para formar uma enzima, a C3 convertase, que cliva C3 em C3b. A via da lectina é um sistema análogo, exceto que complexos de lectina com açúcares são formados, e proteínas séricas associadas a manose (MASP) tomam o papel de C1. A deficiência da MBL está associada à maior susceptibilidade a doenças infecciosas e autoimunes (Roskamp *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007; Inoshita *et al.*, 2009).

A lectina ligadora de manose (MBL) é um dos componentes centrais da via das lectinas e faz parte de um grupo de proteínas chamadas colectinas, as quais se ligam aos carboidratos de superfície associados a estruturas de colágeno presentes em microrganismos, induzindo a agregação e, desse modo, impedindo a infectividade ou mediando a fagocitose através de receptores específicos nos fagócitos. As colectinas possuem duas funções: a primeira é ligar-se especificamente a carboidratos estruturais na superfície do patógeno; a outra função é sinalizar para outras moléculas e células, a fim de destruir o patógeno. A MBL pode interagir diretamente com receptores de colectinas nas células fagocíticas, promovendo a opsonização e fagocitose em processos imunes. Além disso, essa proteína é capaz de modular a resposta inflamatória, estimulando a liberação de citocinas por monócitos de maneira dose-dependente. Pode também participar na eliminação de células apoptóticas, sinalizando-as para que sejam fagocitadas (Roskamp *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007; Inoshita *et al.*, 2009).

A via das lectinas usa uma proteína similar a C1q (uma colectina) que induz a cascata do complemento. A lectina ligadora de manose, como a C1q, é uma molécula formada por seis alças que formam um complexo com duas proteases, as MASP-1 e MASP-2 similares a C1r e C1s. Quando o complexo MBL liga-se à superfície do patógeno, as MASP-1 e MASP-2 são ativadas para clivar C4 e C2. Portanto, a via da MBL inicia a ativação do complemento da mesma forma que a via clássica, formando convertase C3 a partir de C2b unida a C4b (Roskamp *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007; Inoshita *et al.*, 2009).

A via alternativa é iniciada a partir da hidrólise espontânea de C3, componente abundantemente presente no plasma sanguíneo, em C3(H₂O). Esta mudança conformacional permite a ligação do fator B, permitindo o fator D clivar o

fator B em Ba e Bb. Forma-se então C3(H₂O)Bb, complexo conhecido como C3 convertase de fase fluida. Esta convertase, embora produzida apenas em pequenas quantidades, é capaz de decompor múltiplas proteínas C3 em C3a e C3b. A via alternativa C3 convertase consiste na ativação dos fatores B e D, formando um composto instável que pode tornar-se estável após ligação a properdina, uma proteína do soro. Após a formação da C3 convertase, o sistema complemento segue o mesmo caminho da via clássica, independentemente do meio de ativação (Holes e Thurman, 2004; Lutz *et al.*, 2007).

A resposta mediada pelas células T é extremamente efetiva no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares, como vírus, protozoários, fungos e bactérias intracelulares. As células T podem exercer sua função através da citotoxicidade mediada por células CD8+ ou através da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares. Outros elementos que podem participar do processo de defesa contra agentes infecciosos incluem o queratinócito e a célula de *Langerhans*, já que muitas vezes a pele é invadida por diversos microrganismos. Os queratinócitos possuem a capacidade de secretar inúmeras citocinas, dessa maneira ativando e recrutando células inflamatórias e linfócitos para a pele (Debenedictis *et al.*, 2001). A célula de *Langerhans*, por sua vez, exerce o papel fundamental de vigilante no tecido cutâneo, fagocitando desde partículas protéicas inanimadas até vírus, bactérias ou qualquer outro microrganismo invasor. Após a fagocitose a célula de *Langerhans* migra para o linfonodo regional a fim de realizar a apresentação antigênica aos linfócitos, dando início ao desenvolvimento de imunidade específica protetora, tolerância ou hipersensibilidade (Romani *et al.*, 2001).

Se de um lado já eram conhecidas as células e os mediadores envolvidos nas defesas dos humanos, só recentemente foi documentado o fato de que a população de células T CD4+ (T auxiliares) é heterogênea, sendo constituída de cinco subpopulações: as células Th1, Th2, Th0, Th17 e *Treg* (Mosmann & Coffman, 1989; Machado *et al.*, 2004). Essa observação tem contribuído bastante para o entendimento da imunopatogenicidade da maioria das doenças infecciosas (Machado *et al.*, 2004).

É fundamental o entendimento de que a resposta das células T auxiliares é importante na defesa do hospedeiro contra as infecções, ativando macrófagos por caminhos distintos e induzindo a produção de diferentes classes de anticorpos em células B (McKee *et al.*, 2010). A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra

protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares. Essas respostas são também antagônicas, desde que o IFN- γ modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada. Adicionalmente, as células regulatórias da resposta imune que expressam as moléculas CD4 e CD25 (Treg) e produzem IL-10 e/ou TGF β (Tr1 ou Th3) estão envolvidas em modular a resposta imune, impedindo ou diminuindo as conseqüências das reações de hipersensibilidade e das doenças auto-imunes (Mills & McGuirk, 2004).

As células Th17 possuem um desenvolvimento distinto das células Th1 e Th2 e uma quantidade excessiva destas células tem um papel chave nas doenças autoimune, porém têm uma função importante na imunidade contra os microrganismos na pele e na mucosa (Harrington *et al.*, 2005). São responsáveis pela produção de IL17 em casos de infecção do hospedeiro por várias espécies de bactérias e fungos, bem como das interleucinas 22 e 21, as quais estimulam as células epiteliais na produção de proteínas antimicrobianas, para a eliminação de alguns microrganismos como *Candida* e *Staphylococcus*. As células Th17 produzem dois membros da família IL 17, IL 17A e IL 17F, as quais estão envolvidas no recrutamento, ativação e migração dos neutrófilos (Stockinger *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2009).

A capacidade de reativar a memória imunológica após desafio repetido ao mesmo antígeno é característica definidora do sistema imunológico adaptativo. Uma resposta imunológica típica resulta na produção de anticorpos de alta-afinidade, predominantemente aqueles com mudança em seu isotipo, característica essencial para depletar agentes infecciosos, sendo a base da imunidade humoral e eficácia de várias vacinas. Este anticorpo protetor é mantido pela combinação de uma relativa longa vida no soro e secreção contínua de novos anticorpos por células plasmáticas. O segundo resultado-chave da resposta imunológica humoral é a formação de células B de memória que são capazes de responder rapidamente à re-exposição a antígenos (Nutt & Tarlinton, 2011).

A geração de células B ocorre ao longo da vida e prossegue por várias fases distintas e pontos de controle. Após o nascimento, a geração de células B ocorre na medula óssea, onde as células evoluem entre pró e pré-estágios de desenvolvimento. Na fase seguinte, como células imaturas, adquirem especificidade

do antígeno em virtude da expressão de um receptor funcional (BCR). As células que conseguem atravessar esta fase entram na periferia como células B de transição (Cambier *et al.*, 2007).

A capacidade do sistema imunológico adaptativo em proteger contra patógenos requer um vasto repertório de BCR capaz de reconhecer uma ampla gama de proteínas estranhas. Essa diversidade é gerada no início do desenvolvimento pelo rearranjo aleatório dos genes das imunoglobulinas resultando, inevitavelmente, na gênese de receptores capazes de reconhecer antígenos próprios. Estima-se que 75% das células B imaturas são auto-reativas. Cerca de um terço dessas células imaturas são removidas do repertório pela edição do receptor, onde um novo rearranjo dos genes da imunoglobulina gera uma nova cadeia leve para parear com a cadeia pesada já existente, num esforço para gerar célula não auto-reativas. Na falta deste mecanismo, as células são eliminadas por apoptose. Apesar desses mecanismos de tolerância central, muitas células B auto-reativas escapam para a periferia, onde são silenciadas por um estado induzido de não responsividade conhecido como anergia (Cambier *et al.*, 2007).

As células B promovem um elo importante entre a imunidade inata e adaptativa. Estas são efetoras da resposta imunológica adaptativa devido a sua capacidade de gerar respostas antígeno-anticorpo específicas, além de agirem como célula de memória (Frasca, Riley & Blomberg, 2005).

2.1. MEMÓRIA IMUNOLÓGICA

A memória imunológica consiste na vigilância e no reconhecimento do patógeno invasor pelo sistema imunológico a fim de realizar uma resposta secundária efetiva, sendo um dos fundamentos da prática da vacinação. As células responsáveis por esse aumento na proteção são linfócitos T e B que já tiveram um contato prévio com o antígeno e que podem persistir por longos períodos e serem rapidamente reativados logo após um segundo encontro. As células de memória se desenvolvem em resposta tanto aos antígenos específicos quanto aos sinais não específicos recebidos durante a resposta primária, e são caracterizadas pelo seu potencial de intensificar uma segunda resposta aos antígenos, muito tempo depois da primeira exposição (Ahmed & Gray, 1996; Banatvala *et al.*, 2001; Bernasconi, Traggiai & Lanzavecchia, 2002; Zinkernagel, 2002; Campos & Godson, 2003).

2.1.1. LIMITAÇÕES DA MEMÓRIA IMUNOLÓGICA

Nos últimos dois séculos, a vacinação tem cada vez mais sido utilizada como uma alternativa efetiva a infecção na produção de células de memória. Entretanto, se a vacinação induz memória imunológica a longo prazo, porque algumas vacinas não são capazes de induzir uma proteção duradoura contra às doenças? (Campos & Godson, 2003).

A fim de elucidar essa questão pode-se, primeiro, avaliar a capacidade da vacina de produzir memória imunológica adequada, tanto em termos de quantidade quanto em termos de qualidade da resposta. Por exemplo, devido ao número de células T de memória ser determinada primariamente pela extensão da expansão clonal, é essencial que uma vacina possa promover uma população de células T tão grande quanto for possível. (Kaech & Ahmed, 2001; Kaech, Wherry & Ahmed, 2002). Nesse aspecto, a dose do antígeno é um importante fator, bem como sua persistência no organismo, estrutura e distribuição pelos tecidos (Banatvala, Van Damme & Oehen, 2001). Além disso, a liberação de citocinas apropriadas pode ser utilizada para aumentar o número de células de memória (Cheng & Greenberg, 2002).

A eficácia da resposta imunológica de memória, induzida pela vacinação, é tão importante quanto a sua magnitude. É extremamente importante definir a correlação de proteção em cada doença e projetar vacinas que sejam capazes de induzir essas respostas. Por exemplo, vacinas que induzem IgG sistêmica são menos eficazes contra infecções por rotavírus do que vacinas que induzem IgA de mucosa (Yuan *et al.*, 1998). À medida que melhor compreendermos os mecanismos de desenvolvimento de memória imunológica e sua persistência, será possível projetar vacinas que seletivamente estimulem diferentes tipos de células de memória, como por exemplo, através do aumento na produção de células T de memória efectoras *versus* centrais (Esser *et al.*, 2003).

2.1.1.1. MEMÓRIA IMUNOLÓGICA E VACINAÇÃO

A vacinação é o meio mais eficaz de prevenir doenças infecciosas. Apesar do sucesso de muitas vacinas, ainda são necessárias muitas pesquisas para compreender os mecanismos imunológicos que mediam sua eficácia. Essas são informações fundamentais na elaboração de futuras vacinas contra as velhas e novas doenças infecciosas (Puledran & Ahmed, 2006).

A geração de memória imunológica antígeno-específica que pode ser reestimulada em um encontro posterior com o mesmo antígeno é uma das etapas da imunidade adaptativa. As vacinas são geralmente concebidas para induzir memória imunológica, que é desencadeada durante uma nova infecção, resultando em uma rápida ativação da resposta imunológica que protege o hospedeiro. Assim, a eficácia da memória imunológica induzida, ao invés da magnitude da resposta imune primária, é de extrema importância para o projeto de vacinas efetivas (Scheerlinck & Yen, 2010).

Há um grande interesse com relação à de células B e T na imunidade protetora (Ahmed & Gray, 1996; Salusto, Lanzavecchia, Araki & Ahmed, 2010). Ao examinar essa questão, é preciso notar que anticorpos e células T evoluíram para desempenhar funções distintas. Os anticorpos têm a função de atuar diretamente sobre o microrganismo como exemplo, partículas virais, bactérias extracelulares e parasitas enquanto as células T agem sobre células infectadas. Pelo fato das células T serem capazes de reconhecer antígenos microbianos somente em associação às moléculas de MHC do hospedeiro, as partículas livres de vírus ou bactérias extracelulares são invisíveis para estas células. Assim sendo, os anticorpos proporcionam nossas únicas defesas específicas contra microrganismos livres, por isso sua participação na imunidade protetora contra as doenças infecciosas não pode ser subestimada. Na verdade, os anticorpos são, provavelmente, o único mecanismo de imunidade protetora contra bactérias e parasitas exclusivamente extracelulares. Nestas situações, é fácil determinar a correlação da eficácia da vacina com base nos níveis de anticorpos séricos contra patógenos ou toxinas (Siegrist, 2008).

Entretanto, essa questão começa a mudar em relação a patógenos que possam sobreviver ou se reproduzir intracelularmente. Embora o anticorpo promova a primeira linha de defesa contra essas infecções, e seus níveis sejam utilizados para correlacionar a eficácia da vacina (Siegrist, 2008), há muitas situações em que nem todo o antígeno é neutralizado ou opsonizado pelo anticorpo preexistente. É então que as células T atuam para destruir a célula infectada e/ou liberar citocinas que inibem o crescimento do microrganismo ou prejudicam sua capacidade de sobreviver dentro da célula (Levin, 2008).

2.1.2. IMUNIDADE ÀS BACTÉRIAS

As bactérias são os microrganismos que mais frequentemente causam infecções no homem. Tanto as barreiras naturais contra os agentes infectantes, como a imunidade inata e a adaptativa participam do mecanismo de defesa contra as bactérias. As infecções causadas por bactérias extracelulares são as mais frequentes. Nesses casos os mecanismos de defesa estão relacionados principalmente com as barreiras naturais do hospedeiro, a resposta imune inata e a produção de anticorpos (Machado *et al.*, 2004).

A importância das barreiras naturais no combate às infecções bacterianas extracelulares é bem reconhecida. A integridade da pele e das mucosas impede a aderência e a penetração de bactérias; o movimento muco-ciliar elimina bactérias do trato respiratório; o pH ácido do estômago destrói bactérias que penetram pelo trato digestivo alto; e na saliva e secreções prostáticas existem substâncias com atividade antimicrobiana (Machado *et al.*, 2004).

A participação da imunidade inata ocorre através das células fagocitárias, da ativação do sistema complemento pela via alternativa e da produção de quimiocinas e citocinas. Adicionalmente a proteína C reativa (PCR), proteína de fase aguda produzida principalmente por células hepáticas nas infecções bacterianas, exerce ação variada contra as bactérias. Ao ligar-se aos fosfolipídios de membrana de algumas bactérias (por exemplo, pneumococos) a PCR atua como opsonina, facilitando a fagocitose por neutrófilos. A PCR tem também a capacidade de ativar o sistema complemento e também estimula a síntese de TNF- α , a qual induz a síntese de NO e conseqüentemente a destruição de vários microorganismos (Machado *et al.*, 2004).

O complemento exerce seu papel de defesa pela ativação do complexo de ataque à membrana (C5-C9) e facilitando a opsonização através do componente C3b, que se liga à bactéria e interage em uma segunda etapa com um receptor específico existente nas células fagocíticas. As deficiências do sistema complemento têm sido associadas com infecções graves por *Neisseria meningitidis* e infecções disseminadas por *Neisseria gonorrhoeae* (Barrington *et al.*, 2001).

Todas as células da imunidade inata participam da defesa contra bactérias, embora seja enfatizado principalmente o papel de neutrófilos e monócitos/macrófagos pela capacidade fagocítica dessas células. Os basófilos e mastócitos ativados por fatores do sistema complemento, a exemplo do C5a, C3a e C4a, liberam mediadores que, juntamente com as referidas proteínas do

complemento, atraem leucócitos para o sítio de agressão e contribuem para a passagem dessas células dos vasos para os tecidos, local onde está ocorrendo a agressão ao hospedeiro. Os eosinófilos, além da atividade fagocítica, podem destruir microorganismos por meio da liberação de proteínas com atividade microbicida, tais como a proteína básica principal e a proteína catiônica eosinofílica. Os neutrófilos e os macrófagos têm participação importante na defesa contra esses agentes desde que as bactérias sejam susceptíveis a substâncias produzidas por essas células, a exemplo do NO e do peróxido de hidrogênio. Existem também no interior dessas células, enzimas como a mieloperoxidase e substâncias outras como a azurocidina, que possuem propriedade microbicida. Embora tanto os neutrófilos como os macrófagos sejam células fagocíticas, essas células possuem características bem diferentes. Enquanto os neutrófilos têm vida curta tanto no sangue como nos tecidos, os macrófagos têm sobrevivência prolongada. Os neutrófilos só são encontrados nos tecidos inflamados, enquanto os macrófagos concentram-se tanto em tecidos inflamados como em tecido sadio. Durante a reação inflamatória os neutrófilos produzem secreção purulenta, enquanto os macrófagos formam o granuloma. Os neutrófilos defendem principalmente contra as bactérias extracelulares, enquanto os macrófagos são fundamentais para a eliminação dos agentes intracelulares que albergam (Machado *et al.*, 2004).

As células da resposta imune são também as principais fontes de citocinas e quimiocinas no início das infecções, as quais exercem sua ação tanto na fase inata como na adaptativa. As quimiocinas, devido a seu papel de atrair células para o sítio da lesão, são muito importantes no processo de defesa do hospedeiro (Dong, McDermott & Abdi, 2003).

Entre as várias citocinas que participam da defesa contra bactérias, tem sido dado destaque às citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 e IL-6. Essas citocinas são produzidas nas fases iniciais da infecção e são responsáveis, por meio de sua ação no hipotálamo, pelo aparecimento da febre que inibe a multiplicação bacteriana. Elas aumentam a expressão das moléculas de adesão (seletina P e ICAM), facilitando a passagem de células de vaso para o sítio da infecção, e também estimulam os neutrófilos e macrófagos a produzirem NO e a destruírem bactérias. Outras citocinas produzidas nas fases iniciais da infecção interferem na resposta imune adaptativa. A IL-12, produzida por macrófagos, tem papel importante na diferenciação de células Th0 para Th1 (Manetti *et al.*, 1993; Machado *et al.*, 2004), enquanto a IL-4, produzida por basófilos, mastócitos e macrófagos, estimula

a diferenciação de células Th0 para Th2, que vão colaborar com o linfócito B na produção de anticorpos, mais especificamente, da IgE (Bacharier & Geha, 2000).

A imunidade adaptativa, principalmente mediante os anticorpos, desempenha importante papel na defesa contra as bactérias extracelulares. Os anticorpos podem exercer suas ações de três maneiras: 1) opsonização, 2) ativando o sistema complemento, 3) promovendo a neutralização de bactérias ou de seus produtos (Machado *et al.*, 2004).

Como as bactérias extracelulares são susceptíveis à destruição quando fagocitadas, elas desenvolvem, como mecanismo de escape, substâncias que possuem atividade antifagocítica. Anticorpos dirigidos contra essas substâncias não só impedem sua ação, mas facilitam a fagocitose, desde que neutrófilos e macrófagos possuam receptor para a porção FC da imunoglobulina (opsonização). Os anticorpos também são coadjuvantes na destruição de bactérias por complemento, ativando esse sistema pela via clássica. Por meio do mecanismo de neutralização, os anticorpos, principalmente a IgA, podem ligar-se a bactérias e, com isso, impedir que as mesmas se fixem nas mucosas, como no trato intestinal e no trato respiratório. Os anticorpos, em muitas ocasiões, ligam-se a toxinas produzidas por bactérias, como as toxinas tetânica e diftérica, neutralizando a ação desses produtos (Machado *et al.*, 2004).

A despeito da importância defensiva da resposta imune, a dificuldade em controlar a resposta inflamatória que se desenvolve pode provocar danos nos próprios tecidos, muitas vezes limitados e sem maiores consequências para o hospedeiro. Porém, eventualmente, infecções causadas por bactérias Gram negativas podem resultar em septicemia e choque séptico, situação extremamente grave e associada com alta taxa de mortalidade. O choque séptico é desencadeado por lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede bacteriana estimulando nos neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e músculos uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) e NO. Como consequência, há diminuição do tônus muscular e do débito cardíaco, que resulta em hipotensão e má perfusão tecidual, e finalmente morte celular. No entanto, a modulação dessa resposta exacerbada pode ser obtida. Assim, em modelo experimental a administração concomitante de IL-10 e LPS protege camundongos da morte por choque séptico, ao inibir a produção de IL-12 e síntese de IFN- γ e TNF- α (Caille *et al.*, 2004).

2.1.2.1. RESPOSTA IMUNOLÓGICA A *Bordetella pertussis*

A imunidade adquirida contra *Bordetella pertussis* se desenvolve após a infecção natural e confere uma proteção relativamente de longa duração contra infecções subsequentes (Mills, 2001). A imunização com a vacina de célula inteira também protege contra a doença (Mills, 2001; Church, 1979; PHLS Epidemiological Research Laboratory and 21 area health authorities, 1982; Simondon *et al.*, 1997). No entanto, a reatogenicidade da vacina e sua associação com leve a graves complicações neurológicas (Mills, 2001; Cherry *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1981) tem sido a principal motivação para o desenvolvimento de gerações de vacinas acelulares contra essa doença, constituídas por componentes altamente purificados da bactéria (Mills, 2001).

Esta bactéria produz uma gama de toxinas, incluindo a toxina pertussis, citotoxina traqueal, toxina adenilato ciclase, a toxina termolábil, e endotoxinas ou lipopolissacarídeo (LPS), as quais são conhecidas por contribuir com a patogênese e muitas das quais estão envolvidas na proteção imunológica ou subversão imune. *Bordetella pertussis* também produz uma série de outros fatores de virulência, incluindo a hemaglutinina filamentosa, pertactina e fímbrias, que auxiliam na sobrevivência da bactéria no trato respiratório mediando a adesão às células epiteliais ciliadas, macrófagos e neutrófilos. Além disso, após a invasão do trato respiratório, a bactéria não só se liga a células epiteliais e se multiplica extracelularmente, mas também pode ser ingerida e sobrevive dentro dos macrófagos e outros tipos celulares (Bromberg, Tannis & Steiner, 1991; Saukkonen *et al.*, 1991; Steed, Akporiaye & Friedman, 1992; Mills, 2001), fornecendo uma evidência indireta do papel da imunidade mediada por células, bem como do papel da imunidade humoral na proteção do organismo (Mills, 2001).

Tem sido relatado que a infecção natural ou a imunização com vacinas podem induzir respostas de anticorpos e células T contra a toxina pertussis, citotoxina traqueal, toxina adenilato ciclase, a toxina termolábil, endotoxinas ou lipopolissacarídeo e uma série de outros antígenos. No entanto isto não é, em si, uma prova de que estas respostas imunes contribuem para a proteção. Em contrapartida, experimentos manipulados em modelos animais forneceram provas convincentes de que a resposta imune contra uma ampla gama de antígenos pode contribuir para a proteção contra *Bordetella pertussis* e que tanto a resposta imune

celular quanto a humoral são requeridas para que haja uma imunidade ideal. Estes estudos em camundongos têm demonstrado que a vacina de célula inteira confere imunidade por mecanismos semelhantes ao gerado pela infecção natural, mas sugerem que a vacina acelular e a de célula inteira conferem proteção por combinações distintas de mecanismos efetores do sistema imune (Redhead *et al.*, 1993; Leef *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 1998; Mahon *et al.*, 1997; Mills, 2001), uma hipótese que é apoiada por evidências indiretas de alguns estudos clínicos. Parece também que diferentes combinações de respostas geradas de diferentes maneiras, por exemplo, através de vacinas diferentes, podem proporcionar níveis semelhantes de imunidade, sugerindo certo grau de redundância nestas combinações dos mecanismos imunes protetores (Mills, 2001).

2.1.2.2. RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO TOXÓIDE TETÂNICO

O toxóide tetânico é um antígeno capaz de induzir uma resposta imune humoral forte e duradoura em humanos após a vacinação (Mayer *et al.*, 2002; Wellhörner, 1981). Após vacinação com o toxóide tetânico, a captação do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno leva a apresentação via moléculas de MHC (Mayer *et al.*, 2002; Demotz *et al.*, 1989; Kozbor *et al.*, 1989), seguida pela indução de expansão clonal de células T (Mayer *et al.*, 2002; Adams, Opremcak & Orosz, 1991; Geha *et al.*, 1973; Kabilan *et al.*, 1990). É descrito que as células T toxóide tetânico-específicas são, principalmente, TCD4⁺ secretoras de citocinas TH1 como o IFN- γ (Mayer *et al.*, 2002; Parronchi *et al.*, 1991).

A toxina tetânica é neurotrópica, ligando-se especificamente aos receptores dos terminais nervosos que contem gangliosídeos. É extremamente potente, sendo a dose humana letal estimada em 2,5 ng/kg. Migra para o sítio de ação no sistema nervoso por transporte axonal retrógrado dentro das células nervosas. Uma vez dentro dos neurônios, a toxina não pode ser neutralizada pela antitoxina tetânica. Ela então se acumula no sistema nervoso central, impedindo a liberação de neurotransmissores inibitórios, como a glicina e o ácido γ -aminobutírico, deixando os impulsos nervosos excitatórios sem bloqueio (Borrow, Balmer & Roper, 2006).

A toxina tetânica pode ser inativada com formaldeído para, assim, formar o toxóide tetânico. Ele tem sido utilizado como vacina monovalente (TT) para imunizar adultos, como componente da vacina combinada contra difteria, tétano e coqueluche

(DTP) ou na vacina difteria-tétano (DT) para imunização de crianças. A vacina combinada contra difteria e tétano para adultos (dT) contém a quantidade equivalente de toxóide tetânico e uma quantidade reduzida de toxóide diftérico em comparação com as vacinas DTP ou DT, e é recomendada para uso no lugar da vacina monovalente, a fim de aumentar a imunidade da população contra a difteria. O toxóide tetânico também pode ser administrado com um componente da combinação vacinal coqueluche (acelular), tétano e difteria (dTpa), principalmente focada no melhor controle da coqueluche, para adolescentes e adultos. O toxóide tetânico é adsorvido em sais de alumínio (hidróxido ou fosfato de alumínio) para aumentar sua antigenicidade. A potente imunogenicidade do toxóide tetânico levou à sua utilização como proteína carreadora em vacinas polissacarídicas conjugadas. Ele é estável, pode suportar a exposição à temperatura ambiente por meses (37°C por algumas semanas) sem perda significativa de potência (Borrow, Balmer & Roper, 2006; Dietz *et al.*, 1997; Galazka *et al.*, 1998).

O toxóide tetânico induz a formação de antitoxinas específicas. Estes anticorpos desempenham um papel importante na proteção contra o tétano. A imunidade ao tétano é mediada por anticorpos, com antitoxinas tetânicas (como antitoxinas diftéricas), pertencentes à classe das imunoglobulinas G (IgG), que são distribuídas por toda corrente sanguínea e espaços extravasculares. A antitoxina nos tecidos pode neutralizar a toxina produzida num ferimento infectado. Além disso, a antitoxina que passa para o feto através da placenta após imunização ativa da mãe pode prevenir o tétano neonatal (Borrow, Balmer & Roper, 2006).

A imunidade à toxina tetânica é induzida somente pela imunização. Curar-se de tétano não significa que o indivíduo está imune a novos episódios da doença. Uma pequena quantidade da toxina, embora suficiente para causar a doença, é insuficiente para estimular a produção de anticorpos. Por isso, mesmo pacientes diagnosticados com tétano devem ser imunizados com o toxóide tetânico, durante o momento do diagnóstico ou durante a convalescença. Alguns autores propuseram que a imunidade natural poderia ocorrer após colonização assintomática do trato intestinal (Dastur, Awatramani & Dixit, 1981; Matzkin & Regev, 1985; Tenbroeck & Bauer, 1923; Veronesi *et al.*, 1975; Veronesi *et al.*, 1983). Entretanto, estudos têm demonstrado que o fato de pessoas que se dizem não vacinadas possuírem anticorpos contra tétano não exclui a possibilidade de esta vacinação não ser declarada (MacLennan, 1981). Alguns estudos utilizaram técnicas *in vitro* e

encontraram níveis muito baixos de anticorpos contra tétano que poderiam ser produto de reação cruzada com outros antígenos (Dastur, Awatramani & Dixit, 1981; Ray *et al.*, 1978; Matzkin & Regev, 1985). Estudos realizados com crianças em idade escolar na África (Rey, 1981), recrutas militares indianos (Menon *et al.*, 1976), pessoas que cuidam de cavalos (Lahiri, 1939), mulheres grávidas em Nova Guiné (MacLennan *et al.*, 1965) e pessoas saudáveis em Burkina Faso (Breman *et al.*, 1981) demonstraram que populações de países com altos níveis de exposição a esporos de tétano geralmente não possuem antitoxinas tetânicas neutralizantes. Mesmo que haja infecção assintomática ou colonização, a imunidade natural não parece ter qualquer importância prática no controle do tétano (Borrow, Balmer & Roper, 2006).

2.1.2.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA A TOXINA DIFTÉRICA

A toxina diftérica, produzida pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae* (Cerdeno-Tarraga *et al.*, 2003; Gentile, 2010) é uma das mais extensivamente estudadas e bem conhecidas toxinas bacterianas. Desde sua descoberta, nos anos de 1800, esta tem ocupado um papel central no campo da toxinologia (Collier, 2001; Scheifele & Ochnio, 2009). É uma toxina do tipo AB constituída por dois polipeptídeos. O fragmento B é necessário para a ligação aos receptores de superfície e penetração nas células-alvo. O fragmento A é responsável pela sua toxicidade, e atua interferindo enzimaticamente na síntese de proteínas, causando morte celular. Muitos aspectos do modo de ação da toxina estão bem caracterizados em nível molecular e interpretados em termos de estrutura conhecida (Holmes, 2000; Collier, 2001; Scheifele & Ochnio, 2009). Ela exerce seus efeitos em tecidos em órgãos distantes, especialmente o coração (causando miocardite), e nos nervos periféricos e cranianos (causando fraqueza e progredindo para paralisia) (Scheifele & Ochnio, 2009).

Todas as cepas toxigênicas de *C. diphtheriae* produzem uma toxina idêntica. Para que uma cepa se torne toxigênica, esta deve estar infectada por um vírus bacteriano particular, ou bacteriófago, que contem o gene da toxina (*tox*). Esse processo é chamado conversão lisogênica. A introdução de uma cepa toxigênica de *C. diphtheriae* em uma comunidade pode iniciar um surto de difteria através do espalhamento clonal da bactéria ou pela transferência do bacteriófago a cepas não toxigênicas presentes no trato respiratório de portadores assintomáticos. Tanto as

cepas toxigênicas quanto as não toxigênicas podem ser isoladas durante um surto (Mortimer, 1998). A identificação do gene que codifica a toxina permitiu o desenvolvimento de métodos baseados em PCR rápidos e precisos para a identificação de cepas toxigênicas (Nakao & Popovic, 1997; Mothershed *et al.*, 2002). Em populações altamente imunizadas, as cepas toxigênicas virtualmente desapareceram, embora cepas não toxigênicas continuem a circular. A emergência de clones invasivos não toxigênicos de *C. diphtheriae* foi descrita, mas tais infecções continuam infrequentes (Reacher *et al.*, 2000; Romney *et al.*, 2006).

Quando tratada com formaldeído e calor, a toxina perde sua habilidade de se ligar às células e sua atividade enzimática fica prejudicada, apesar de conservar sua imunogenicidade. Este tratamento converte a toxina em toxóide, o que é comumente utilizado na imunização contra difteria. Os modernos métodos de fabricação garantem que o processo de conversão seja irreversível. Mutantes geneticamente alterados, não toxigênicos e completamente imunogênicos da toxina diftérica estão disponíveis, por exemplo, CRM197, e podem ser utilizados para imunização como uma potencial alternativa menos reatogênica à utilização do toxóide (Robbins *et al.*, 2005). CRM197 é utilizada como um carreador da proteína em várias vacinas polissacarídicas conjugadas atuais (Scheifele & Ochnio, 2009).

A imunidade contra difteria é mediada por anticorpos. Devido à letalidade da difteria ser quase inteiramente atribuída à toxina, a imunidade contra a doença depende principalmente de anticorpos contra ela. Este anticorpo, chamado antitoxina, é principalmente do tipo imunoglobulina G (IgG) e é medido em Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL) de soro. A antitoxina é distribuída através do organismo e pode atravessar a placenta, proporcionando imunidade passiva ao recém-nascido durante os primeiros meses de vida. A antitoxina diftérica pode ser induzida pela toxina produzida pela bactéria durante a infecção ou estado de portador, ou pela imunização com o toxóide diftérico. Os anticorpos gerados nestas situações são idênticos, não podendo ser distinguidos entre si por nenhuma técnica. A resposta imune ao toxóide mediada por células também ocorre e pode estar relacionada à manutenção da memória imunológica (Kniker *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 2002; Upham *et al.*, 2006).

A descoberta do toxóide e sua capacidade imunogênica, em 1923, promoveu meios seguros e efetivos para a vacinação em massa. O toxóide diftérico ainda é a

base de vacinas atuais contra difteria, o que permanece inalterado exceto pela maior pureza do toxóide e aumento da imunogenicidade com a adição do alumínio como adjuvante. Recentemente, mutantes da toxina diftérica inativados geneticamente tem sido cogitados para uso no lugar do toxóide tradicional (Robbins *et al.*, 2005), com o intuito de diminuir a quantidade de proteína requerida para vacinação bem como a reatogenicidade, o que se torna um problema com as repetidas imunizações. A disponibilidade da toxina mutante na mucosa mostra-se como um caminho promissor (Mills *et al.*, 2003; Rydell & Sjöholm, 2004; Rydell & Sjöholm, 2005), porém o licenciamento de uma vacina deste tipo em um futuro próximo ainda parece improvável (Scheifele & Ochnio, 2009).

Vacinas atuais contra difteria têm um desempenho satisfatório quando utilizadas em combinação a outros antígenos. O toxóide diftérico é mais comumente utilizado combinado ao toxóide tetânico e a vacina contra *Bordetella pertussis* acelular ou de célula inteira. Novas combinações também podem incluir a vacina inativada contra poliomielite (IPV), Hepatite B e/ou *Haemophilus influenzae* tipo b. Formulações específicas para adolescentes e adultos contém uma reduzida dose do antígeno a fim de minimizar reações no sítio da injeção (Halperin *et al.*, 2000).

Embora a vacinação seja muito eficaz na prevenção de mortes relacionadas à difteria, a sua eficácia global é estimada em torno de 70-90%. Surtos de difteria têm sido relatados entre comunidades com alto índice de vacinação (Krumina *et al.*, 2005; Oluabunwo *et al.*, 2005).

Vacinas contendo toxóide diftérico são geralmente bem toleradas, refletindo sua composição relativamente simples. Reações no local da injeção (eritema, inchaços) ocorrem com pouca frequência em crianças, mas aumentam em severidade e frequência com as doses de reforço no início da infância (Scheifele, Halperin & Ferguson 2001; Scheifele *et al.*, 2005). Reações locais geralmente desaparecem em poucos dias e não requerem tratamento. Reações febris transitórias podem ocorrer em crianças e adultos. A reatogenicidade das formulações, com alumínio adsorvido ou sem adjuvante, é comparável, mas as vacinas adsorvidas são preferidas devido a sua imunogenicidade superior. Formulações com doses reduzidas de toxóide diftérico são a escolha, para crianças mais velhas e adultos, pois causam menos efeitos adversos locais e sistêmicos (Scheifele *et al.*, 2005).

2.1.2.4. RESPOSTA IMUNOLÓGICA A *Haemophilus influenzae* tipo b

A imunidade adquirida contra bactérias encapsuladas, como *Haemophilus influenzae* tipo b, depende inteiramente de anticorpos. Vacinas contra esses agentes precisam induzir níveis protetores de anticorpos e, em muitos casos, fazê-lo por mais de um meio. O anticorpo pode ser produzido em resposta à dose original da vacina e ser continuamente produzido durante um período de tempo. Isto é chamado de “imunidade estéril”, ou seja, confere proteção total após a imunização, não sendo encontrados patógenos circulantes. Além de imunidade estéril, a vacinação também pode alertar o sistema imunológico para que ele se torne capaz de montar uma resposta baseada na memória imunológica para infecções subsequentes. Esta protege por permitir que o anticorpo seja produzido mais rapidamente e em maiores quantidades frente a uma nova infecção pelo mesmo patógeno. Para antígenos protéicos, a resposta de memória é implementada por um *pool* de expansão de células B atuando em conjunto com células T. Polissacarídeos não são reconhecidos por células T e, por si só, normalmente induzem uma resposta T-independente relativamente pobre. A fim de fazer esse trabalho, células T helper precisam reconhecer um peptídeo ligado a um antígeno reconhecido pela célula B. As duas estruturas não precisam ser partes da mesma molécula, mas precisam estar fisicamente ligados para que isso ocorra (Lanzavecchia, 1986; Mitchison, 1992; McVernon, Mitchison & Moxon, 2004).

Na resposta protetora natural contra bactérias encapsuladas, as células T que reconhecem as proteínas bacterianas presumivelmente ajudam as células B que reconhecem o polissacarídeo capsular. As vacinas conjugadas foram introduzidas com o propósito de reforçar a fraca resposta imunológica gerada pelos carboidratos capsulares somente. A vacina Hib é um exemplo típico, pois consiste no polissacarídeo capsular poliribosil-ribitol fosfato (PRP) conjugado ao toxóide tetânico ou diftérico. Este é um excelente meio de recrutar células T para auxiliar na geração de uma resposta primária, que é mais aceitável do que a vacinação com microrganismos mortos ou atenuados. O conjugado, por si só, pode suscitar uma resposta secundária forte caracterizada por uma produção relativamente rápida de anticorpos de alta avidéz (Zepp et al., 1997; Goldblatt *et al.*, 1999; McVernon, Mitchison & Moxon, 2004). Entretanto, não se pode esperar que conjugados induzam células T que reconheçam peptídeos espcíficos pertencentes à bactéria Hib e isso, acredita-se, pode ser parte significativa do problema referente ao

aumento de infecções causadas por *Haemophilus influenzae* tipo B (McVernon, Mitchison & Moxon, 2004).

2.1.2.5. RESPOSTA IMUNOLÓGICA A *Neisseria meningitidis*

Após a exposição à *Neisseria meningitidis*, a possibilidade de adquirir a doença meningocócica invasiva depende da virulência do microrganismo e de fatores do hospedeiro, que podem afetar a susceptibilidade ao patógeno e a presença ou ausência de anticorpos no soro (Granoff, Welsch & Ram, 2009).

O sistema complemento tem um papel significativo na defesa contra a infecção meningocócica, indicado pelo aumento da susceptibilidade de pacientes com deficiências nesse sistema (Figuroa, Andreoni & Densen, 1993). A proteína plasmática C3 é o componente convergente das três vias: clássica, lectina ligadora de manose e alternativa. A clivagem de C3 em C3b, a principal molécula efetora do sistema complemento, marca o início das atividades bactericida, lise e opsonofagocitose (Kugelberg, Gollan & Tang, 2008). A deficiência de C3, apesar de incomum, está associada ao aumento da susceptibilidade a doença meningocócica aumentando, assim, o risco de ocorrer a doença invasiva, bem como de infecções piogênicas causadas por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (Botto *et al.*, 1992; Peleg *et al.*, 1992; Garty, Nitzan & Danon, 1993).

Os anticorpos bactericidas fixadores de complemento correspondem à principal defesa contra os grupos A e C (Goldschneider, Gotschlich & Artenstein, 1969). Porém, estudos pré-clínicos em animais e teste de vacinas em humanos têm indicado que tais anticorpos subestimam o nível de proteção proporcionado pela resposta imune ao meningococo e sugere que outros mecanismos da resposta imunológica são também importantes (Perkins *et al.*, 1998; Vermont & Van den Dobbelen, 2002). O polissacarídeo B é pobremente imunogênico e falha na produção de anticorpos bactericidas (Quakyi *et al.*, 1997).

Segundo Pollard e colaboradores (ANO), existe uma resposta ineficiente com relação a anticorpos bactericidas em crianças na primeira fase da infância à infecção com *Neisseria meningitidis*. A razão para este fato pode ser devido a existência de três variantes alélicas da lectina ligadora de manose, as quais estão associadas com o aumento da susceptibilidade, particularmente na doença, à doença meningocócica (Hibberd *et al.*, 1999; Faber *et al.*, 2007).

Outra diferença entre a resposta imunológica de adultos e crianças é com relação às células T. Precusores da célula T específicos ao antígeno estão em menores níveis em recém-nascidos do que em adultos. Os níveis de citocinas, tais como IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-10, também são influenciados pela idade, e a resposta a antígenos já conhecidos também é influenciada. A produção de tais citocinas aumenta durante os primeiros meses de vida chegando aos níveis dos indivíduos de idade mais elevada por volta dos 2 a 5 anos de idade (Sánchez *et al.*, 2002).

Alguns tipos de populações de células T regulatórias (Treg) CD4⁺ geradas periféricamente podem influenciar a resposta imune na colonização microbiana, incluindo Th3 secretando TGF- β e CD4⁺CD25⁺ dependente de contato (Sakaguchi *et al.*, 1995; Weiner, 2001).

Jessouroun e colaboradores (2004) observaram o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em modelos murinos assemelhando-se a forma da doença infecciosa em humanos, onde as concentrações no soro de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e KC (IL-8 em humanos) aumentaram como no desenvolvimento do choque séptico. Ao contrário, nos animais imunizados foi observada uma redução drástica de tais citocinas. Tem sido previamente demonstrado que a neutralização de TNF- α diminui a produção de IL-6, KC e IL-10, sugerindo que o TNF- α tem um papel importante na produção de citocinas.

O TNF- α junto com o IL-1 tem sido considerado o principal mediador endógeno da sepse, aumentando a capacidade citotóxica e induzindo a liberação de outras citocinas pro-inflamatórias (Prins *et al.*, 1998).

3. VACINAS PROPOSTAS PARA COMBINAÇÃO

3.1. VACINAS MENINGOCÓCICAS B E C CONJUGADA

No início da década de 1990 Bio-Manguinhos, de acordo com o quadro epidemiológico brasileiro, iniciou o desenvolvimento de vacinas contra doenças meningocócicas, as quais têm como principal agente etiológico a *Neisseria meningitidis* grupos B e C.

Neisseria meningitidis é um diplococo gram-negativo de aspecto reniforme, imóvel, e seu tamanho varia entre 0,6-1,5 μm . Apresenta cápsula polissacarídica e fímbrias (Pollard e Frasch, 2001). A bactéria apresenta 13 diferentes grupos (A, B, C, E-29, H, I, K, L, M, W135, X, Y e Z) e esta classificação varia de acordo com a constituição polissacarídica de sua cápsula, configurando diferenças imunológicas entre os grupos. A doença pode se apresentar como meningite com ou sem meningococcemia, sendo a última a forma mais grave (Pollard e Frasch, 2001; Sáfadi, 2006).

Os polissacarídeos meningocócicos foram os componentes das primeiras vacinas bacterianas quimicamente definidas. Estas vacinas se mostraram imunogênicas em adultos e crianças acima de 2 anos de idade e foram objeto de vários ensaios clínicos em países da Europa, Américas e África (Frasch, 1995; Sáfadi, 2006). Estas moléculas, como todos os polissacarídeos, induzem uma resposta T-independente e a capacidade de respostas a estas moléculas depende da maturidade imunológica relacionada à idade. São antígenos que não induzem memória imunológica. Como a doença meningocócica tem prevalência em crianças de faixa etária inferior a dois anos, a utilização de antígenos T-independentes como vacinas não induz proteção duradoura (Pollard e Frasch, 2001). Apesar de estar largamente comprovada a eficácia destas vacinas no controle de surtos e epidemias em adultos, novas abordagens tem sido propostas para modificação destas moléculas na busca de mudanças na natureza da resposta imune por elas induzida.

Enquanto as vacinas polissacarídicas contra os grupos A, C, Y e W135 se mostram parcialmente eficazes, o mesmo não acontece para o polissacarídeo grupo B. Este não é imunogênico por apresentar uma identidade química (composta por ácido α -2-8-N-acetilneuroamínico) semelhante a antígenos de superfície de células neurais humanas (Sáfadi, 2006). A tentativa de aumentar a imunogenicidade poderia levar a indução de autoanticorpos que apresentariam reação cruzada com antígenos glicosilados do hospedeiro, principalmente com o tecido cerebral fetal (Pollard e Frasch, 2001; Segal e Pollard, 2005). Vacinas alternativas têm sido propostas contra o grupo B, utilizando vesículas da membrana externa da bactéria, de acordo com observações de que anticorpos bactericidas protetores são induzidos preferencialmente contra antígenos não capsulares.

Várias pesquisas tem sido realizadas sobre vesículas de membrana externa (VME) e lipooligossacarídeo detoxificado (dLOS) como imunógenos alternativos.

Estas vacinas têm mostrado segurança aceitável e são capazes de induzir anticorpos funcionais (Jessouroun *et al.*, 2004).

A vacina meningocócica B, que consiste na associação de VMEs e dLOS, foi elaborada a partir das duas cepas mais prevalentes no Brasil (N44/89 e N603/95). Nos estudos pré-clínicos realizados em camundongos suíços hiperferrêmicos, onde foram comparados os grupos imunizados pela vacina brasileira e pela vacina de referência cubana (VA-MEMGOC-BC), observou-se um aumento significativo na razão de sobrevivência quando comparadas ao grupo de camundongos não imunizados, apresentando uma eficiência similar na eliminação da bactéria. A vacina brasileira completa induziu uma proteção cruzada superior à vacina de referência, a qual tem o polissacarídeo C como um dos componentes vacinais, apresentando altos títulos bactericidas contra a cepa heteróloga C (Jessouroun *et al.*, 2004).

A vacina cubana utilizada como referência (VA-MENGOC-BC) é preparada a partir de proteínas purificadas da membrana externa do meningococo grupo B, enriquecidas com proteínas de alto peso molecular e polissacarídeo capsular do meningococo grupo C. Os antígenos formulados são adsorvidos em gel de hidróxido de alumínio. A preparação é fornecida para o uso imediato depois de agitada suavemente e homogeneizada dentro do seu frasco. Cada 0,5 mL contém: 50 mg de proteínas B purificadas; 50 mg de polissacarídeo purificado; 2 mg de gel de hidróxido de alumínio; Timerosal (como preservativo) a 0,01%. O esquema de vacinação consiste em duas doses de 0,5 mL cada, separadas por um intervalo ótimo de 6 a 8 semanas. A segunda dose é imprescindível para atingir a proteção. Este esquema é válido a partir dos três meses de idade (Sierra *et al.*, 1991).

Acredita-se que o diferente perfil das proteínas VME usadas na vacina brasileira pode ter induzido diferentes respostas de anticorpos bactericidas, apesar da cepa de maior prevalência brasileira e cubana ser a mesma (N44-89). Sugere-se, então, que a combinação VME+dLOS pode ter também aumentado a especificidade da resposta imunológica (Jessouroun *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, novos conhecimentos no campo da imunologia e da tecnologia de produção de vacinas levaram ao desenvolvimento de vacinas conjugadas (Bruge, 2004). A conjugação química de polissacarídeos bacterianos a proteínas carreadoras tem contribuído para o aumento da resposta imunológica contra polissacarídeos capsulares e na prevenção de doenças causadas por bactérias como a *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*. Na vacina meningocócica C conjugada (MenCPS-TT), o toxóide tetânico ativado pela hidrazida

foi utilizado como carreador. A imunogenicidade da vacina conjugada brasileira foi avaliada pela detecção de anticorpos, incluindo o índice de avidéz e a atividade bactericida. Os animais imunizados apresentaram um aumento significativo nos títulos de anticorpos após a terceira dose quando comparado ao período pré-imunização, que pode ser observado através de ELISA e pelo método de análise de anticorpos bactericidas (Silveira, 2007).

3.1.1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS VACINAS MENINGOCÓCICAS B E C CONJUGADA DESENVOLVIDAS EM BIO-MANGUINHOS

3.1.1.1. VACINA MENINGOCÓCICA B

O processo de produção da vacina meningocócica B foi iniciado com cultivo em bioreator de 100L (B Braun Model Biostat UD 100) em meio Catlin acrescido com 20 μM de Fe^{+3} e 42 μM de ácido etilenodiamino-di-O-hidroxido fenil acético (EDDHA). A bactéria foi inativada à 56°C por 30 minutos e concentrada por microfiltração tangencial em membrana de 0,2 μM (SUPOR[®] - Pall Corporation). As vesículas de membrana externa (VME) foram extraídas com deoxicolato de sódio (DOC) a partir das duas cepas meningocócicas prevalentes no Brasil: N44/89 (B:4,7:P1.19,15: P5.5,7: L1,3,7,8) e N603/95 (B:4:P1,7,1: P5.5,7: L,3,7). As VME, sem LOS, foram obtidas a partir de tratamento ultrasônico, utilizando 2% de DOC e purificadas por ultracentrifugação em colchão de sacarose à 60%.

Outro constituinte da vacina, além das cepas prevalentes de *Neisseria meningitidis* grupo B, é o LOS detoxificado da cepa N44-89. O LOS foi obtido da biomassa de N44/89 após tratamento com Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônio) e isolado por extração utilizando 40 mM de Tris-HCl, pH 8.5, contendo 1% de DOC e 4 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O LOS extraído foi ainda purificado em Sephacryl HR S-300 e submetido à detoxificação (dLOS) com NaOH 0,25 N em banho-maria a 60°C por 60 minutos. Essa vacina experimental foi produzida de acordo com controles de qualidade de processo, observando as boas práticas de fabricação em uma planta-piloto de produção. Os testes de controle de qualidade do produto final foram realizados pelo departamento de controle de qualidade de Bio-Manguinhos.

3.1.1.2. VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA

O polissacarídeo nativo de meningococo grupo C (MenCPS) foi produzido em Bio-Manguinhos, a partir de massa bacteriana de *Neisseria meningitidis* cepa 2135 cultivada em meio Frantz (Frantz, 1942) e purificada como descrito previamente. O conteúdo de ácido siálico do MenCPS foi medido pelo método do resorcinol. A identidade, estrutura e pureza do MenCPS foi medida por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (espectroscopia uni-dimensional) (RMN¹H 1D) a 500 MHz a 37°C utilizando Bruker Avance/500. Amostras secas (10 mg) foram dissolvidas em água deuterada (D₂O 99.96% D, Cambridge Isotope Laboratories Inc). O toxóide tetânico (TT) foi fornecido pelo Instituto Butantan. Foi produzido e purificado de acordo com as especificações para a vacina DTP. A pureza antigênica do TT utilizado é de 1892 Lf/mg, que é apropriado para ser utilizado em processos de conjugação. O conteúdo protéico foi avaliado pelo método de Bradford (Silveira *et al.*, 2007).

Diferentes lotes do MenCPS nativo (10 mg/mL) em água foram tratados com periodato de sódio (23,4 mM) por uma noite a 4°C protegido da luz para a regeneração de grupos aldeído. A reação foi interrompida pela adição de glicerol. O polissacarídeo ativado foi purificado por diafiltração contra água e concentrado por ultrafiltração tangencial (Centramate System, Pall BioPharmaceuticals). A identidade e presença de grupos aldeídos nos polissacarídeos foi avaliada por espectroscopia RMN¹H 1D utilizando as mesmas condições descritas anteriormente. O conteúdo de grupos aldeído no MenCPS ativado foi quantificado por um ensaio com formaldeído utilizando o reagente Purpald (Silveira *et al.*, 2007).

O toxóide tetânico (3,5 mg/mL) foi ativado pela introdução de grupos hidrazida pela metodologia da carbodiimida (EDAC) após tratamento com cloridrato de hidrazina (3,07 M) em excesso (50 vezes superior), à temperatura ambiente e sobre condições ácidas (pH 6.1). O toxóide tetânico ativado pela hidrazida (TTH) foi purificado por diafiltração contra PBS 0.02 M pH 7.4 e concentrado por ultrafiltração tangencial (Centramate System, Pall BioPharmaceuticals) (Silveira *et al.*, 2007).

O MenCPS ativado (50 mg/mL) foi covalentemente ligado ao TTH (60mg/mL) na presença de cianoboroidreto de sódio 1M (1M;10 mL) por toda a noite (método derivado de. A reação foi parada pela adição de ADH 0.5M para bloquear grupos aldeídos que não reagiram. A conjugação foi analisada por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) utilizando uma coluna TSK-G 4,000 PWxl (com

detecção ultravioleta a 280 nm e 206 nm), e também pela espectroscopia RMN¹H 1D utilizando as mesmas condições descritas anteriormente. As misturas foram diafiltradas contra PBS 0.02M pH 7.4 para remover o polissacarídeo não conjugado e concentrado por ultrafiltração tangencial (Centramate System, Pall BioPharmaceuticals). O açúcar total e o conteúdo de proteínas nos produtos intermediários e no conjugado final foram determinados pelos métodos do resorcinol e Bradford, respectivamente. A quantidade de polissacarídeo foi quantificada por HPAEC-PAD após precipitação com DOC de acordo com Lei e colaboradores (Lei *et al.*, 2000). Os ensaios de controle de qualidade requeridos pela OMS para vacinas meningocócicas C conjugadas foram realizados (Silveira *et al.*, 2007).

3.2. VACINA DTP-Hib (*Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis* e *Haemophilus influenzae* tipo b)

A vacina DTPw é composta pela combinação dos toxóides diftérico e tetânico e pela *Bordetella pertussis* inativada, tendo como adjuvante o hidróxido de alumínio. Esta vacina se apresenta sob a forma líquida em ampola, em frasco-ampola com dose única ou frasco-ampola com múltiplas doses (Bio-Manguinhos, 2007).

O *Corynebacterium diphtheriae* é um bacilo aeróbio gram-positivo pleomórfico, não móvel, com quatro biotipos (gravis, mitis, intermedius e belfanti), que pode ou não produzir exotoxina mediada pela presença de um bacteriófago. A toxina é codificada por genes (*tox*) que fazem parte do genoma de certos bacteriófagos e que são capazes de lisogenizar os bacilos diftéricos. A perda do bacteriófago, que contém o gene *tox*, torna-a incapaz de produzir a exotoxina, enquanto outras podem variar na sua capacidade de produção de exotoxinas e outros fagos. A toxina é uma proteína termolábil, letal em concentrações de 0,1 µg/Kg de peso e sua produção é inibida na presença de fatores ambientais como o ferro, o que explica a maior produção da toxina bacteriana, na fase de declínio, quando a concentração de ferro intracelular cai a níveis muito baixos. Somente as cepas toxigênicas causam a doença (Sacchi *et al.*, 1985; Arístegui *et al.*, 2005).

O *Clostridium tetani* é um bacilo gram-positivo anaeróbio e tem a particularidade de produzir esporos terminais que são resistentes a condições ambientais muito adversas. Estes esporos são ubiqüitários, encontrando-se em maior quantidade nos solos e no intestino de animais e de humanos. É a única doença prevenível por

vacina que é infecciosa, mas não contagiosa (National Immunization Program Centers for Disease Control and Prevention, 2004; Silva *et al.*, 2005).

Esta bactéria encontra ambiente favorável ao seu crescimento em tecidos animais com condições particulares de anaerobiose, como acontece, por exemplo, com os tecidos necróticos das feridas; aí produz dois tipos de endotoxinas, a tetanolisina e a tetanospasmina. A tetanolisina é o princípio hemolítico e a tetanospasmina, o neurotóxico. Estas toxinas interferem com a liberação de neurotransmissores, bloqueando os estímulos inibidores que regulam a contração e o tônus muscular, conduzindo a contração muscular e também a espasmos. Por vezes podem surgir convulsões e pode ainda estar envolvido o sistema nervoso autônomo (Silva *et al.*, 2005).

Bordetella pertussis, agente causador da coqueluche, é um pequeno coco-bacilo gram-negativo, não esporulado, imóvel e aeróbio, sendo a forma patogênica provida de cápsula (Pereira, 2005). Foi descrito pela primeira vez em 1578, mas a *B. pertussis* só foi isolada em 1907 pelos franceses Jules Bordet e Octave Gengou. Uma das características mais importantes deste agente é o seu tropismo pelas células do epitélio respiratório ciliado, nas quais se adere fortemente, provocando lesão tecidual e escape do sistema imunológico pela sua capacidade de entrar e sobreviver nos macrófagos (Weiss, 1997; Pereira, 2005).

É capaz de produzir uma série de fatores de virulência que incluem, entre outros, fímbrias, hemaglutininas, pertactina, a toxina dermonecrótica e a toxina pertussis, uma toxina AB, com a porção B específica para receptores existentes na célula alvo, para o interior das quais é endocitada. A porção A é a toxina propriamente dita: tem atividade de enzima ADP-ribosil transferase, aumentando com AMPc, um importante mediador intracelular cujo efeito nas células da mucosas brônquica é a produção muito acelerada de muco. A toxina também desregula macrófagos, resultando em resistência à fagocitose (Babu *et al.*, 2001).

A vacinação contra difteria, tétano e coqueluche é altamente eficaz, após esquema completo de imunização (Stehr, 1998; Simondon, 1997; Mortimer, 1999; Wassilak, 1999). O controle dessas doenças através da imunização em larga escala no Brasil e em outros países confirma essa eficácia. Como o título de anticorpos e a proteção declinam com o tempo, recomenda-se revacinação com vacina dupla dT (contra difteria e tétano) a partir dos 14 anos, sendo realizado um “booster” de dez em dez anos, durante toda a vida (Simonsen, 1986; Simonsen, 1989; Ramsay, 1993; Weckx e Carvalho, 1999; Mortimer, 1999; Wassilak, 1999; Centers for Disease

Control and Prevention, 1999; American Academy of Pediatrics, 2000; Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

Haemophilus influenzae é um cocobacilo gram-negativo, fastidioso que, de acordo com a estrutura química da camada externa polissacarídica, pode ser capsulada ou não-encapsulada. Neste último caso, é também chamada de não-tipável (Ministério da Saúde, 2005; Nascimento-Carvalho e Andrade, 2006; Dong, 2009).

Dos seis tipos existentes (a,b,c,d,e,f), o tipo b é predominante e o mais virulento do grupo (Nascimento-Carvalho e Andrade, 2006).

A vacina contra *H. influenzae* contém o polissacarídeo da cápsula bacteriana (poliribosil-ribitol fosfato - PRRP) conjugado à anatoxina tetânica e faz parte de uma nova classe de vacinas, planejadas para imunização contra doenças causadas por bactérias cuja virulência está ligada à presença de cápsula de polissacarídeos extracelular. Geralmente, são liofilizadas e devem ser reconstituídas imediatamente antes da administração (Bricks, 2002). O polissacarídeo de Hib é preparado a partir do polissacarídeo purificado, produzido por fermentação, utilizando cepa 20.752 e, após ativação com brometo de cianogênio e extração com um separador adípico de hidrazida, é combinado à anatoxina tetânica através de condensação com carbodiimida. Após a purificação, o conjugado é liofilizado em presença de lactose como estabilizador (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2007).

Estes conjugados foram avaliados em bebês e todos efetivamente elevaram a resposta dependente da célula T. Demonstrou-se clinicamente que as vacinas conjugadas Hib são capazes de induzir imunidade de proteção nos grupos etários mais expostos, isto é, bebês nos primeiros meses de vida (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos: vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2007).

A produção da vacina combinada contra DTP-Hib, também chamada tetravalente, que protege ao mesmo tempo, contra difteria, tétano, coqueluche e infecções graves pelo *Haemophilus influenzae* tipo b, foi iniciada em 2001, em parceria com o Instituto Butantan, sendo a fração Hib produzida em Bio-Manguinhos e as frações DTP, no Instituto Butantan (Bio-Manguinhos, 2007). Essa vacina consiste da combinação de duas vacinas: vacina polissacarídica contra *Haemophilus influenzae* tipo b conjugada com proteína tetânica sob a forma liofilizada e vacina contra difteria, tétano e coqueluche sob a forma de suspensão injetável tendo como diluente o hidróxido de alumínio (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos:vacina combinada

contra DTP e Hib, 2007). Há evidências demonstrando que o componente DTP aumenta a resposta imune para o componente Hib (Corbel, 1994).

4. OBJETIVOS GERAIS

Este estudo propõe-se a avaliar a imunogenicidade, em camundongos e cobaias, induzida pela combinação da vacina DTP-Hib com as vacinas meningocócicas B e C conjugada desenvolvidas em Bio-Manguinhos.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Introduzir a perspectiva para um novo produto em Bio-Manguinhos, que trará benefícios relacionados à produção e a inclusão de novas vacinas no Programa Nacional de Imunizações (PNI) associadas a vacinas pré-estabelecidas.
- Avaliar a interferência das vacinas meningocócicas B e C conjugada na imunogenicidade induzida pela vacina DTP-Hib em camundongos suíços, NIH e cobaias Short-Hair.
- Avaliar a pirogenicidade da vacina combinada completa.
- Propor o ELISA como metodologia alternativa, na avaliação da imunogenicidade dos componentes vacinais combinados na formulação comparando seus resultados com os obtidos através da metodologia padrão estabelecida para cada componente.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. VACINAS E METODOLOGIAS UTILIZADAS

As vacinas DTP-Hib e meningocócicas B e C conjugada brasileiras foram combinadas em uma única formulação a fim de avaliar sua imunogenicidade em animais de experimentação por diferentes testes padronizados comparados ao ELISA. Pela combinação dos componentes vacinais utilizados foram formados 6 grupos de imunógenos, como mostra a tabela 5.3. Como o $Al(OH)_3$ é o diluente preconizado para todos os componentes vacinais, este foi utilizado como controle negativo. Em todas as formulações onde a vacina DTP estava presente, esta foi utilizada como diluente, uma vez que é uma vacina líquida ressuspensa em $Al(OH)_3$.

Antes da administração das formulações em camundongos, estas foram diluídas em PBS 0,01 M estéril, numa concentração de 1:10 da dose humana. Em cobaias, a concentração foi 2,5 doses humanas. A resposta imunológica a *Neisseria meningitidis* grupos B e C e *Haemophilus influenzae* tipo b foi avaliada em camundongos suíços pelo ELISA para os componentes dos três microrganismos (VME, polissacarídeo C e PRRP, respectivamente). A resposta imunológica a *Bordetella pertussis* foi avaliada em camundongos NIH pelo ELISA de célula inteira desenvolvido no laboratório. No caso dos componentes diftérico e tetânico presentes na vacina DTP-Hib a potência de ambos foi avaliada pelo teste de neutralização *in vivo*.

GRUPOS	FORMULAÇÕES
1	DTP/Hib/ Vacina meningocócica B/ Vacina meningocócica C conjugada
2	DTP/Hib
3	Controle negativo: Al(OH) ₃
4	Vacina meningocócica B
5	Vacina meningocócica C conjugada
6	Hib

5.2. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

A fim de avaliar a resposta imunológica aos seis componentes vacinais, isoladamente ou combinados, foram elaborados protocolos de imunização para cada experimento. Os protocolos foram definidos de acordo com o animal preconizado pela metodologia padrão (camundongos suíços, camundongos NIH ou cobaias Short-Hair), levando em conta parâmetros como peso, dose e formulações das vacinas a serem administradas. As formulações utilizadas para a imunização dos animais foram divididas em grupos, e este padrão foi mantido em todos os experimentos realizados.

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL, antigo COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovado pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ para experimentação animal (nº LW-06/10).

A licença para o uso dos animais em experimentos realizados no INCQS está registrada no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ) sob o número P. 0135/02.

5.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS IMUNIZADOS COM AS VACINAS COMBINADA COMPLETA (DTP-Hib/B/C) E MENINGOCÓCICAS B E C CONJUGADA PELO ELISA

Duzentos camundongos suíços, de ambos os sexos, com peso entre 12 a 17 gramas foram divididos em 4 grupos de 50 animais e imunizados por via intramuscular com 0,2 mL das formulações descritas abaixo. As concentrações dos componentes vacinais administrados aos animais correspondem a 1:10 da dosagem aplicada em humanos. Os camundongos imunizados foram separados em grupos de 5 animais com o número do grupo correspondente.

GRUPO 1 - DTP/Hib/Vacina meningocócica B e vacina meningocócica C conjugada brasileira

GRUPO 3 - Controle negativo: $Al(OH)_3$

GRUPO 4 - Vacina meningocócica B

GRUPO 5 - Vacina meningocócica C conjugada

GRUPO 6 - Vacina Hib

A imunização foi realizada em três doses num intervalo de 15 dias entre elas, com quatro coletas sanguíneas: T0 (antes da 1ª imunização), T15 (antes da 2ª dose), T30 (antes da 3ª dose) e T60 (30 dias após a última imunização). A sangria foi realizada pelo plexo orbital, o soro separado e armazenado a $-20^{\circ}C$.

A partir das amostras sanguíneas desses camundongos foram avaliadas as respostas imunológicas contra *Neisseria meningitidis* grupo B e C e *Haemophilus influenzae* tipo b pelo do ELISA.

5.3.1. ELISA PARA VESÍCULA DE MEMBRANA EXTERNA DE *Neisseria meningitidis* GRUPO B DAS CEPAS N44/89 e N603/95

Placas de poliestireno de 96 poços (Corning Costar – placa de natureza hidrofóbica que liga biomoléculas por meio de interação passiva) foram sensibilizadas com 100 μL /poço de uma solução contendo VME de cepas prevalentes no Brasil (N44-89 ou N603-95) diluídas em tampão de sensibilização (Tris/HCl 0,1 M pH 8,5). Estas placas foram incubadas em câmara úmida por aproximadamente 16 horas a $37^{\circ}C$ ou até por 10 dias após sua preparação (mantidas a $4^{\circ}C$). No dia seguinte, foram adicionados 100 μL /poço do tampão de bloqueio (TBS-SFB 5%) e, em câmara úmida, incubadas por 1 hora a $37^{\circ}C$. As amostras testadas foram diluídas a 1:200, e o soro padrão, a 1:1600, ambos em

tampão de diluição (TBS-SFB 5%), foram adicionados as placas e diluídos seriadamente. As placas permaneceram em câmara úmida a 37°C por 2 horas. Após esse período, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído na proporção 1:3000 e as placas foram incubadas em câmara úmida por 2 horas a 37°C. Em seguida, foram adicionados 10 µL/poço da solução do substrato para a enzima fosfatase alcalina (p-nitrofenil fosfatase) (Sigma-Aldrich) diluída em tampão do substrato (TrisBase 1M pH 9,8) e, após 30 minutos a densidade óptica de cada amostra foi obtida em uma leitora VERSAmax tunable microplate reader a partir de um comprimento de onda 405 nm. As concentrações (EU/mL) foram obtidas por meio do parâmetro logístico-4 com a utilização do programa SoftMax-Pro. Entre cada etapa, foram realizadas lavagens com tampão TBS acrescido de 0,05% Tween 20. Essas lavagens foram procedidas 3 vezes em lavadora automática Skan Washer version B – Molecular Devices e utilizou 200µL do tampão por orifício da placa.

5.3.2. ELISA PARA O POLISSACARÍDEO DE *Neisseria meningitidis* GRUPO C

Placas de poliestireno de 96 poços (Immulux HB / Dynex - REF 1010 - placa com afinidade por complexos hidrofílicos e proteínas) foram sensibilizadas com 100 µL/poço com uma solução contendo Poli C e albumina humana metilada (Frasch, 1995). A placa foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4°C em câmara úmida. Entre cada etapa foi realizada uma lavagem com tampão TBS pH 7,5 acrescido de 0,05% de Tween 20 em lavadora automática (SkanWasher 300 versão B Molecular Device) com 200 µL/poço. Após a lavagem, foram colocados 200 µL/poço da solução de bloqueio (TBS acrescido de 5% de soro fetal bovino, 0,05% de Tween 20 e 0,02% de NaN₃) e a placa foi mantida a 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, as amostras e o soro padrão foram diluídos em tampão de diluição (TBS acrescido de 5% de soro fetal bovino e 0,05% de Tween 20) e seriadamente diluídos na placa para, posteriormente, ser incubada a 4°C por aproximadamente 16h em câmara úmida. No dia consecutivo à aplicação das amostras, foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-IgG murino (whole molecule) conjugado a enzima fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído em tampão de diluição (1:3000) e esta foi incubada em câmara úmida por 2 horas a temperatura ambiente. Na última etapa, foram adicionados 100 µL/poço da solução do substrato (p-nitrofenil

fosfatase) para fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído no tampão do substrato. Após ser mantida no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente, a placa foi levada a leitora VERSAmax tunable microplate reader a partir de um comprimento de onda 405 nm. As concentrações (EU/mL) foram obtidas por meio do parâmetro logístico-4 com a utilização do programa SoftMax-Pro.

5.3.3. ELISA PARA *Haemophilus influenzae* TIPO b

Placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp Nunc/ Immuno Plate - placa de superfície modificada com alta afinidade por grupos polares) foram sensibilizadas com 100 µL/poço com uma solução contendo 0,2 µg/mL de PRRP tirminado. A placa foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4°C em câmara úmida. Entre cada etapa foi realizada uma lavagem com tampão TBS pH 7,5 acrescido 0,05% de Tween 20 em lavadora automática (SkanWasher 300 versão B Molecular Device) com 200 µL/poço. Após a lavagem, foram colocados 200 µL/poço da solução de bloqueio (TBS acrescido de 1% albumina bovina) e a placa foi mantida a 1 hora a 37°C em câmara úmida. Em seguida, as amostras e o soro padrão foram diluídos em tampão de diluição (TBS acrescido de 1% albumina bovina) e seriadamente diluídos na placa para, posteriormente, ser incubada a 4°C por aproximadamente 16 horas em câmara úmida. No dia consecutivo à aplicação das amostras, foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-IgG murino (whole molecule) conjugado a enzima fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído em tampão de diluição (1:3000) e esta foi incubada em câmara úmida por 2 horas 37°C. Na última etapa, foram adicionados 100 µL/poço da solução do substrato (p-nitrofenil fosfatase) para fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído no tampão do substrato. Após ser mantida no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente, a placa foi levada a leitora VERSAmax tunable microplate reader a partir de um comprimento de onda 405 nm. As concentrações (EU/mL) foram obtidas por meio do parâmetro logístico-4 com a utilização do programa SoftMax-Pro.

5.4. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS NIH IMUNIZADOS COM A VACINA DTP-Hib E VACINA COMBINADA COMPLETA (DTP-Hib/B/C) PELO ELISA

5.4.1. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS NIH PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PELO ELISA

Para a quantificação dos anticorpos contra *Bordetella pertussis* induzidos pelas duas combinações, foram utilizados 40 camundongos NIH, com peso entre 12 e 17 gramas, ambos os sexos, divididos em três grupos, 1, 2 e 3. Os grupos 1 e 2 foram divididos em 4 pools de 4 animais e o grupo 3 em 2 pools de 4 animais.

GRUPO 1 - DTP/Hib/Vacina meningocócica B/ Vacina meningocócica C conjugada

GRUPO 2 - DTP/Hib

GRUPO 3 - Controle negativo: Al(OH)₃

Cada animal foi imunizado com 0,2 mL das formulações correspondentes a cada grupo por via intramuscular em três doses num intervalo de 15 dias. Foram realizadas quatro coletas sanguíneas: T0 (antes da 1ª imunização), T15 (antes da 2ª dose), T30 (antes da 3ª dose) e T60 (30 dias após a última imunização). A sangria foi realizada pelo plexo orbital, o soro separado e armazenado a -20°C.

A partir das amostras sanguíneas desses camundongos foram avaliadas as respostas imunológicas contra *Bordetella pertussis* através do ELISA.

5.4.2. ELISA PARA *Bordetella pertussis*

Placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp Nunc/Immuno Plate - placa de superfície modificada com alta afinidade por grupos polares) foram sensibilizadas com uma suspensão de bactéria *Bordetella pertussis* inativada (lote 137 Manclark 22\06\93) numa concentração de 30 µg/mL diluída em PBS e incubada em câmara úmida por aproximadamente 16 horas a 4°C. Entre cada etapa do teste foram realizadas 3 lavagens em tampão TBS-0,05% Tween em lavadora automática Skan Washer version B – Molecular Devices. As placas foram bloqueadas por 1 hora com tampão de bloqueio (TBS-1% BSA) em câmara úmida a 37°C. As amostras testadas e o soro padrão foram diluídos a 1:1600, ambos em tampão de diluição (TBS - 1% BSA), adicionados a placa e diluídos seriadamente. Ao soro padrão utilizado a cada teste foi dado um valor arbitrário de 1000 EU/mL. Posteriormente, a placa foi incubada em câmara úmida, por aproximadamente 16 horas a 4°C. No dia seguinte,

a placa foi lavada e 100 µL do anticorpo anti-mouse conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), diluído 1:3000 em tampão diluente, foi acrescentado a cada um dos poços da placa. Esta seguiu para incubação em câmara úmida a 37°C por 1 hora e, após este período, a placa foi novamente lavada. A cada orifício da placa foram adicionados 100 µL do substrato (Sigma-Aldrich) e, após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente protegido da luz, a densidade óptica de cada amostra foi obtida em uma leitora VERSAmax tunable microplate reader a partir de um comprimento de onda 405 nm. As concentrações (EU/mL) foram obtidas por meio do parâmetro logístico-4 calculado pelo programa SoftMax-Pro (Tang *et al.*, 2004).

5.5. COBAIAS SHORT-HAIR IMUNIZADAS COM A VACINA DTP-Hib E A VACINA COMBINADA COMPLETA (DTP-Hib/B/C) PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DOS COMPONENTES TETÂNICO E DIFTÉRICO NA COMBINAÇÃO E A QUANTIFICAÇÃO DE IgG TOTAL PELO ELISA

5.5.1. IMUNIZAÇÃO DE COBAIAS SHORT-HAIR PARA A AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS COMPONENTES TETÂNICO E DIFTÉRICO PELO ELISA

Na avaliação pelo ELISA, vinte e três cobaias, com peso entre 450-550 gramas, ambos os sexos, foram divididas em três grupos (1, 2 e 3). Os grupos foram compostos por 10, 10 e 3 animais, respectivamente. Os animais foram imunizados num esquema vacinal de três doses (intervalo de 30 dias entre as doses) com 0,75 mL das formulações descritas abaixo por via subcutânea.

GRUPO 1 - DTP/Hib/Vacina meningocócica B/ Vacina meningocócica C conjugada

GRUPO 2 - DTP/Hib

GRUPO 3 - Controle negativo: Al(OH)₃

As coletas sanguíneas foram realizadas a partir da veia jugular antes da 1ª imunização e 30 dias após a 3ª dose por punção cardíaca.

5.5.1.1. ELISA PARA TOXÓIDE TETÂNICO

Placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp Nunc/Immuno Plate - placa de superfície modificada com alta afinidade por grupos polares) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de toxóide tetânico a 0,2 µg/mL diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M com pH 9,6. A placa foi colocada em câmara úmida e incubada por aproximadamente 16 horas a 4 °C. Entre cada etapa do teste foram realizadas 3 lavagens em tampão TBS-0,05% Tween 20 em lavadora automática Skan Washer version B – Molecular Devices. No dia seguinte as placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de tampão de bloqueio (TBS-BSA 1%) por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Foram adicionados 100 µL das amostras diluídas na razão 1:1600 e do soro padrão diluído na razão 1:1600 em tampão de diluição (TBS-BSA 1%) e as placas foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 4°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas e 100 µL do anticorpo anti- IgG de cobaia conjugado a peroxidase diluído na razão 1:2000 em tampão de diluição foram adicionados e a placa incubada por 2 horas a 37°C e em câmara úmida. Após o período de incubação as placas foram lavadas e 100 µL do substrato foram adicionados a cada um dos poços da placa. Após a incubação de 20 minutos, a densidade ótica de cada amostra foi obtida em uma leitora VERSAmax tunable microplate reader a partir de um comprimento de onda 405 nm. As concentrações (EU/mL) foram obtidas por meio do parâmetro logístico-4 calculado pelo programa SoftMax-Pro.

Quando o procedimento foi realizado com soro de camundongos suíços, o protocolo seguiu as mesmas etapas descritas acima. Porém, houve alteração nas concentrações do soro padrão, amostra teste e do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:1600; 1:1600; 1:2000; respectivamente).

5.5.1.2. ELISA PARA TOXINA DIFTÉRICA

Placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp Nunc/Immuno Plate - placa de superfície modificada com alta afinidade por grupos polares) foram sensibilizadas

com 100 µL de toxina diftérica a 1µg/mL diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M com pH 9,6 e incubadas, em câmara úmida, por aproximadamente 16 horas a 4°C. Após cada etapa do teste as placas foram lavadas 3 vezes em tampão de lavagem TBS-T (TBS acrescido de 0,05% de Tween 20) em lavadora automática Skan Washer version B – Molecular Devices. As placas foram então bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com 100 µL de tampão de bloqueio (TBS-BSA 1%). As amostras analisadas foram diluídas na razão 1:20 em tampão de diluição (TBS-BSA 1%) e o soro padrão a 1:800 e uma diluição seriada foi realizada. A placa foi, posteriormente, incubada por aproximadamente 16 horas a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, após a lavagem foram adicionados 100 µL do conjugado anti-cobaia/HRP diluído na razão 1:2000 em solução de diluição. A placa foi incubada por 2 horas a 37°C. Foram adicionados 100 µL do substrato em cada orifício e, após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, a densidade ótica de cada amostra foi obtida em uma leitora VERSAmax tunable microplate reader a partir de um comprimento de onda 405 nm. As concentrações (EU/mL) foram obtidas por meio do parâmetro logístico-4 calculado pelo programa SoftMax-Pro (Weckx *et al.*, 2006; Karakus, Caglar e Aybay, 2007;).

Quando o procedimento foi realizado com soro de camundongos suíços, o protocolo seguiu as mesmas etapas descritas acima. Porém, houve alteração nas concentrações do soro padrão, amostra teste e do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:800; 1:100; 1:2000; respectivamente).

5.5.2. IMUNIZAÇÃO DE COBAIAS SHORT-HAIR PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PELOS TESTES DE SORONEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO*

Trinta animais com o peso entre 450-550 gramas foram divididos em três grupos e imunizados com 0,75 mL conforme as formulações abaixo. O esquema vacinal foi realizado numa única dose, com três coletas de sangue (antes da imunização, 4 e 6 semanas após a imunização, para a pesquisa de anticorpos contra difteria e tétano, respectivamente. As coletas foram realizadas por punção cardíaca.

GRUPO 1 - DTP/Hib/Vacina meningocócica B/ Vacina meningocócica C conjugada

GRUPO 2 - DTP/Hib

GRUPO 3 - Controle negativo: Al(OH)₃

5.5.2.1. DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DAS VACINAS DTP-Hib E COMBINADA COMPLETA (DTP-Hib/B/C) EM COBAIAS PELA SORONEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO*

5.5.2.1.1 SORONEUTRALIZAÇÃO - COMPONENTE DIFTÉRICO

Os soros dos animais obtidos 4 semanas após a imunização foram distribuídos em volumes variáveis com fator de diluição de 1:2 em tubos de ensaio e volumes constantes de toxina diftérica padronizada foram acrescentados, de modo que o volume a ser inoculado por animal contivesse uma L+/10/50 (dose capaz de matar 50% dos animais em até 96 horas quando misturada com 0,1 UI de soro referência internacional). O volume de todos os tubos foi igualado para 5,0 mL com solução salina com 1% (p/v) de peptona, foram homogeneizados e incubados a 37±0,5°C por aproximadamente 60 minutos. Em cada cobaia (250 a 350g) foi inoculado o volume de 1 mL por via subcutânea utilizando seringa de 1 mL e agulha 13 x 0,45 mm. Após a inoculação de 4 cobaias por diluição, os animais foram observados diariamente por 96 horas, e nesse período registrou-se o número de vivos em cada mistura. Os animais que apresentaram os sintomas diftéricos (pilo ereção, hipoatividade e intumescimento do abdômem) foram considerados como mortos.

5.5.2.1.2. SORONEUTRALIZAÇÃO - COMPONENTE TETÂNICO

Seguindo os procedimentos da titulação do soro diftérico, a titulação do soro tetânico (obtido 6 semanas após a imunização) foi executada utilizando 10 camundongos suíços (17 a 22g) por diluição. Os volumes dos tubos foram igualados para 3 mL com salina peptonada 1% (p/v), sendo inoculado 0,2 mL por camundongo. Após o registro dos animais vivos, aqueles que apresentaram os

sintomas tetânicos (corpo em forma de banana, dificuldade de locomoção, paralisia dos membros) foram considerados como mortos.

5.6. TESTE DE PIROGENICIDADE

O teste foi realizado como descrito na Farmacopéia Americana (United States, Pharmacopoeia, 2007).

O resultado é obtido avaliando o aumento de temperatura (individual e coletivo) dos coelhos. Se nenhum animal apresentar um aumento individual de temperatura igual ou maior que 0,5°C acima da sua própria temperatura normal, o produto é considerado livre de componentes pirogênicos. Se houver aumento na temperatura acima dos valores permitidos, é dada continuidade ao teste utilizando outros cinco coelhos. Se até três dos oito animais apresentarem aumento de temperatura igual ou maior que 0,5°C e se a soma do aumento máximo da temperatura individual dos oito coelhos não exceder 3,3°C a vacina é considerada livre de componentes pirogênicos (United States, Pharmacopoeia, 2007).

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de Grubbs e representados pelas médias geométricas (\pm erro padrão). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar estatisticamente diferenças significativas entre as médias geométricas de cada grupo analisado entre o dia 0 (antes da imunização) e 30 dias após a última imunização. Para avaliar os dados obtidos no teste de potência dos componentes tetânico e diftérico, os quais apresentaram uma distribuição normal foi utilizado o teste *t*. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas com $p \leq 0,05$. O coeficiente de correlação de Spearman (*r*) foi utilizado para avaliar os resultados entre a metodologia padrão e a metodologia proposta. Os dados foram analisados pelo programa Statgraphics Plus version 4.1 Professional (Maryland – USA) e Microsoft Excel (Washington – USA).

6. RESULTADOS

6.1. AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE AOS COMPONENTES VACINAIS, EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS E NIH IMUNIZADOS COM AS FORMULAÇÕES PROPOSTAS, PELO ELISA.

6.1.1 ELISA PARA VESÍCULA DE MEMBRANA EXTERNA (CEPAS N603/95 E N44/89)

- CEPA N603/95

Foram avaliados os títulos de anticorpos anti-VME cepa N603-95 a partir de pools de amostras sanguíneas de camundongos suíços imunizados com a vacina combinada completa e vacina meningocócica B brasileira isoladamente. Foi observado um aumento significativo nas respostas imunológicas dos camundongos para ambas as formulações vacinais quando comparados o T0 (antes da vacinação) e T60 (30 dias após a última imunização) (Figuras 1 e 2).

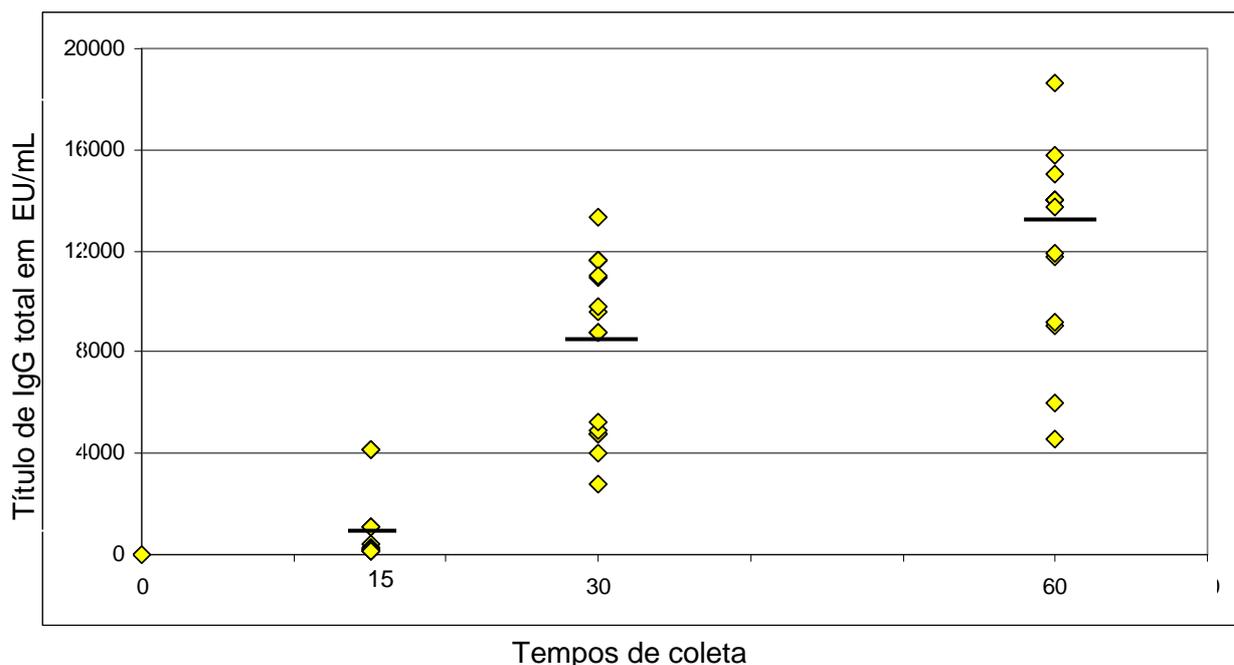


Figura 1. Quantificação dos níveis de IgG total anti-VME da cepa N603-95 avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina meningocócica B brasileira (Grupo 4). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

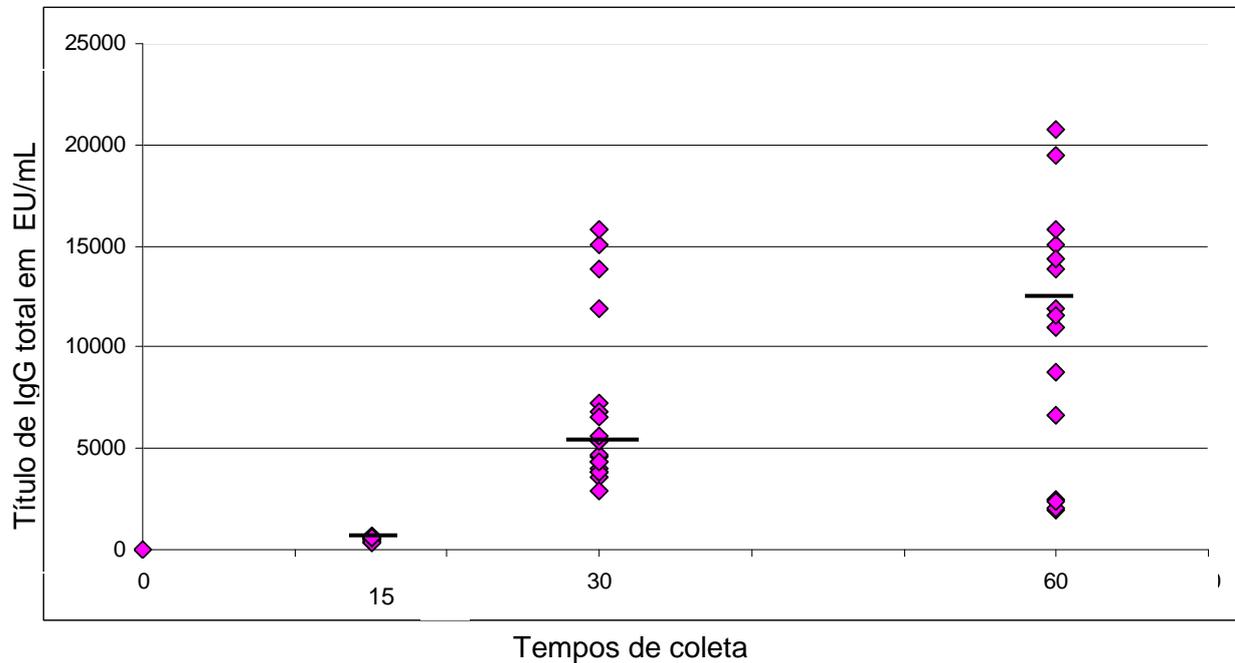


Figura 2. Quantificação dos níveis de IgG total anti-VME da cepa N603-95 avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

...stras
 sanguíneas das duas formulações vacinais coletadas 30 dias após a última
 imunização (T60), não foi observada diferença significativa entre os dois grupos.
 Esses resultados mostram que não houve interferência entre os componentes
 vacinais da formulação na resposta imunológica para a cepa N603/95 de *Neisseria
 meningitidis* grupo B (Figura 3).

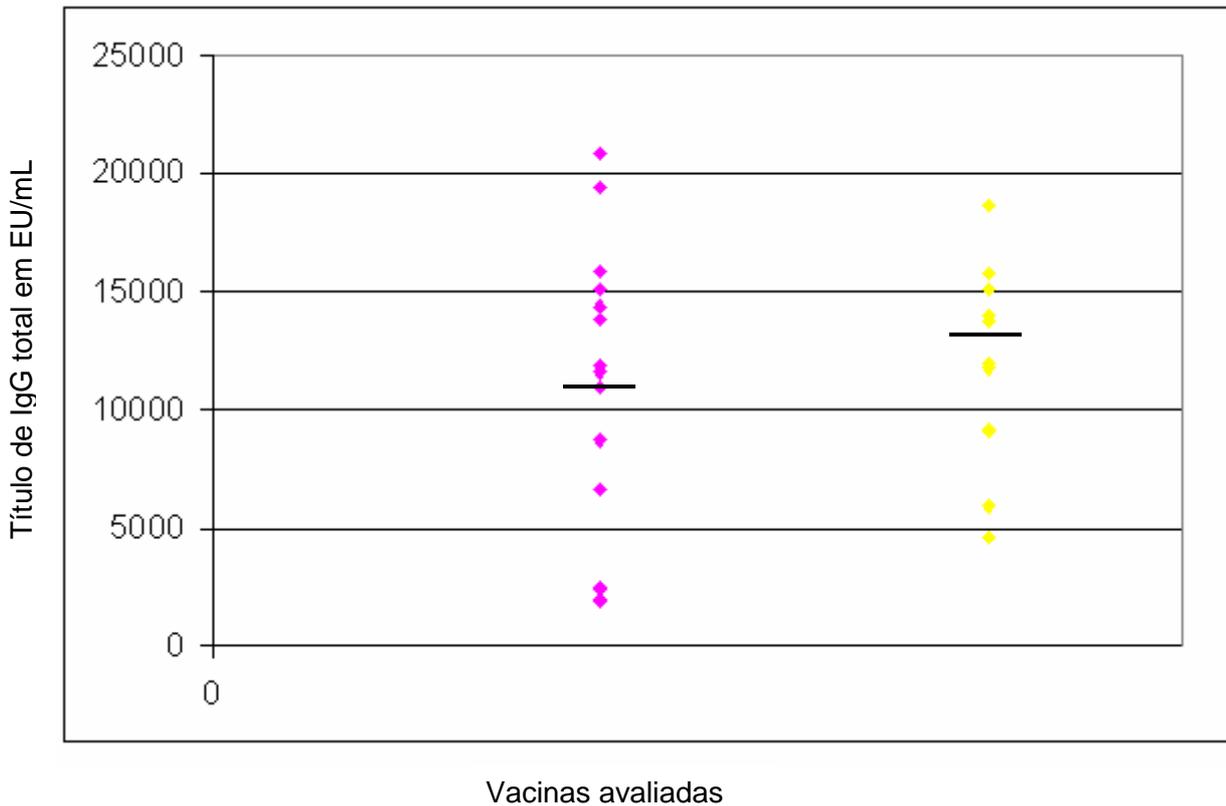


Figura 3. Comparação das respostas imunológicas a VME da cepa N603/95 de *Neisseria meningitidis* grupo B (entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (■) (DTP-Hib/B/C) (Grupo1) e meningocócica B (■) (Grupo 4) ($p>0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

- CEPA N44/89

Como observado nas figuras 4 e 5, entre os tempos T0 e T60, houve soroconversão nos dois grupos analisados (vacina combinada completa e vacina meningocócica B brasileira). Estes apresentaram um aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) nos títulos de IgG total trinta dias após a última imunização (T60).

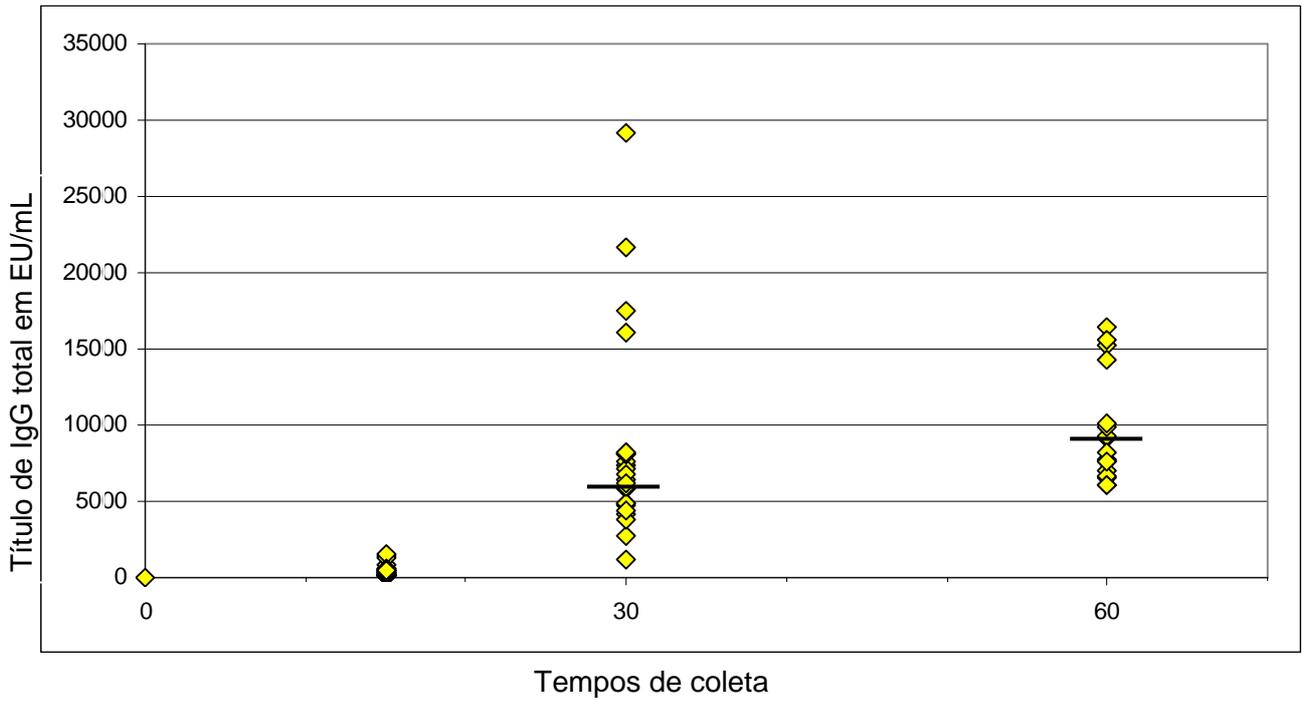


Figura 4. Quantificação dos níveis de IgG total anti-VME da cepa N44-89 avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina meningocócica B (Grupo 4). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

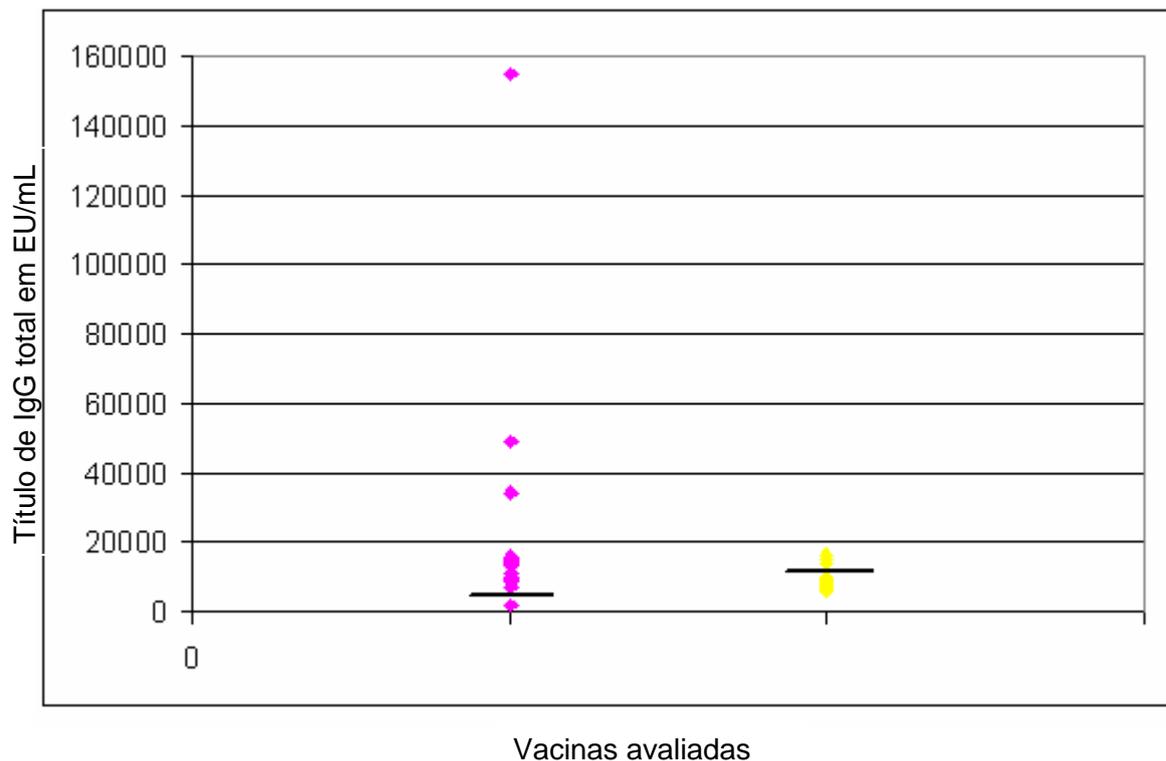


Figura 6. Comparação das respostas imunológicas a VME da cepa N44/89 de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (DTP-Hib/B/C) (■) (Grupo 1) e meningocócica grupo B (■) (Grupo 4) ($p > 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

6.1.2 ELISA PARA O POLISSACARÍDEO DE *Neisseria meningitidis* grupo C

Ao quantificarmos os títulos de IgG total contra o polissacarídeo C presente nos períodos de tempo correspondentes às imunizações realizadas – T0 (pré-imune), T15 e T30 (imunizações intermediárias), e T60 (30 dias após a última imunização) -, foi observado um aumento estatisticamente significativo durante a cinética entre esses tempos nos dois grupos imunizados (vacina combinada completa ($p = 0,000145727$); vacina meningocócica C conjugada brasileira isolada ($p < 0,05$)) (Figuras 7 e 8).

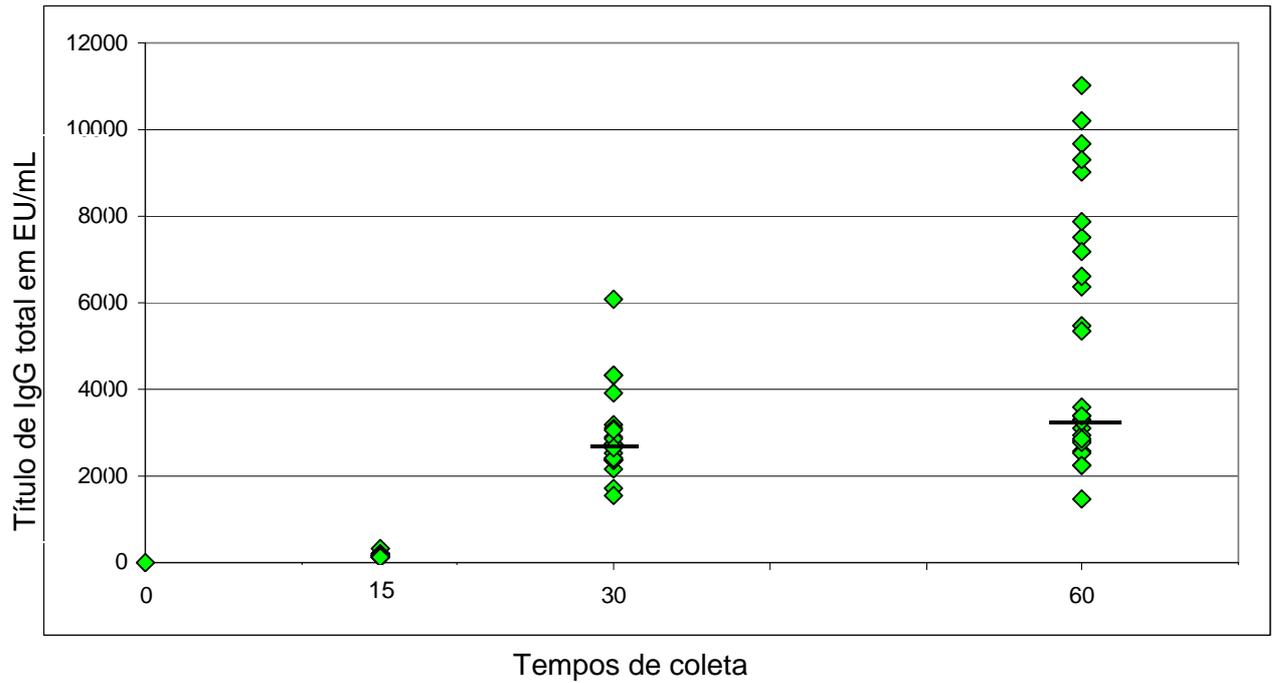


Figura 7. Quantificação dos níveis de IgG total anti-polissacarídeo C avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina meningocócica C conjugada brasileira (Grupo 5). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

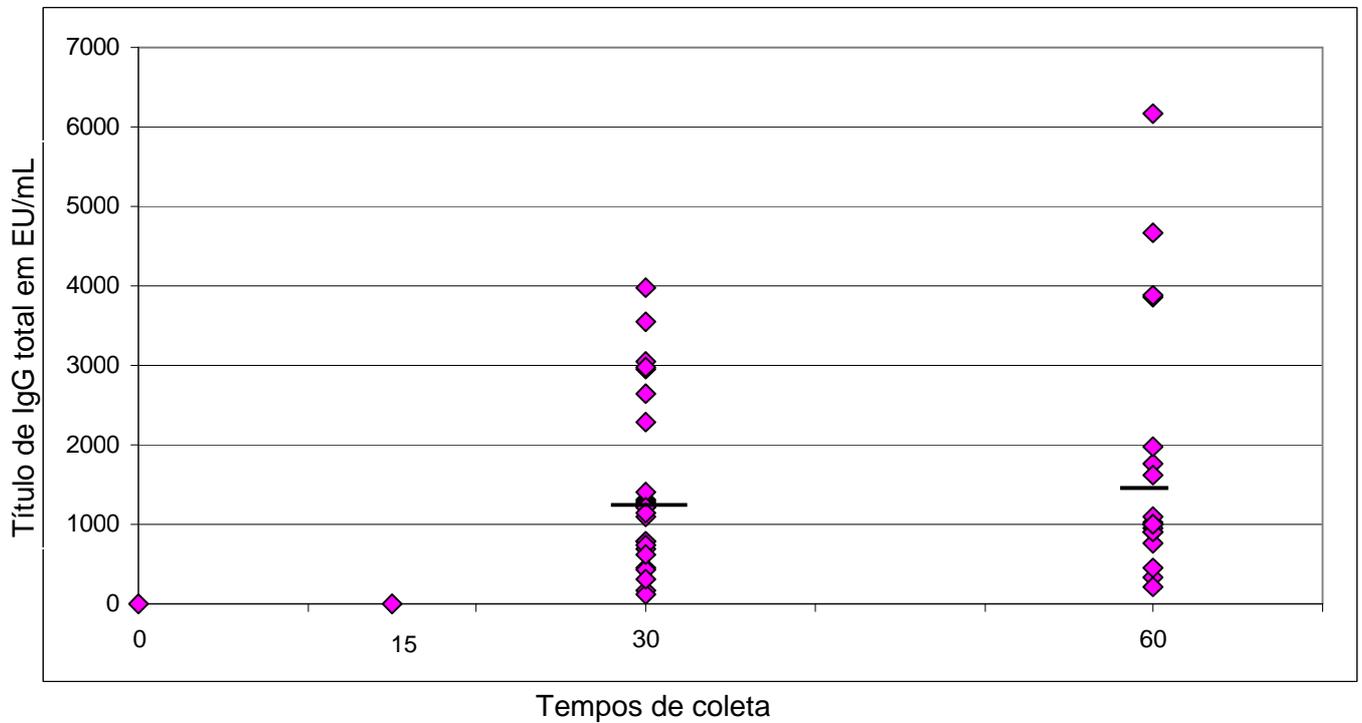


Figura 8. Quantificação dos níveis de IgG total anti-polissacarídeo C avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

Quando os títulos de IgG total das amostras sanguíneas coletadas 30 dias após a última imunização (T60) dos dois grupos vacinais foram comparados, ocorreu uma interferência significativa ($p < 0,05$) dos componentes vacinais combinados na resposta imunológica ao polissacarídeo C (Figura 9).

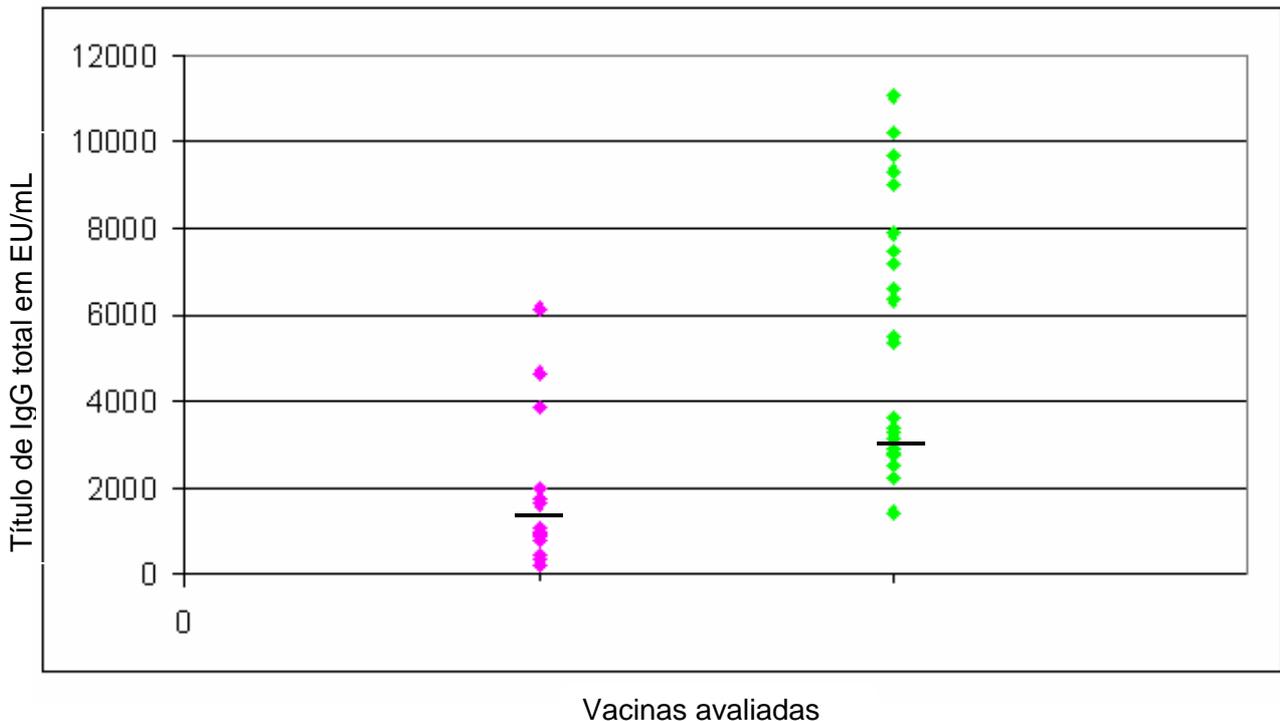


Figura 9. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60) induzido pelas vacinas combinada completa (DTP-Hib/B/C) (■) (Grupo 1) e meningocócica C conjugada (■) (Grupo 5) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

Tal fato pode ter ocorrido devido ao baixo número de *pools* de soros de camundongos imunizados ou a uma possível interferência de outro componente vacinal na resposta imunológica ao polissacarídeo C. Com isso, um novo protocolo foi sugerido propondo novas combinações entre os componentes vacinais para que a fonte dessa interferência fosse identificada e analisada.

Com o aumento do número de *pools* essa diferença estatística entre os dois grupos foi eliminada, ficando o p-valor no limite ($p=0,05$) (Figura 10).

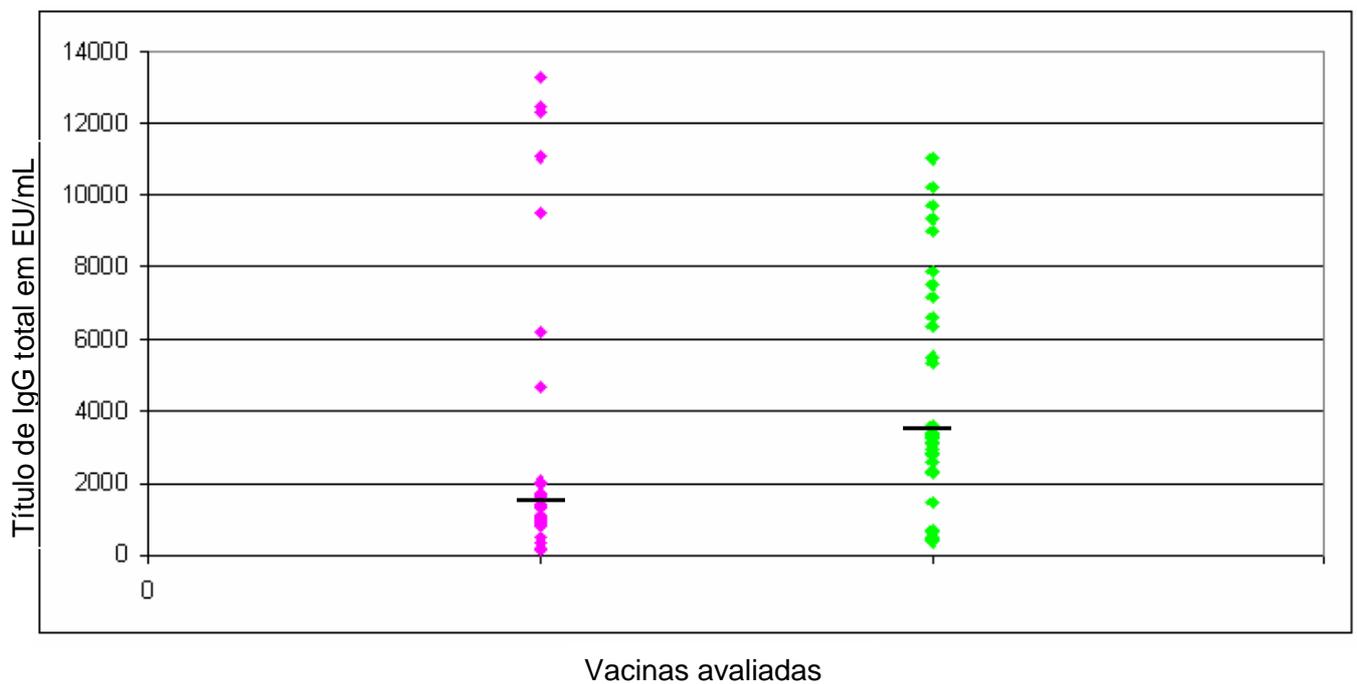


Figura 10. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacina combinada completa (■) (Grupo 1) e da vacina meningocócica C conjugada (■) (Grupo 5) ($p = 0,0577701$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

A vacina meningocócica grupo C conjugada foi então combinada com os componentes vacinais separadamente como descrito abaixo:

- vacina meningocócica C conjugada + meningocócica B
- vacina meningocócica C conjugada + Hib
- vacina meningocócica C conjugada + DTP

O gráfico revela que, quando as vacinas meningocócicas B e C conjugada são combinadas, esta última não é capaz de interferir na resposta imunológica conferida pela vacina conjugada, dado que não há diferença estatisticamente significativa quando os títulos médios geométricos correspondentes ao T60 de ambas as vacinas são avaliados (Figura 11).

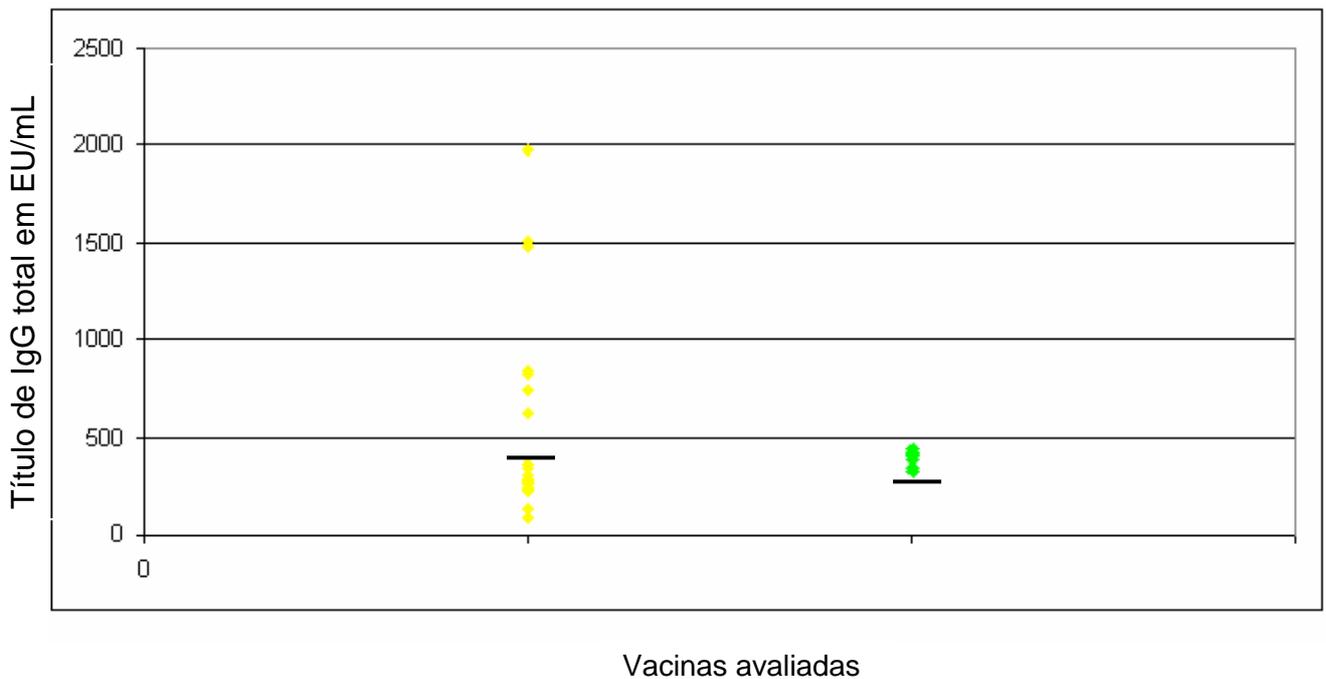


Figura 11. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pela vacina conjugada contra *Neisseria meningitidis* grupo C (■) (Grupo 5) e da mesma combinada à vacina meningocócica B brasileira (■) ($p=0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

Através da análise estatística, podemos observar que há diferença significativa quando a vacina meningocócica C conjugada é combinada à vacina Hib devido a um maior título de IgG total induzido pela combinação quando esta é comparada à vacina meningocócica C isolada (Figura 12).

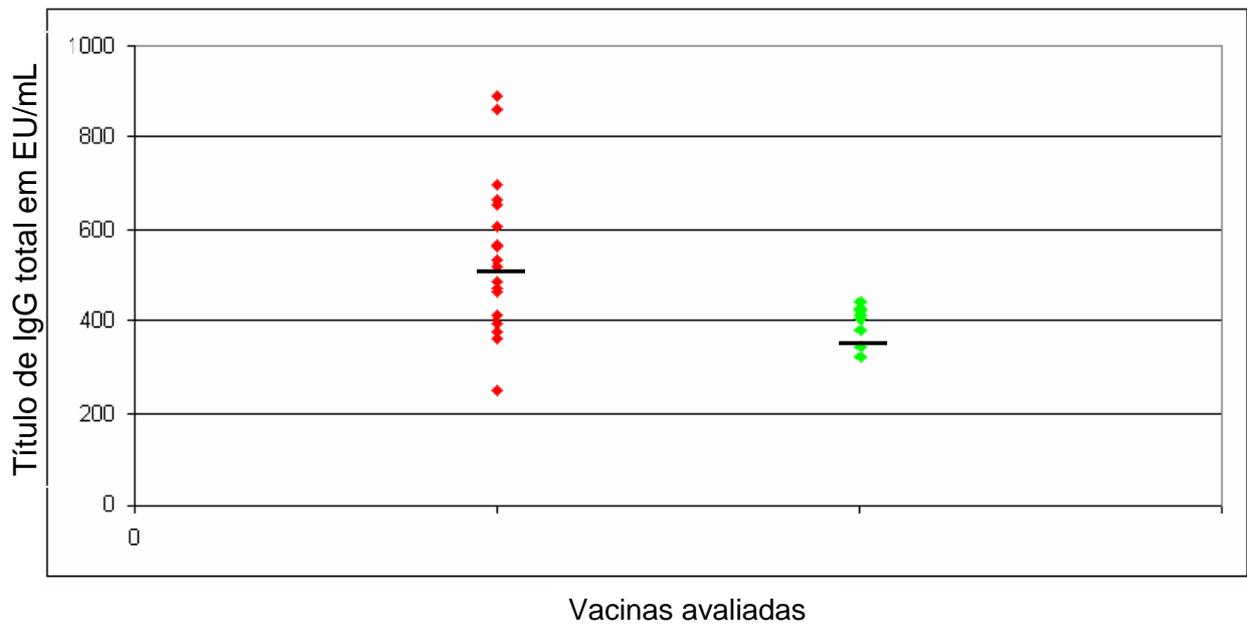


Figura 12. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pela vacina meningocócica C conjugada (■) (Grupo 5) e da mesma combinada à vacina Hib (■) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

Podemos observar com a análise do gráfico que o componente DTP interfere na resposta imunológica de camundongos, uma vez que a análise estatística demonstra que há diferença significativa entre os títulos obtidos quando analisadas as amostras coletadas no T60 de ambas as vacinas, com uma maior indução dos títulos de IgG total pela combinação entre DTP e vacina meningocócica C conjugada (Figura 13).

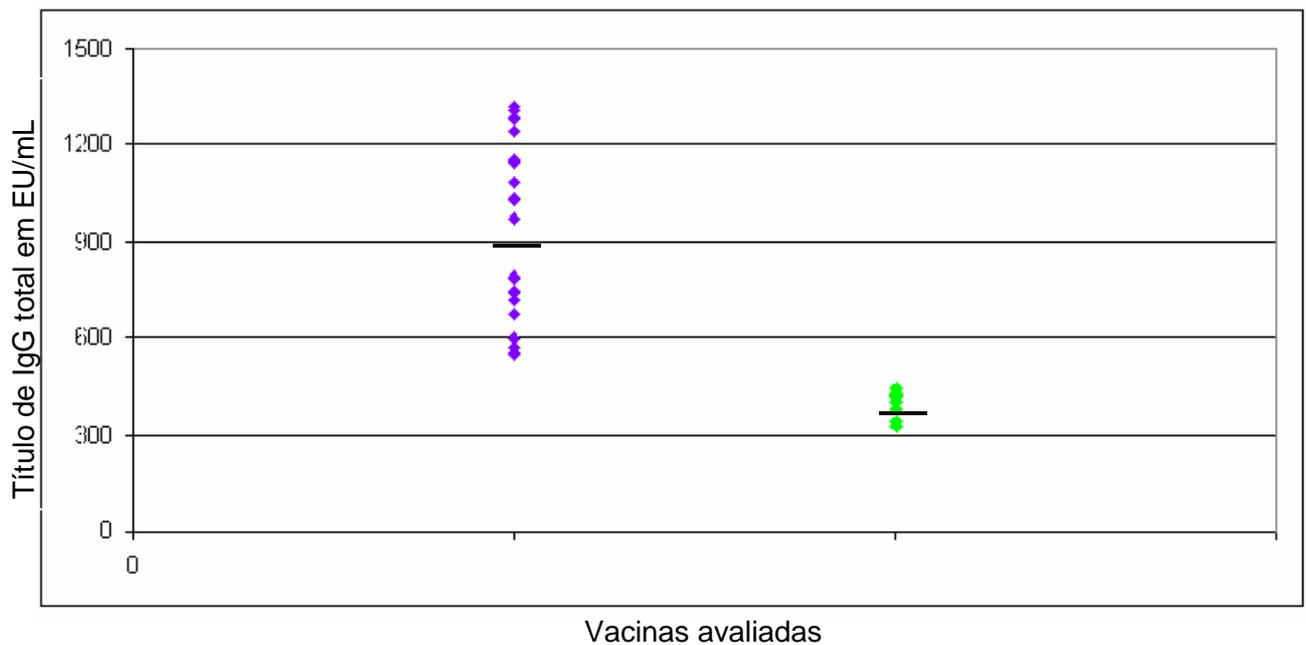


Figura 13. Comparação das respostas imunológicas ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pela vacina meningocócica C conjugada (■) (Grupo 5) e da mesma combinada a vacina DTP (■) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

6.1.3 ELISA PARA *Bordetella pertussis*

Após a imunização de camundongos NIH para a avaliação da resposta imunológica ao componente pertussis, foi observado aumento estatisticamente significativo nos títulos de anticorpos, quando analisados o T0 (antes da imunização) e o T60 (30 dias após a última imunização) (figuras 14 e 15).

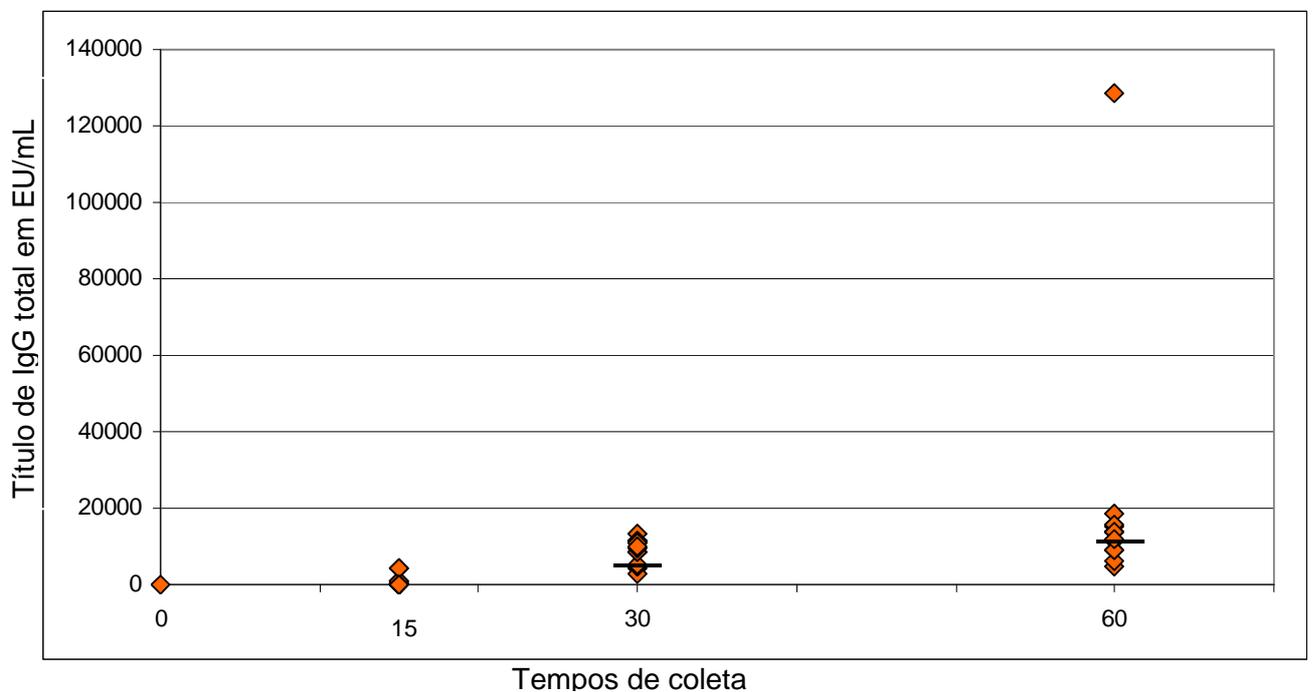


Figura 14. Quantificação dos níveis de IgG total anti-*B pertussis* avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina DTP-Hib (Grupo 2). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

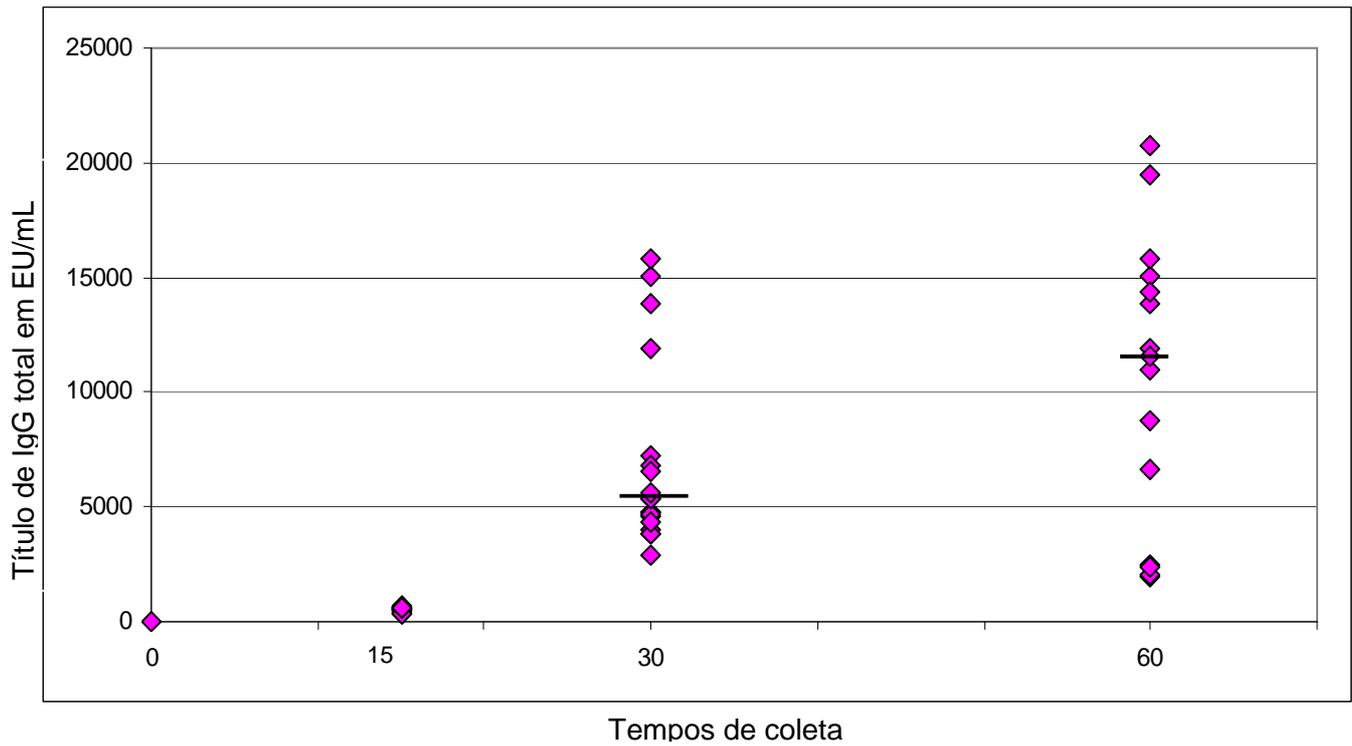


Figura 15. Quantificação dos níveis de IgG total anti-*Bordetella pertussis* avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

Quando comparamos a vacina combinada completa com a DTP-Hib, não observamos interferência entre os componentes vacinais na resposta ao componente pertussis (Figura 16).

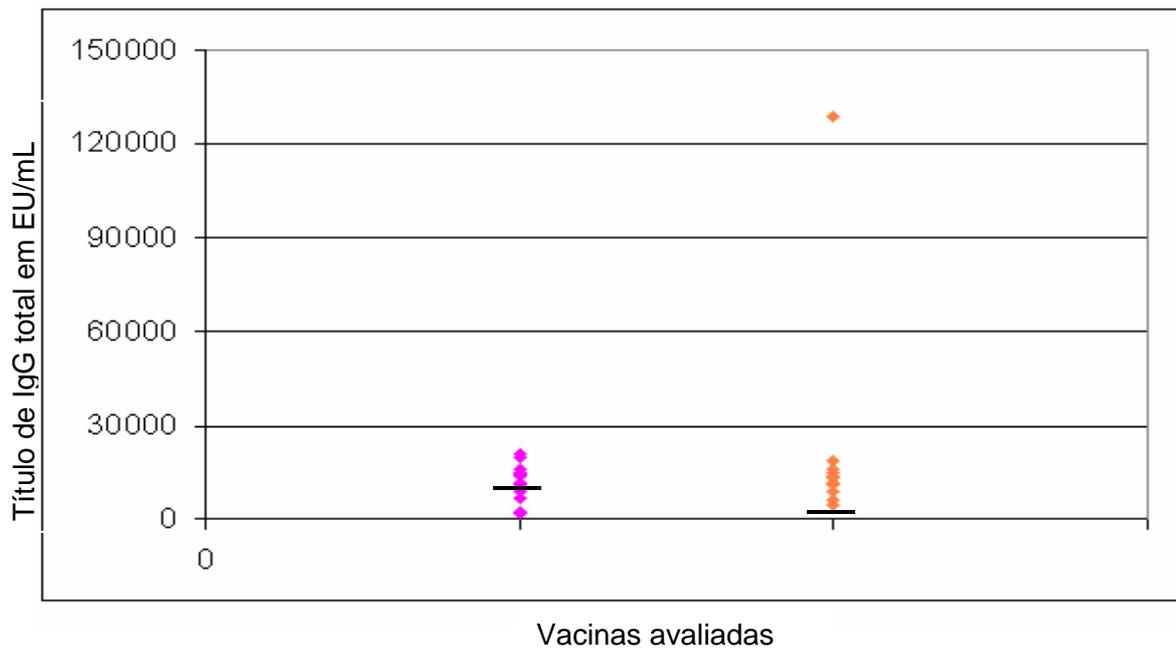


Figura 16. Comparação das respostas imunológicas a *Bordetella pertussis* entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (■) (Grupo 1) e DTP-Hib (■) (Grupo 2) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

6.1.4 ELISA PARA *Haemophilus influenzae* tipo b

Foram avaliados os níveis de anticorpos contra *Haemophilus influenzae* tipo b durante os quatro tempos de coleta [T0 (pré-imune), T15 e T30 (imunizações intermediárias), e T60 (30 dias após a última imunização)]. Com o passar do tempo, observou-se um aumento estatisticamente significativo tanto na cinética da vacina Hib ($p < 0,05$) quanto da vacina combinada completa ($p < 0,05$) (Figuras 17 e 18).

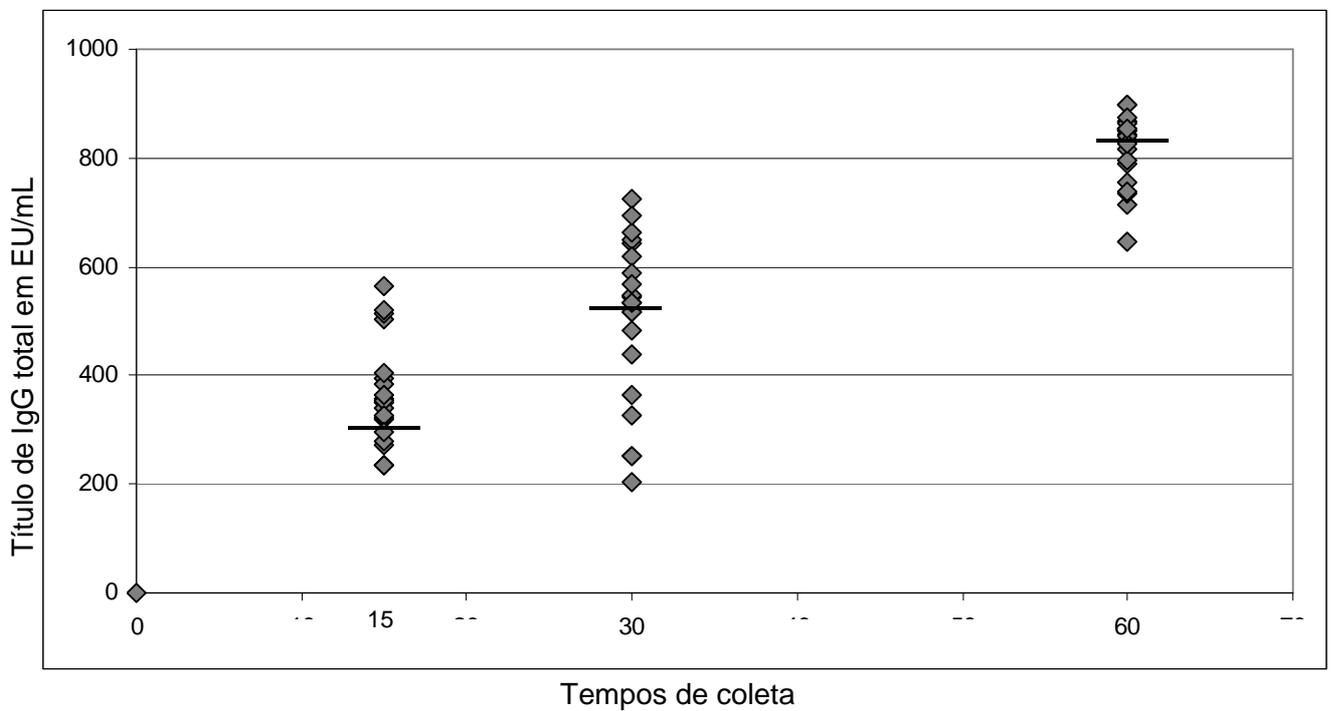


Figura 17. Quantificação dos níveis de IgG total anti-Hib avaliados em *pools* de amostras sanguíneas de camundongos imunizados com a vacina Hib (Grupo 6). T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

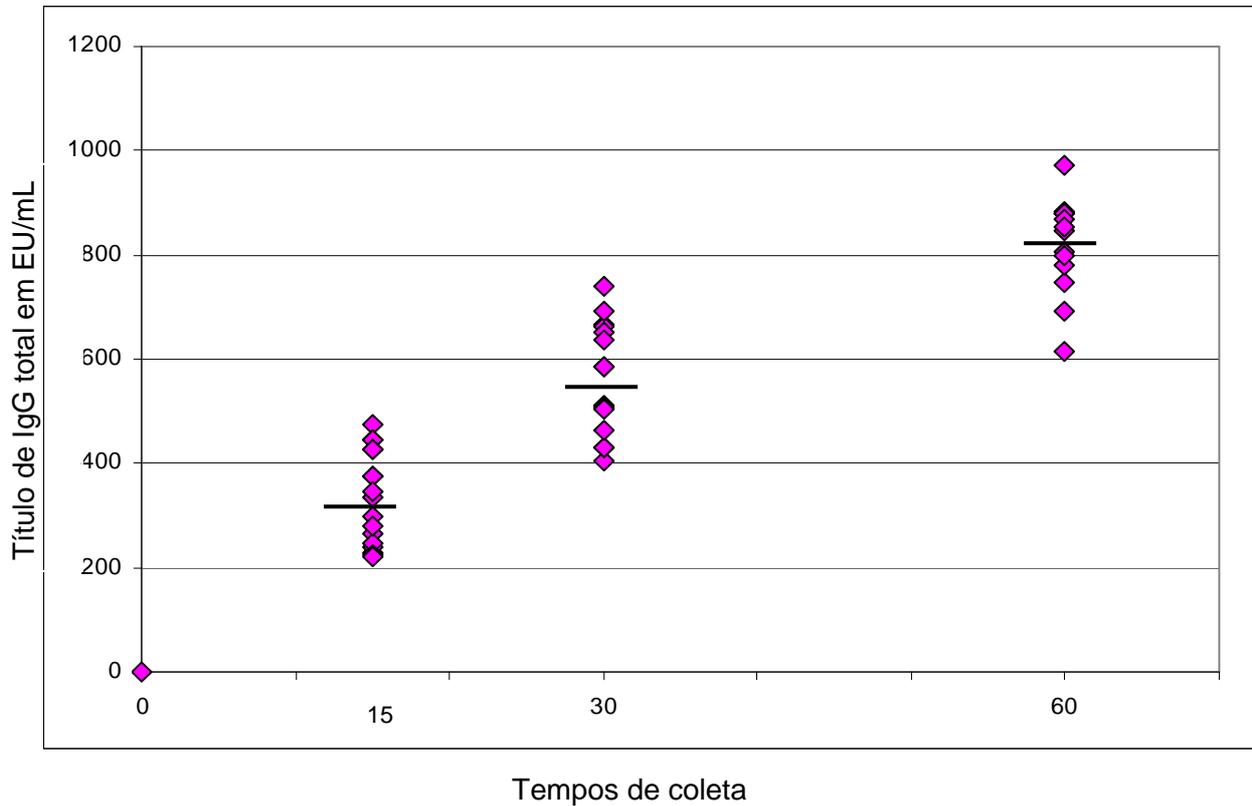


Figura 18. Quantificação dos níveis de IgG total anti-Hib avaliados em camundongos imunizados com a vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (Grupo 1) T0 (pré-imune), T15 (antes da 2ª imunização), T30 (antes da 3ª imunização) e T60 (30 dias após a última imunização) ($p < 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

Ao serem comparados os níveis de anticorpos presentes 30 dias após a última imunização (T60) induzidos pelas duas vacinas, pode-se avaliar que, devido ao p -valor de 0.55, não há diferença estatisticamente significativa entre a resposta imunológica tanto para a vacina Hib quanto para a vacina combinada completa (Figura 19).

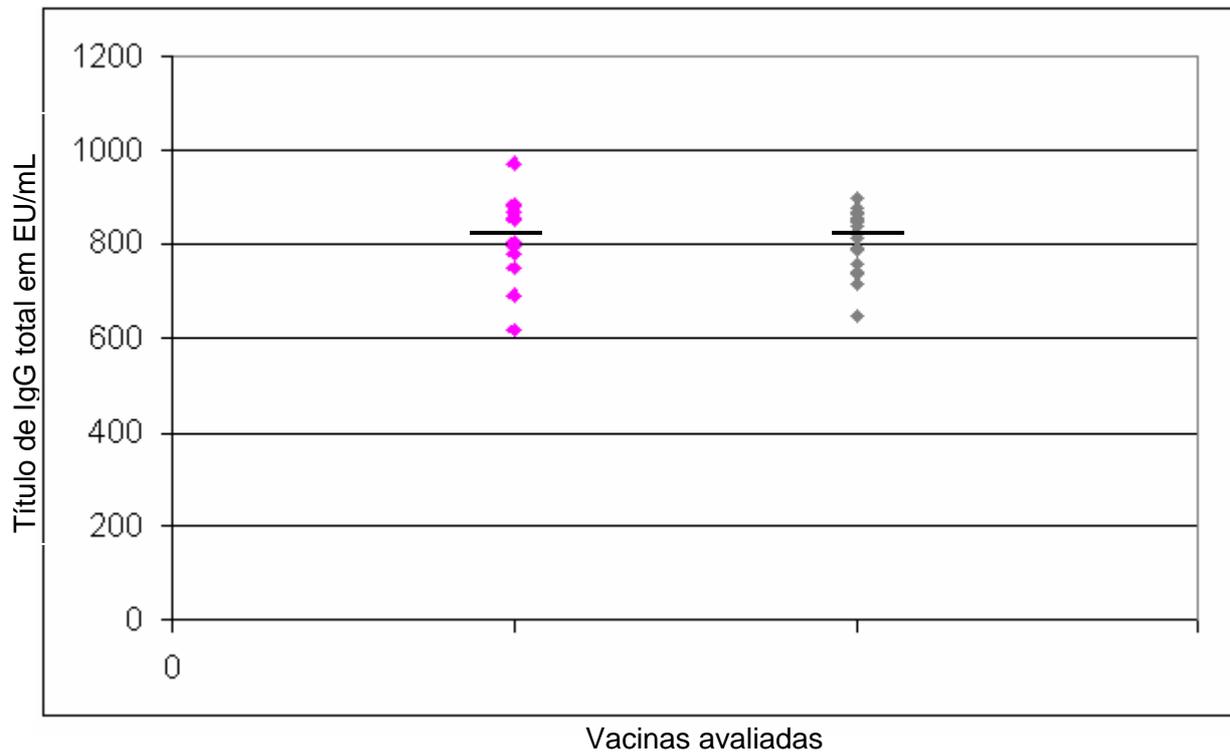


Figura 19. Comparação das respostas imunológicas a *Haemophilus influenzae* tipo b entre os títulos de IgG total, 30 dias após a última imunização (T60), induzidos pelas vacinas combinada completa (■) (Grupo 1) e Hib (■) (Grupo 6) ($p > 0,05$). O traço (—) representa a mediana dos dados.

6.2. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DOS COMPONENTES DIFTÉRICO E TETÂNICO NA VACINA COMBINADA COMPLETA PELA SORONEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO* EM COBAIAS

Os gráficos a seguir referem-se aos resultados obtidos a partir do teste de soroneutralização *in vivo*, pelo qual a potência dos componentes tetânico e diftérico, presentes da vacina DTP, foi avaliada. Foram comparadas a vacina DTP-Hib e a vacina combinada completa, sendo a potência fornecida em Unidades Internacionais por mL.

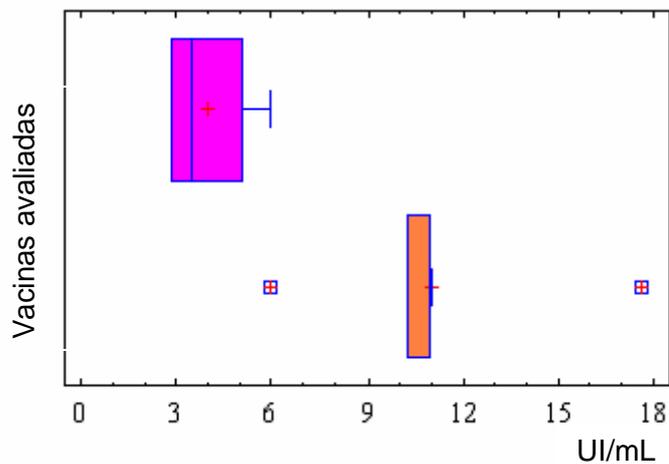


Figura 20. Potência do componente tetânico na vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (■) (Grupo 1) e na DTP-Hib (■) (Grupo2) pelo teste da neutralização *in vivo* realizado com 5 cobaias ($p < 0,05$). O traço (|) representa a mediana. A cruz (+) representa a média.

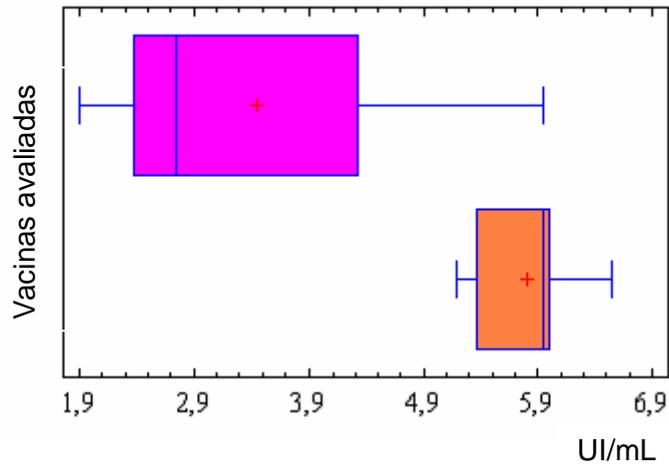


Figura 21. Potência do componente diftérico na vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (■) (Grupo 1) e na DTP-Hib (■) (Grupo 2) pelo teste da neutralização *in vivo* realizado com 5 cobaias ($p < 0,05$). O traço (|) representa a mediana. A cruz (+) representa a média.

6.3. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DOS COMPONENTES DIFTÉRICO E TETÂNICO NA VACINA COMBINADA COMPLETA PELO ELISA A PARTIR DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS

Os gráficos a seguir referem-se aos resultados obtidos a partir do teste de ELISA, pelo qual a quantificação dos anticorpos contra os componentes tetânico e diftérico, presentes da vacina DTP, foi avaliada. Foram comparadas a vacina DTP-Hib e a vacina combinada completa, sendo o resultado fornecido em Unidades de ELISA por mL.

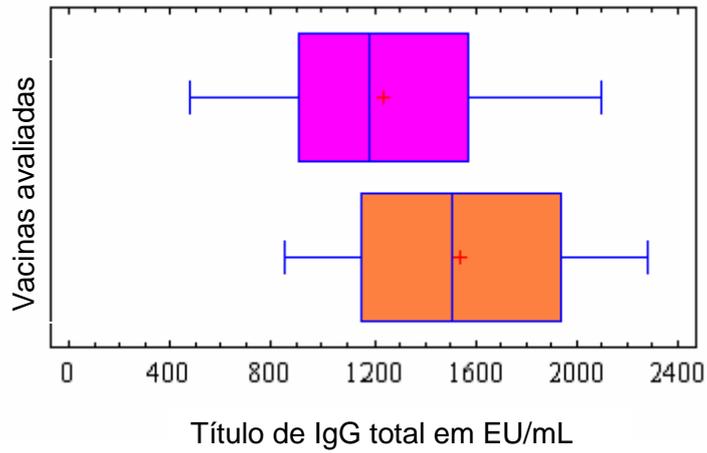


Figura 22. Quantificação dos níveis de IgG total ao componente diftérico na vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (■) (Grupo 1) e na DTP-Hib (■) (Grupo 2) avaliada pelo ELISA de amostras sanguíneas de 23 camundongos suíços ($p>0,05$). O traço (|) representa a mediana. A cruz (+) representa a média.

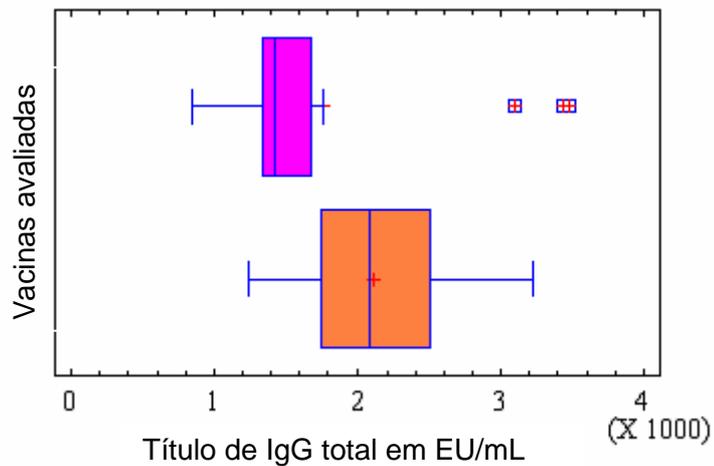


Figura 23. Quantificação dos níveis de IgG total ao componente tetânico na vacina combinada completa (DTP-Hib/B/C) (■) (Grupo 1) e na DTP-Hib (■) (Grupo 2) avaliada pelo ELISA de amostras sanguíneas de 23 camundongos suíços ($p>0,05$). O traço (|) representa a mediana. A cruz (+) representa a média.

6.4. AVALIAÇÃO DA PIROGENICIDADE DA VACINA COMBINADA COMPLETA REALIZADA EM COELHOS

O quadro 6.4 apresenta os resultados de pirogenicidade de cada componente isolado e da vacina combinada completa.

Quadro 6.4. Pirogenicidade dos componentes presentes na vacina e após sua combinação

VACINA	DILUIÇÃO	EU/mL*
Meningocócica B	1/4000	20000
Meningocócica C conjugada	1/4	20
DTP	1/3000	15000
Hib	1/4	20
Combinada completa	1/6000	30000

*Unidades de endotoxina por mL

De acordo com os resultados obtidos, a vacina combinada apresentou uma concentração de endotoxina acima do limite tolerado (5 EU/mL) .

7. DISCUSSÃO

A combinação de vacinas é uma estratégia que data do século XX. A primeira a ser introduzida, em 1948, foi a vacina DTPw, seguida pela combinação dos três tipos de poliovírus em uma vacina inativada (IPV) em 1958 e atenuada (OPV) em 1961. Em 1971, foi a vez da tríplice viral, com os vírus do sarampo, da caxumba e da rubéola, combinados em uma mesma vacina atenuada. Estas foram seguidas por uma crescente lista de vacinas combinadas e, até 2005, cerca de 20 delas já eram licenciadas pelos órgãos competentes de vários países (Dagan, 2005).

Atualmente, existem muitas vacinas combinadas disponíveis no mercado. Algumas são formuladas através da mistura de diferentes antígenos que integram ativamente a formulação final, como a vacina DTP-Hib e outras são misturas dos mesmos tipos de microrganismos pertencentes a estirpes diferentes, como as vacinas contra a gripe. Tais vacinas podem se apresentar numa formulação combinada ou esta combinação pode ser realizada na hora da imunização (Jivapisarnpong, 2009). Essas formulações foram concebidas com o objetivo de reduzir o número de injeções necessárias para a rotina de imunizações, bem como diminuir o número de visitas aos locais de vacinação. Por essa razão, são mais economicamente viáveis e sua administração é menos laboriosa do que os componentes vacinais aplicados separadamente (Gidengil *et al.*, 2010).

Uma desvantagem da combinação de vacinas é a possibilidade de ocorrer interferências antigênicas entre alguns de seus componentes, levando a diminuição da resposta imunológica. Além disso, a avaliação da reatogenicidade é complexa, uma vez que as reações adversas são mais difíceis de serem atribuídas a cada componente. Outro problema apresentado é o comprometimento da estabilidade, bem como os custos diretos da vacina combinada, que são maiores do que as vacinas isoladas contidas em sua formulação. Apesar disso, leva-se em

consideração o fato de ocorrer, indiretamente, a diminuição nos custos com material, com armazenamento e pessoal treinado (Dagan, 2005; Llop & Bermúdez, 2008).

O desenvolvimento de vacinas traz novos desafios aos processos de produção e administração das mesmas. A combinação de múltiplos antígenos em uma formulação requer a demonstração de que esta não reduz significativamente a segurança ou a imunogenicidade dos componentes vacinais. Além disso, outros fatores como a sequência de administração de certos antígenos podem desempenhar um papel importante na resposta imunológica (Edwards & Decker, 1994; Decker & Edwards, 1995; Pichichero, 2000; Jatana & Nair, 2007).

Para atingir estes objetivos de redução de visitas aos postos de vacinação e a uma melhor cobertura de indivíduos imunizados, este trabalho propõe a combinação da vacina DTP-Hib, amplamente utilizada no PNI (Programa Nacional de Imunizações), com as vacinas desenvolvidas em Bio-Manguinhos contra os meningococos grupos B e C, as quais estão em fase II do estudo clínico. A fim de avaliar a eficiência e a interferência dos componentes vacinais na combinação, ao longo do período analisado, foi proposta a metodologia padrão para cada componente e o ELISA como metodologia alternativa.

O ELISA já foi utilizado como metodologia alternativa para avaliação da potência de vacinas em vários estudos, como a resposta ao componente *pertussis* na DTP (Dias, 2003) e Hepatite A (Poirier, 2009). A partir de protocolos pré-estabelecidos, os procedimentos para avaliação de amostras de soro de cada animal utilizado (camundongos ou cobaias) foram determinados de acordo com a literatura publicada anteriormente (Gupta, Maheshwari & Singh, 1985; Hong *et al.*, 1996; Sonobe *et al.*, 2007).

O primeiro fator a ser considerado foi a ordem em que as vacinas seriam combinadas. Por ser líquida, a vacina DTP foi utilizada como diluente para a vacina Hib, seguida pelas vacinas meningocócica B e meningocócica C conjugada. Em seguida a combinação dos componentes vacinais, foi constatado que não houve alterações físico-químicas nas formulações administradas nos animais de experimentação.

Após a execução dos protocolos de imunização e recebimento das amostras, o soro processado foi submetido aos testes padrão e alternativo para a avaliação da imunogenicidade das formulações propostas.

A resposta imunológica para *Neisseria meningitidis* está ligada a níveis de anticorpos bactericidas fixadores de complemento, principalmente contra os grupos A e C (Goldschneider *et al.*, 1969). Porém, estudos pré-clínicos em animais e teste de vacinas em humanos têm indicado que anticorpos bactericidas (SBA) subestimam o nível de proteção proporcionado pela resposta imune ao meningococo e sugere que outros mecanismos da resposta imunológica também são importantes (Perkins *et al.*, 1998, Vermont & van der Dobbels, 2002).

Em recente estudo de imunogenicidade em camundongos imunizados com a vacina cubana, foi observado um aumento significativo dos níveis de IgG e anticorpos bactericidas após a terceira e quarta dose indicando uma predominância de IgG2 sobre IgG1 após a terceira dose. Porém, o aumento do número de doses favoreceu o desenvolvimento de IgG1, como pode ser observado após a quarta dose (Silva Junior *et al.*, 2007).

No estudo de fase I da vacina meningocócica B brasileira, foi observada uma diferença significativa nos níveis de anticorpos após a terceira dose, em resposta as cepas N44/89 e N603/95 pelo ELISA. Pelo método de análise dos anticorpos bactericidas foi observada uma tendência de soroconversão crescente para as duas cepas vacinais com as concentrações maiores dos antígenos, considerando um aumento de quatro vezes o valor do soro pré-imune (informação pessoal).

No presente trabalho observamos pelo ELISA que os níveis de anticorpos IgG para as cepas prevalentes brasileiras (N44-89 e N603-95), tanto para a formulação combinada quanto para a vacina meningocócica B brasileira, aumentaram e induziram uma soroconversão 30 dias após a 3ª dose, confirmando os resultados observados anteriormente (Jessouroun *et al.*, 2004).

Na avaliação dos títulos de IgG total, no ELISA, para polissacarídeo C, foi observado um aumento nos níveis de anticorpos e soroconversão para este componente vacinal 30 dias após a última dose da vacina meningocócica C conjugada. Estes resultados eram esperados, uma vez que o aumento de anticorpos frente a essa vacina já foi detalhado por outros autores (Gold *et al.*, 1977; Silveira *et al.*, 2007). Porém, quando são comparadas as respostas desta vacina e da vacina combinada completa, uma diferença significativa foi observada. Duas hipóteses para este fato foram aventadas: a primeira, de que o número de animais utilizados teria sido pequeno, o que poderia estar comprometendo o resultado; e a segunda, de que algum componente poderia estar interferindo na resposta ao componente vacinal. Com isso, é proposto um novo protocolo com um número maior de animais e com

combinações entre a vacina meningocócica C conjugada e os componentes da vacina combinada completa separadamente.

Numa segunda análise do soro dos camundongos imunizados com a vacina combinada completa, agora com o dobro dos animais imunizados anteriormente, a diferença entre a resposta à vacina meningocócica C conjugada e a vacina combinada completa não apresentou uma diferença estatística significativa, ficando o p-valor muito próximo do limite de 0,05.

Após as combinações da vacina meningocócica C conjugada com as vacinas DTP, Hib e meningocócica B, foi constatado que, segundo as análises estatísticas, esta última não interferiu na resposta dos animais à vacina meningocócica C conjugada como observado em outros estudos, onde a VME funciona como adjuvante para a vacina polissacarídica C induzindo a expressão de moléculas co-estimulatórias essenciais na resposta imunológica (Pérez-Melgosa *et al.*, 2001; Fukasawa *et al.*, 2004).

A combinação com a vacina DTP aumentou significativamente a resposta ao polissacarídeo C. Embora não tenha sido possível a combinação com cada componente DTP separadamente, essa interferência se deu, provavelmente, pela presença da fração *pertussis* da vacina. A base imunológica para este evento não é bem entendida, mas segundo relatos anteriores isto pode estar relacionado a presença das porinas (Por A), componente principal da VME de *Neisseria meningitidis* e da *Bordetella pertussis*, que atua como um adjuvante ou um mitógeno, induzindo a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86, as quais são essenciais na indução de uma resposta T dependente (Fukawasa *et al.*, 2004).

Assim como a vacina DTP, a vacina Hib também aumentou significativamente a resposta ao polissacarídeo C. Este fato também foi observado por Marshall e colaboradores (2011), onde os pesquisadores investigaram a ação da vacina Hib-MenCY frente a uma vacina contra *Neisseria meningitidis* que incluía o sorogrupo C em sua formulação. Neste estudo, 98% dos indivíduos no grupo Hib-MenCY apresentaram melhor resposta ao meningococo C, em comparação a 79% do grupo controle de indivíduos vacinados somente com a vacina contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo C.

Outros estudos têm sido realizados com o objetivo de analisar a eficiência das proteínas carreadoras, utilizadas nas conjugações aos polissacarídeos, no aumento da resposta imunológica do indivíduo imunizado contra o meningococo

grupo C. Apesar de existirem uma quantidade razoável de proteínas carreadoras, a mais utilizada e eficiente é o toxóide tetânico. Segundo Gatchalian e colaboradores (2008), a média geométrica da concentração de anticorpos para o polissacarídeo de meningococo C conjugado ao toxóide tetânico é significativamente superior do que quando conjugado ao CRM-197 ou ao toxóide diftérico. Segundo Dagan e colaboradores (1998), a concentração de proteína carreadora pode ser responsável pelo aumento da resposta imunológica ao polissacarídeo conjugado. Como tal proteína está presente na formulação dessas duas vacinas (DTP e Hib) combinadas a meningocócica C conjugada, esta concentração de TT pode ser responsável por esse aumento da resposta ao polissacarídeo C encontrado.

O ELISA (metodologia padrão para avaliação da imunogenicidade para o componente PRRP) para Hib apresentou aumento progressivo nos níveis de IgG, com soroconversão 30 dias após a última imunização. O mesmo foi observado na análise da vacina combinada completa. Esses resultados eram esperados, uma vez que a combinação DTP-Hib já faz parte da rotina de imunizações brasileira (Ribeiro *et al.*, 2007) e tem sua eficácia e imunogenicidade amplamente estudada (Hoppenbrouwers *et al.*, 1999; Monteiro, Takano & Waldman, 2010). Além disso, trabalhos anteriores já descreveram o sucesso da combinação de Hib a outras formulações, incluindo vacinas contra *Neisseria meningitidis* (Kerdpanich *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2007; Saydam *et al.*, 2010).

Apesar dos anticorpos desempenharem um papel importante na proteção contra *Bordetella pertussis*, os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta humoral ainda não são bem definidos. Tal fato está ligado à impossibilidade de discriminação pelo ELISA entre os anticorpos que se ligam a determinantes conformacionais sobre a estrutura da bactéria ou a determinantes sobre as proteínas desnaturadas, sem poder prever a funcionalidade destes anticorpos na limitação da infecção (Mills, 2001). Ainda assim, o ELISA tem sido utilizado em vários testes clínicos para avaliação dos níveis de anticorpos em indivíduos imunizados com o componente *pertussis* (Trollfors *et al.*, 1995; Simondon *et al.*, 1997).

A análise realizada sobre os resultados do ELISA para *Bordetella pertussis* revelou aumento do nível de anticorpos contra esse microrganismo e soroconversão 30 dias após a última imunização, tanto para a vacina combinada completa quanto para a vacina DTP-Hib. Esse resultado já foi observado por outros pesquisadores,

tanto para a combinação DTP-Hib (Begg *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 2008) quanto para DTP combinada a outras formulações (Southern *et al.*, 2006; Gatchalian *et al.*, 2008;).

Devido a uma grande quantidade de proteínas imunogênicas presentes na membrana da *Bordetella pertussis* (mais de 3000), ela apresenta tanto um efeito adjuvante próprio como para outros componentes combinados, exercendo um efeito estimulatório da resposta imunológica de uma maneira geral (Pollabauer *et al.*, 2009). Estudos imunológicos em humanos e animais já demonstraram que a vacina contra *Bordetella pertussis* é capaz de aumentar a produção de anticorpos contra vários antígenos (Greenber & Fleming, 1947; Greenber & Fleming, 1948; Fleming, Greenberg & Beith, 1948; Kind, 1957; Munoz, 1963; Finger, 1965; Munoz & Bergman, 1968; Finger, Emmerling & Brüss, 1970), e que o aumento na síntese de imunoglobulina induzida pela bactéria deve-se, sobretudo, a uma multiplicação prolongada e acelerada de células formadoras de anticorpos (Finger, Emmerling & Schmidt, 1967; Finger *et al.*, 1968; Rowley *et al.*, 1968; Finger, Emmerling & Brüss, 1970).

A avaliação da potência dos componentes diftérico e tetânico na vacina DTP é rotineiramente estimada através do teste de neutralização *in vivo* em cobaias Short-Hair (Sonobe *et al.*, 2007) e em camundongos suíços (Cohen, Ramshorst & Tasman, 1959) respectivamente. O critério de aceitação da eficiência deste componente requer a análise de um *pool* de soros de, no mínimo, quatro cobaias após quatro semanas de imunização subcutânea com 1 ½ dose humana produzindo, no mínimo, uma concentração de 2 UI/mL (uso em crianças) e 0,5 UI/mL (uso em adultos) de antitoxina (Dular, 1993). Algumas metodologias alternativas são utilizadas na avaliação da potência, como o ToBI (Gupta, Maheshwari & Singh, 1985) e o ELISA (Gupta, 1995; Kristiansen, Aggerbeck & Heron, 1997), apresentando, principalmente o ToBI, uma alta correlação com a metodologia padrão (Walory, Grzesiowski & Hryniewicz, 2000).

O teste de neutralização *in vivo* em cobaias mede diretamente a atividade biológica da antitoxina diftérica e tetânica por demonstrar a capacidade do soro do animal em neutralizar a toxina (WHO, 1993). Nesta análise, os resultados são baseados nas proporções de animais mortos e sobreviventes ao final de um determinado período, geralmente quatro dias, após a injeção da mistura soro-toxina

(Barile, Hardegree & Pittman, 1970; Eckmann 1963; Glenny & Stevens 1938; Gottlieb *et al.*, 1964; Wilkins & Tasman 1959). A precisão e a sensibilidade do teste de neutralização são influenciadas pela natureza da toxina utilizada (bruta ou purificada), o nível de teste da toxina (L+), bem como o peso dos camundongos (Gupta, Maheshwari & Singh, 1985; Peel, 1980).

De acordo com os resultados obtidos, houve uma diferença significativa no teste *in vivo* para os componentes diftérico ($p=0,0168755$) e tetânico ($p=0,0162238$) quando analisamos a potência da vacina em animais imunizados com a DTP-Hib e em animais imunizados com a vacina DTP-Hib combinada com as vacinas meningocócica B e meningocócica C conjugada brasileiras. A vacina DTP-Hib mostrou-se mais eficiente em cobaias, na indução pelo componente diftérico, do que quando combinada com as vacinas meningocócicas. Tal fato pode ser devido à inclusão dos componentes vacinais meningocócicos na combinação, como observado por outros autores onde tais vacinas podem interferir negativamente nos componentes da vacina DTP-Hib (Gatchalian *et al.*, 2007) ou estar relacionado à capacidade da bactéria do gênero *Neisseria* de neutralizar o soro de cobaias comprometendo sua resposta a outros antígenos (Arko & Wong 1977).

Gatchalian e colaboradores (2007) avaliaram a imunogenicidade dos componentes de uma combinação de vacinas (DTP-Hib-HBV-*Neisseria meningitidis* sorogrupos A e C) em humanos. Neste estudo, a combinação que continha a vacina antimeningocócica C em sua formulação apresentou diminuição significativa nos níveis de resposta a *Bordetella pertussis* quando comparada à combinação que não incluía essa vacina. Em contrapartida, os níveis de anticorpos antitetânicos aumentaram quando comparadas à vacina experimental DTP-Hib-*Neisseria meningitidis* sorogrupos A e C ao controle DTP-Hib-HBV-*Neisseria meningitidis* grupo C.

Em estudo realizado com *Neisseria gonorrhoeae*, foi observado que lavados da superfície da bactéria eram capazes de neutralizar a ação do soro de cobaias. Os pesquisadores não sabem a razão pela qual esses resultados ocorrem. Por isso, salientam que esses resultados necessitam de uma investigação mais profunda (Arko & Wong, 1977).

Também já foram relatados casos em que espécies do gênero *Neisseria* não foram capazes de promover infecção em cobaias (Arko & Wong, 1977; Novotny *et*

al., 1978). Arko provou, em 1977, que cobaias só eram capazes de desenvolver infecção contra *Neisseria* se a elas fosse fornecida dexametasona, um medicamento pertencente à classe dos corticosteróides, que atua no controle da velocidade de síntese de proteínas e altera profundamente a resposta imune devido a sua ação imunossupressora (Arko, 1977). Estes fatos podem explicar a diminuição da potência dos componentes diftérico e tetânico das vacinas DTP-Hib quando combinadas às vacinas meningocócica B e C conjugada, já que há interferência na resposta imunológica e do reconhecimento de membros do gênero *Neisseria* quando estes microorganismos são utilizados em testes com cobaias.

Quando analisados os resultados da potência das vacinas DTP-Hib e combinada completa em relação à toxina tetânica, observa-se diminuição da resposta a esta última quando as vacinas meningocócicas B e C conjugada são adicionadas ao sistema. A literatura não descreve o mecanismo pelo qual ocorre esse fato. Porém, pelas mesmas hipóteses inferidas por Arko em 1977, Arko e Wong em 1977 e Novotny e colaboradores em 1978, pode-se deduzir que as vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C atuam da mesma maneira, interferindo no resultado final quando a avaliação é feita em cobaias.

Porém, quando analisamos a resposta imunológica aos componentes tetânico e diftérico em camundongos suíços, não observamos diferença significativa entre os dois grupos analisados (DTP-Hib e DTP-Hib/B/C). Devido aos camundongos suíços serem utilizados como modelo de avaliação do gênero *Neisseria* (González *et al.*, 2006) podemos concluir que não ocorre interferência na resposta imunológica a outros componentes vacinais ocasionada por tal gênero.

A febre é um dos principais sintomas de infecções causadas por patógenos (Balls *et al.*, 1995; Balls & Karcher, 1995). Entretanto, a reação febril não está diretamente conectada a microrganismos vivos. No final do século XIX, foi descoberto que os contaminantes capazes de induzir febre eram estáveis ao calor. Logo depois, foi feita a conexão entre pirogenicidade e a endotoxina termoestável de bactérias gram-negativas (Hartung *et al.*, 2001).

Endotoxinas bacterianas, encontradas na membrana externa desses microrganismos, são membros de uma classe de fosfolipídeos chamados lipopolisacarídeos (LPS) (EMEA, 2009). É o contaminante pirogênico mais frequentemente encontrado em medicamentos (Das *et al.*, 2004). Quando estes

componentes microbianos estão presentes os monócitos/macrófagos reagem, induzindo a liberação de pirogênios endógenos, como prostaglandinas e as citocinas pró-inflamatórias: interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α (Barth *et al.*, 2007).

A fim de atestar a vacina combinada, esta foi submetida a testes de pirogenicidade em coelhos. O teste envolve a medida do aumento da temperatura nos animais, após a injeção intravenosa da vacina, verificando a temperatura retal dos animais a intervalos de 30 minutos, por um período de 3 horas (Pearson, 1985; Brasil, 2003; USP30, 2007).

Dois testes de pirogenicidade foram realizados, com a finalidade de corroborar os resultados. Em ambos a vacina combinada completa foi reprovada, uma vez que aumentou a temperatura dos animais. Estes resultados se deram, provavelmente, pela presença das frações *pertussis* e VME de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B na vacina, dois componentes conhecidamente pirogênicos (Andersen & Solberg, 1978; Sidey, Furman & Wardlaw, 1989; Caroff *et al.*, 2000; Stoddard *et al.*, 2010).

8. CONCLUSÕES

- A combinação das vacinas meningocócicas B e C conjugada à vacina DTP-Hib não alterou suas propriedades físicas e químicas;
- A combinação proposta não interferiu na resposta imunológica à vacina meningocócica B, aos componentes pertussis e ao PRRP da vacina DTP-Hib avaliada pela metodologia alternativa em camundongos suíços;
- No caso da vacina meningocócica C conjugada, houve uma interferência negativa de algum componente da combinação no título de IgG total induzido pelo polissacarídeo C observado pelo ELISA. Porém, quando a vacina meningocócica C conjugada foi combinada aos componentes vacinais separadamente, observamos uma interferência positiva tanto da DTP quanto da Hib, na resposta imunológica dos camundongos ao polissacarídeo C. Baseado em tais resultados, não foi possível detectar o componente interferente da vacina combinada completa na resposta ao polissacarídeo C;
- Pela metodologia padrão utilizada na avaliação da potência dos componentes diftérico e tetânico em cobaias, houve uma redução na capacidade protetora quando a vacina DTP-Hib foi combinada com as vacinas meningocócicas B e C conjugada. Porém, quando a quantificação de IgG foi realizada pela metodologia alternativa (ELISA), em camundongos, não houve diferença na capacidade de indução de anticorpos pelas duas combinações;
- A vacina combinada completa apresentou uma alta pirogenicidade quando avaliada pela metodologia *in vivo* (coelhos). Este fato deve-se, provavelmente, à presença dos componentes pertussis e VME de *Neisseria meningitidis* grupo B na formulação. Alternativas para a redução dessa pirogenicidade seriam realizar a combinação das vacinas meningocócicas com a vacina DTP acelular ou, ainda, combinar as vacinas contra meningites bacterianas (meningocócica B e

meningocócica C conjugada) e, durante o esquema de imunização, intercalar as doses da vacina DTP realizando, sempre, os testes apropriados;

- Os resultados obtidos pela metodologia proposta (ELISA) foram satisfatórios na avaliação da resposta imunológica a todos os componentes vacinais utilizados na combinação. Porém, foi impossível a comparação de tais resultados com a metodologia padrão.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarrategui-Garrido C, Martínez-Barricarte R, López-Trascasa M, Córdoba SR, Sánchez-Corral P. **Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome.** Blood 2009; 114(19): 4261-4271.

ACIP. **Poliomyelitis prevention in the United States.** Updated recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2000; 49(RR05):1–22.

———. **Update: vaccine side effects, adverse reactions, contraindications, and precautions.** Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 1996; 45(RR12):1–35.

Adu-Bobie J, Capecchi B, Serruto D, Rappuoli R, Pizza M. **Two years in reverse vaccinology.** Vaccine 2003; 21: 605-610.

Adams PW, Opremcak EM, Orosz CG. **Limiting dilution analysis of human, tetanus-reactive helper T lymphocytes. A rapid method for the enumeration of helper T lymphocytes with specificity for soluble antigens.** J Immunol Methods 1991; 13;142(2):231-41.

Adalja AA. **Polio: a tale of two vaccines.** Biosecur bioterr. 2011; 9(2): 87-88.

Agmon-Levi N, Paz Z, Israeli E, Shoenfeld Y. **Vaccine and autoimmunity.** Nature 2009; 5: 648-652.

Ahmed R, Gray D. **Immunological memory and protective immunity: understanding their relation.** Science 1996; 272, 54–60.

Allen A. **Vaccine politics.** Nature Medicine 2011; 17: 656.

American Academy of Pediatrics. **Pertussis**. In: Peter G, ed. 2000 Red book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2000. p.439-48.

Andersen BM, Solberg O. **Liberation of endotoxin during growth of *Neisseria meningitidis* in a chemically-defined medium**. Acta Pathol Microbiol Scand 1978; 86B(5): 275-281.

Andrade RV, Avelans ALSS, Correa CM, Melo CM, Defina JMP, Borges MG, PR Danião. **Vacinas: Novos Desafios Farmacêuticos**. Saúde em movimento 2003; 1(1): 55-59.

Andre FE. **What can be done to make vaccines more trendy?** Expert Rev. Vaccines 2005; 4(1): 23-25.

Arístegui J, O’Ryan M, López P, Istúriz RE, Castaneda ES, De Febres OC, Sáez-Llorens X, Bricks LF, Farhat CK, Arbo A, Cohrs DP, Contrini MM, Del Castillo JB, Prado V, Castillo-Solórzano C, Lepetic A, Lozano A, Ussher J, Vanadia P, Tregnaghi M, Graña G, Tregnaghi P, Calvari M, Barale S, Handal G, Ruttimann RW, Ambash G, Ayala SEG, Quirós ST, Moos S, Gentile A, Boetto L, Paez L, Mountford S, Quian J, Oselka G, Pírez MC, Picón T, Parra MM, Contreras JR, Andrus JK. **Manual de vacinas da América Latina**. Madrid: Euro RSCG Life Esquema; 2005. Cap.9: Calendários vacinais.

———. **Manual de vacinas da América Latina**. Madrid: Euro RSCG Life Esquema; 2005. Cap.8: Vacinações não sistemáticas.

Arko RJ. ***Neisseria gonorrhoeae*: experimental infection of laboratory animals**. Science 1977; 177: 1200-1201.

Arko RJ, Wong KH. **Comparative physical and immunological aspects of the chimpanzee and guinea-pig subcutaneous chamber models of *Neisseria gonorrhoeae* infection**. Br J Vener Dis 1977; 53: 101-105.

Armstrong EP. **Economic benefits and costs associated with target vaccinations**. JMCP 2007; 13(7): S12-S15.

Artenstein AW. **Smallpox**. Vaccines: a biography 2010; 9-29.

Azevedo MSP, Gonzalez AM, Yuan L, Jeong KI, Iosef C, Nguyen TV, Lovgren-Bengtsson K, Morein B, Saif LJ. **An oral versus intranasal prime/boost regimen using attenuated human rotavirus or VP2 and VP6 virus-like particles with immunostimulating complexes influences protection and antibody-secreting cell responses to rotavirus in a neonatal gnotobiotic pig model**. Clin Vaccine Immunol 2010; 17(3): 420-428.

Azevedo N. **Ciência e tecnologia em saúde no Brasil: a biotecnologia na Fiocruz** [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Universitário de Pesquisas do Rio de Janeiro; 2000.

Azevedo V, Oliveira SC. **Vacinas de DNA e Biosegurança.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 2001; 18: 46-48.

Babu MM, Bhargavi J, Saund RS, Singh SK. **Virulence factors of *Bordetella pertussis*.** Current science, 2001; 80(12): 1512-1522.

Bacharier LB, Geha RS. **Molecular mechanisms of IgE regulation.** J Allergy Clin Immunol. 2000; 105:S547-58.

Balla KM, Lugo-Villarino G, Spitsbergen JM, Stachura DL, Hu Y, Bañuelos K, Romo-Fewell O, Aroian RV, Traver D. **Eosinophils in the zebrafish: prospective isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants.** Blood 2010; 116: 3944-3954.

Balls, M. & Karcher, M. **The validation of alternative test methods.** ATLA 1995; 23: 884–886.

Balls M, Blaauboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B, Fielder RJ, Guillouzo A, Lewis RW, Lovell DP, Reinhardt CA, Repetto G, Sladowski D, Spielmann H, Zucco F. **Practical aspects of the validation of toxicity test procedures.** The report and recommendations of ECVAM workshop 5. ATLA 1995; 23: 129–147.

Banatvala J, Van Damme P, Oehen S. **Lifelong protection against hepatitis B: the role of vaccine immunogenicity in immune memory.** Vaccine 2001; 19, 877–885.

Barth T, Dalmora VJ, D'ávila FB, Dalmora SL. **Avaliação de pirogênios em produtos de uso veterinário pelos testes da hipertermia em coelhos e do lisado de amebócitos do *Limulus*.** Cienc Rural 2007; 37(1): 190-194.

Barile MF, Hardegree MC, Pittman M. **Immunization against neonatal tetanus in New Guinea. 3. The toxin neutralization test and the response of guinea pigs to the toxoids as used in the immunization schedule in new Guinea.** Bull WHO 1970; 43:453-459.

Bärnighausen T, Bloom DE, Canning D, Friedman A, Levine O, O'Brien J, Privor-Dumm L, Walker D. **The Economic Case for Expanding Vaccination Coverage of Children.**

Barreto ML, Teixeira MG, Bastos FI, Ximenes RAA, Barata RB, Rodrigues LC. **Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs.** The Lancet 2011; 377(9780): 1877-1889.

Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. **The role of complement in inflammation and adaptive immunity.** *Immunol Rev.* 2001; 180:5-15.

Bauch CT, Anonychuk AM, Effelterre TV, Pham B, Merid MF. **Incorporating herd immunity effects into cohort models of vaccine cost-effectiveness.** *Med. Decis. Making* 2009; 29(5): 557-569.

Baxby D. **Edward Jenner's role in the introduction of Smallpox vaccine.** *History of vaccine development* 2011; 13-19.

Begg NT, Miller E, Fairley CK, Chapel HM, Griffiths H, Waight PA, Ashworth LAE. **Antibody responses and symptoms after DTP and either tetanus or diphtheria *Haemophilus influenzae* type B conjugate vaccines given for primary immunization by separate or mixed injection.** *Vaccine* 1995; 13(16): 1547-1550.

Bell E. **Innate immunity: endothelial cells as sentinels.** *Nature reviews immunology* 2009; 9: 532-533.

Benchimol JL. **Manguinhos.** In: Benchimol JL (org) *Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada.* Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos-Editora Fiocruz, 2001a.

Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. **Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.** *Science* 2002; 298, 2199–2202.

Bhattacharya S, Brimnes N. **Introduction: Simultaneously Global and Local: Reassessing Smallpox Vaccination and Its Spread, 1789–1900.** *Bulletin of the History of Medicine* 2009; 83(1):1-16.

Bio-Manguinhos 2007. [Capturado em 20 de agosto de 2009] Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=156#>

_____. [Capturado em 17 de agosto de 2009] Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=210>.

Blom AM, Villoutreix BO, Dahlback B. **Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system?** *Mol. Immunol.* 2004; 40: 1333–1346.

Bonds MH, Rohani P. **Herd immunity acquired indirectly from interactions between the ecology of infectious diseases, demography and economics.** *J. R. Soc. Interface* 2010; 7(44): 541-547.

Bloom B. R. **New approaches to vaccine development.** *Rev Infect Dis* 1989; 11: 460-466.

Borrow R, Balmer P, Roper MH. **The immunological basis for immunization series. Module 3: Tetanus.** Immunization, Vaccines and Biologicals - World Health Organization 2006; 1-3.

Botto M, Fong KY, So AK, Barlow R, Routier R, Morley BJ, Walport MJ. **Homozygous hereditary C3 deficiency due to a partial gene deletion.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89(11):4957-4961.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, parte II, fascículo 5. 2003.

Breman JG, Wright GG, Levine L, Latham WC, Compaoré KP. **The primary serological response to a single dose of adsorbed tetanus toxoid, high concentration type.** Bull World Health Organ. 1981; 59(5): 745–752.

Bricks LF, Gomez FMS, Dias MHP. **Imunizações.** In: Isler H, Leone CCC, Marcondes E, org. O pediatra na Unidade Básica de Saúde. São Paulo: Sarvier; 1999. p. 90-114.

Bricks LF. **Vacina contra *Haemophilus influenzae* do tipo B (Hib).** Projeto diretrizes – Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Sociedade Brasileira de Pediatria; 2002. p.1-5.

Bromberg K, Tannis G, Steiner P. **Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection.** Infect Immun. 1991; 59(12): 4715-4719.

Brown F, Dougan G, Hoey EM, Martin SJ, Rima BK, Trudgett A. **Vaccine Design.** Chichester: John Wiley & Sons, 1993.

Bruge J, Bouveret-Le CN, Danve B, Rougon G, Schulz D. **Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionylated polysaccharide conjugate vaccine in adult, male volunteers.** Vaccine 2004; 22: 1087-1096.

Caille V, Bossi P, Grimaldi D, Vieillard-Baro A. **Physiopathology of severe sepsis.** Presse Med. 2004; 33:256-61.

Caroff M, Brisson JR, Martin A, Karibian D. **Structure of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin.** FEBS letters 2000; 477: 8-14.

Carvalho EG, Utiyama SRR, Kotze LMS, Reason ITM. **Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças.** Rev bras alerg imunopatol 2007; 30(5): 187-193.

Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Villen BJ. **B-cell anergy: from transgenic modelsto naturally occurring anergic B cells?** Nature 2007; 7: 633-643.

Campos M, Godson DL. **The effectiveness and limitations of immune memory: understading protective immune responses.** International Journal of Parasitology 2003; 33: 655-661.

CDC 2006. [Capturado em 03 de dezembro de 2009] Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/vacc-timeline.htm#50years>

Centers for Disease Control and Prevention. **National Immunization Program, Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.** 5th ed. Atlanta: Public Health Foundation; 1999. p.45-83.

_____. **Recommended childhood immunization schedule – United States, 2002.** MMWR 2002; 51:32-33.

Cerdeño-Tárraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MT, Pallen M, Bentley SD, Besra GS, Churcher C, James KD, De Zoysa A, Chillingworth T, Cronin A, Dowd L, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford KM, Thomson NR, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Parkhill J. **The complete genome sequence and analysis of Corynebacterium diphtheriae NCTC13129.** Nucleic Acids Res. 2003; 31(22): 6516-23.

Cheng LE, Greenberg PD. **Selective delivery of augmented IL-2 receptor signals to responding CD8⁺ T cells increases the size of the acute antiviral response and of the resulting memory T cell pool.** J. Immunol. 2002; 169, 4990–4997.

Cherry JD, Brunel PA, Golden GS, Karzon DT. **Report of the task force on pertussis immunization – 1988.** Pediatrics 1988; 81(6): 939–984.

Church, MA. **Evidence of whooping-cough-vaccine efficacy from the 1978 whooping-cough epidemic in Hertfordshire.** The Lancet 1979; 314(8135): 188–190.

Cohen H, Van Ramshorst JD, Tasman A. **Consistency in potency assay of tetanus in mice.** Bull WHO 1959; 20: 1133-1150.

Collier, RJ. **Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century.** Toxicon 2001; 39 (11): 1793-1803.

Cooke A, Zacccone P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW. **Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace?** Trends Parasitol. 2004; 20:316-21.

Corbel MJ. **Control testing fo combined vaccines: a consideration of potential problems and approaches.** Biologicals 1994; 22:353-360.

Crane DD, Warner SL, Bosio CM. **A novel role for plasmin-mediated degradation of opsonizing antibody in the evasion of host immunity by virulent, but not attenuated, *Francisella tularensis*.** J. Leukoc. Biol. 2010; 88:791-805

Crotty S, Ahmed R. **Immunological memory in humans.** Seminars in immunology 2004; 14, 197-203.

Dagan R. **Present and future of combined vaccines.** Vacunas 2005; 6:135-137.

D'Argenio DA, Wilson CB. **A decade of vaccines: integrating immunology and vaccinology for rational vaccine design.** Vaccine 2010; 33(4): 437-440.

Das REG, Brügger P, Patel M, Mistry Y, Poole S. **Monocyte activation test for pro-inflammatory and pyrogenic contaminants of parenteral drugs: test design and data analysis.** J Immunol Meth 2004; 288: 165– 177.

Dastur F, Awatramani V, Dixit JA. **Response to single dose of tetanus vaccine in subjects with naturally acquired tetanus antitoxin.** Lancet 1991; 2:219–221.

Daum RS, Jain A, Goldenstein AKP. **Combination vaccines: some practical considerations.** Combination vaccines and simultaneous administration. Ann NY Acad Sci 1995; 754: 383-87.

Debenedictis C, Joubeh S, Zhang G, Barria M, Ghohestani RF. **Immune functions of the skin.** Clin Dermatol. 2001; 19:573-85.

Decker MD, Edwards KM. **Issues in design of clinical trials of combination vaccines.** In: Williams JC, Goldenthal KL, Burns DL, Lewis Jr, editors. Combined Vaccines and simultaneous administration: Current Issues and Perspectives. Ann NY Acad Sci 1995; 754:234-40.

Demchenko YN, Glebov OK, Zingone A, Keats JJ, Bergsagel PL, Kuehl WM. **Classical and/or alternative NF- κ B pathway activation in multiple myeloma.** Blood 2010; 115 (7): 3541-3552.

Demotz S, Matricardi PM, Irle C, Panina A, Lanzavecchia A, Corradin G. **Processing of tetanus toxoid by human-presenting cells. Evidence of donor and epitope-specific processing pathways.** J immunol 1989; 143: 3881-3886.

Dhillon S, Keam SJ. **DTaP-IPV/Hib vaccine (Pentacel).** Pediatric drugs 2008; 10(6): 405-416.

Dias AASO. **Avaliação de métodos alternativos para controle de potência do componente pertussis da vacina DTP (vacina contra difteria, tétano e pertussis)**. Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2003.

Dietz V, Galazka A, van Loon F, Cochi S. **Factors affecting the immunogenicity and potency of tetanus toxoid: implications for the elimination of neonatal and non-neonatal tetanus as public health problems**. Bull World Health Organ. 1997; 75(1): 81-93.

Diken M, Kreiter S, Selmi A, Britten CM, Huber C, Türeci Ö, Sahin U. **Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation**. Gene therapy 2011; 18: 702-708.

Dong W, Ying W, You-ning L. **Activity of ciprofloxacin and azithromycin on biofilms produced in vitro by *Haemophilus influenzae***. Chin Med J 2009; 122(11): 1305-1310.

Dong VM, McDermott DH, Abdi R. **Chemokines and diseases**. Eur J Dermatol. 2003; 13:224-30.

Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver MA, Liu MA. **DNA vaccines**. Ann Rev Immunol 1997; 15: 617-647.

Dougan G, Gouling D, Hall LJ. **Live vaccines and their role in modern vaccinology**. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases 2011;1: 3-14.

Duclos P, Okwo-Bele JM, Gacic-Dobo M, Cherian T. **Global immunization: status progress, challenges and future**. BMC International Health and Human Rights 2009; 9(Suppl 1): S2.

Dular U. **Comparative studies of the *in vivo* toxin neutralization and the *in vitro* vero cell assay methods for use n potency testing of diphtheria component in combined vaccines/toxoids. 1: Standardization of a modified vero cell assay for toxin-antitoxin titration of immunized guinea-pig sera**. Biologicals 1993; 21: 53-59.

Dunkelbergen JR, Song WC. **Complement and its role in innate and adaptive immune responses**. Cell research 2010; 20:34-50.

ECDC. **Scientific panel on childhood immunisation schedule: Diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccination**. 2009.

Ebbert GB, Mascolo ED. **Vaccine manufacturing**. In: PLOTKIN, SA. et al. Vaccines. Philadelphia: Saunders, 2004. p. 53-67.

Ebong CE, Levy P. **Impact of the introduction of new vaccines and vaccine wastage rate on the cost-effectiveness of routine EPI: lessons from a descriptive study in a Cameroonian health district**. Cost Effectiveness and Resource Allocation 2011; 9:9

Eckmann L. **Tetanus: prophylaxis and therapy**. New York: Grune & Stratton Inc.;1963:50-53.

Edwards KM, Decker MD. **Combination Vaccines: Hopes and challenges**. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:345-7.

Ehreth J. **The value of vaccination: a global perspective**. *Vaccine* 2003; 21: 4105-4117.

EMA – European Medicines Agency. **Guideline on the replacement of the rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products**. CHMP 2009; 2-6.

Enders JF, Weller TH, Frederick Robbins C, Mortimer P. **Classic paper: How monolayer cell culture transformed diagnostic virology: a review of a classic paper and the developments that stemmed from it**. *Reviews in Medical Virology* 2009; 19(4): 241-249.

Enserink M. **What's next for disease eradication?** *Science* 2010; 330(6012): 1736-1739.

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. **Memory T cells and vaccines**. *Vaccine* 2003; 21, 419–430.

Exley C, Siesjö P, Eriksson H. **The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work?** *Trends Immunol* 2010; 31:103-109.

Faber J, Schuessler T, Finn A, Murdoch C, Zenz W, Habermehl P, Meyer CU, Zabel BU, Schmitt H, Zepp F, Knuf M. **Age-dependent association of human mannose-binding lectin mutations with susceptibility to invasive meningococcal disease in childhood**. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26(3):243-246.

Fagundez FD, Xavier AE, Medronho RA, Faço JLD, Xavier LL. **A study on the universal access to vaccines in Brazil**. *Pesqui. Oper.* 2009; 29(3): 591-603.

Fenner F. **Smallpox eradication: the vindication of Jenner's prophesy**. *History of vaccine development* 2011; 27-32.

Figuerola J, Andreoni J, Densen P. **Complement deficiency states and meningococcal disease**. *Immunol Res*. 1993; 12(3):295-311.

Finger H. **Die Bedeutung bakterieller Adjuvantien für die Ausbildung der anaphylaktischen Schockbereitschaft bei Maus und Ratte**. *Z. Hyg. Infektionskr* 1965; 151:248-290.

Finger H, Emmerling P, Brüss E. **Variable adjuvant activity of *Bordetella pertussis* with respect to the primary and secondary immunization of mice.** *Infect imm* 1970; 1(3): 251-258.

Finger H, Emmerling P, Schmidt H. **Accelerated and prolonged multiplication of antibody-forming spleen cells by *Bordetella pertussis* in mice.** *Experientia* 1967; 23:591-592.

Finger H, Emmerling P, Tusch H, Bredt W. **Einfluss von *Bordetella pertussis* auf das lymphatische gewebe von mausen. I1. Die beeinflussung der kinetik der antikörperbildung durch *Bordetella pertussis*.** *Z. Immunitätsforsch. Allergie Klin. Immunol.* 1968; 136:268-284.

Fleming DS, Greenberg L, Beith EM. **Use of combined antigens in immunization of infants.** *Can. Med. Ass. J.* 1948; 59:101-105.

França ISX, Simplício DN, Alves FP, Brito VRS. **Cobertura vacinal e mortalidade infantil em Campina Grande, PB, Brasil.** *Rev. Bras. Enferm.* 2009; 62(2): 258-271.

Frasca D, Riley RL, Blomberg BB. **Humoral immune response and B-cell functions including immunoglobulin class switch are downregulated in aged mice and humans.** *Sem immunol* 2005; 17: 378-384.

Frasch CE. **Meningococcal vaccines: past, present and future.** In: Cartwright K, editor. *Meningococcal disease.* Chichester: Wiley; 1995. p.245-84.

Freed GL, Katz SL, Clark SJ. **Safety of vaccinations: Miss America, the media, and public health.** *JAMA* 1996; 276:1869-72.

Furuichi K, Wada T, Kaneko S. **Involvement of inflammation in autoinflammation and autoimmune disease.** *Inflamm regen* 2011; 31 (1): 81-87.

Fukawasa LO, Dias WO, Schenkman RPF, Raw I, Tanizak MM. **Adjuvant can improve protection induced by OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroups B/C in neonatal mice.** *FEMS* 2004; 41: 205-210.

Galazka A, Milstein J, Zaffran M. World Health Organization. **Thermostability of vaccines.** 1998. WHO/GPV/98.07.

Garty BZ, Nitzan M, Danon YL. **Systemic meningococcal infections in patients with acquired complement deficiency.** *Pediatr Allergy Immunol.* 1993; 4(1): 6-9.

Gatchalian S, Palestroque E, De Vleeschauwer I, Han HH, Poolman J, Schuerman L, Doddelaere K, Boutriau D. **The development of a new heptavalent diphtheria tetanus-whole cell pertussis-hepatitis B *Haemophilus influenzae* type b-*Neisseria meningitidis* serogroups A and C vaccine: a randomized dose-ranging trial of the conjugate vaccine components.** *Int J Infect Dis* 2008; 12: 278-288.

Geddes, AM. **The history of smallpox.** *Clin Dermatol* 2006; 24: 152-57.

Geha RS, Schneeberger E, Rosen FS, Merler E. **Interaction of human thymus-derived and non-thymus-derived lymphocytes in vitro. Induction of proliferation and antibody synthesis in B lymphocytes by a soluble factor released from antigen-stimulated T lymphocytes.** *J Exp Med* 1973; 138(5): 1230–1247.

Gentile, Á. **Infección por *Bordetella pertussis*.** *Arch Argent Pediatr* 2010; 108(1):78-81.

Gidengil CA, Dutta-Linn MM, Messonier ML, Rusinak D, Lieu TA. **Financial barriers to the adoption of combination vaccines by pediatricians.** *Arch pediatr adolesc med* 2010; 164(12): 1138-1144.

Glenny AT, Stevens ME. **The laboratory control of tetanus prophylaxis.** *J Roy Army Med Corps* 1938; 70:308- 310.

Gluck R. **Combined vaccines – the european contribution.** *Biologicals* 1994; 22: 347-51.

Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Gotslich EC. **Immune Response of Human Infants to Polysaccharide Vaccines of Groups A and C *Neisseria meningitidis*.** *J Infect Dis* 1977; 136 (Supplement 1): S31-S35.

Goldblatt D, Richmond P, Millard E, Thornton C, Miller E. **The induction of immunologic memory after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate and acellular pertussis containing diphtheria, tetanus, and pertussis vaccine combination.** *J Infect Dis* 1999; 180: 538–41.

Goldenthal KL, Burns DL, McVittie LD, Lewis BP Jr, Williams JC. **Overview--combination vaccines and simultaneous administration. Past, present, and future.** *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 754: xi-xv.

Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. **Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies.** *J Exp Med.* 1969; 129(6):1307-1326.

_____. **Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity.** J. Exp. Med. 1969; 129: 1327-1348.

González S, Caballero E, Soria Y, Cobas K, Granadillo M, Pajón R. **Immunization with *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles prevents bacteremia in neonatal mice.** Vaccine 2006; 24: 1633–1643.

Gottlieb S, McLaughlin FX, Levine L, Latham WC, Edsall G. **Long term immunity to tetanus – a statistical evaluation and its clinical implications.** Am J Publ Hlth 1964;54:961-971.

Grabestein JD. **Toxoid vaccines.** Vaccines: a biography 2010; 105-124.

Granoff DM, Welsch JA, Ram S. **Binding of Complement Factor H (fH) to *Neisseria meningitidis* is specific for human fH and inhibits Complement activation by rat and rabbit sera.** Infection and Immunity 2009; 77(2): 764-769.

Granoff DM. **Relative importance of complement-mediated bactericidal and opsonic activity for protection against meningococcal disease.** Vaccine 2009; 27: B117-B125.

Greco M. **The future of vaccines: an industrial perspective.** Vaccine 2002; 20: 101-103.

Greenberg L, Fleming DS. **Increased efficiency of diphtheria toxoid when combined with pertussis vaccine; preliminary note.** Can. J. Public Health 1947; 38:279-282.

_____. **The immunizing efficiency of diphtheria toxoid when combined with various antigens.** Can. J. Public Health 1948; 39:131-135.

Greenfield RA, Bronze MS. **Emerging pathogens and knowledge in infectious diseases.** American Journal of the Medical Sciences 2010; 340(3): 177-180.

Guérin, N. **Histoire de la vaccination: de l'empirisme aux vaccins recombinants.** Rev Méd Interne 2007; 28:3-8.

Gupta KR, Anderson R, Cecchini D, Rost B, Xu J, Gendreau K, Saroff DL, Marchant C, Siber GR. **Evaluation of a guinea pig model to assess interference in the immunogenicity of different components of a combination vaccine comprising diphtheria, tetanus and acellular pertussis (DTaP) vaccine and *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugate vaccine.** Biologicals 1999; 27:197-76.

Gupta RK. **ELISA for titration of antibodies to tetanus toxoid in sera of immunized guinea pigs as an alternative to the toxin neutralization test in mice.** J Immunol Meth 1995; 179(2): 277-279.

Gupta RK, Maheshwari SC, Singh H, **The titration of tetanus antitoxin IV. Studies on the sensitivity and reproducibility of the toxin neutralization test.** J Biol Stand 1985; 13: 143-149.

Halperin SA, Smith B, Russell M, Scheifele D, Mills E, Hasselback P, Pim C, Meekison W, Parker R, Lavigne P, Barreto L. **Adult formulation of a five component acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids and inactivated poliovirus vaccine is safe and immunogenic in adolescents and adults.** Pediatr Infect Dis J. 2000; 19(4): 276-83.

Hallström T, Zipfel PF, Blom AM, Lauer N, Forsgren A, Riesbeck K. **The Human Complement Inhibitor Haemophilus influenzae interacts with Factor H.** J. Immunol. 2008; 181:537-545.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR. **Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.** 2005. Nature Immunology 6 (11): 1123-32.

Hartung T, Aaberge I, Berthold S, Carlin G, Charton E, Coecke S, Fennrich S, Fischer M, Gommer M, Halder M, Haslov K, Jahnke M, Montag-Lessing T, Poole S, Schechtman L, Wendel A, Werner-Felmayer G. **Novel pyrogen tests based on the human fever reaction.** The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 43. ATLA 2001; 29: 99-123.

Henderson DA. **The miracle of vaccination.** Notes rec R Soc Lond 1997; 51 (2): 235-245.

Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. **Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group.** Lancet. 1999; 353(9158):1049-1053.

Hochman G. **Vacinação, varíola e uma cultura da imunização no Brasil.** Ciênc. Saúde coletiva 2011; 16(2): 375-386.

Holers VM, Thurman JM. **The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting.** Mol Immunol 2004; 41: 147-152.

Holmes R. **Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene.** J Infect Dis. 2000; 181 (Suppl 1):S156-67.

Homma A. **The Brazilian manufacturers' perspective and its current status.** *Biologicals* 2009; 37(3): 173-176.

Homma A, Martins RM, Leal MLF, Freire MS, Couto AR. **Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica.** *Ciência & Saúde Coletiva* 2011; 16 (2): 445-458.

Homma A, Leal MLF, Moreira MS, Pina FO, Baetas RBG, Pizarro APB, Couto AR. **Desenvolvimento e produção de vacinas no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fiocruz.** In: *Vacinas, soros e imunizações no Brasil.* Buss, Paulo Marchiori; Temporão, José Gomes; Carneiro, José da Rocha. *Vacinas, soros & imunizações no Brasil.* Rio de Janeiro, Fiocruz, 2005. p.349-378.

Homma A, Martins RM, Leal MLF, Freire MS, Couto AR. **Atualizações em vacinas, imunizações e inovação tecnológica.** *Cienc saúde coletiva* 2011; 16(2): 445-458.

Hong HA, Ke NT, Nhon TN, Thinh ND, van der Gun JW, Hendriks JT, Kreeftenberg JG. **Validation of the combined toxin-binding inhibition test for determination of neutralizing antibodies against tetanus and diphtheria toxins in a vaccine field study in Viet Nam.** *Bull WHO* 1996; 74(3): 275-282.

IFPMA – International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations. [Capturado em 02 de novembro de 2009] Disponível em: <<http://www.ifpma.org/documents/NR60/Value%20of%20Vaccines.pdf>>

Igietseme JU, Eko FO, He Q, Black CM. **Combination vaccines: design strategies and future trends.** *Expert Rev Vaccines* 2006; 5(6): 739-745.

Inoshita H, Matsushita M, Koide S, Kusaba G, Ishii M, Onda K, Gi MJ, Nakata M, Ohsawa I, Horikoshi S, Ohi H, Tomino Y. **A novel measurement method for activation of the lectin complement pathway via both mannose-binding lectin (MBL) and L-ficolin.** *J Immunol Meth* 2009; 349(1-2): 9-17.

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2007. **Vacina combinada contra DTP e Hib – bula.** Rio de Janeiro; [Capturado em 17 ago. 2009] Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/interna/pdf/bmdco_060_05bdtpehib.pdf

_____. **Vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) – bula.** Rio de Janeiro; [Capturado em 17 ago. 2009] Disponível em: http://www.fiocruz.br/bio_eng/media/bulas/vacinas/BM_030_04B%20Hib%20190215.pdf

Isacson J, Trollfors B, Lagergard T, Taranger J. **Comparison of a toxin neutralization assay and ELISA for determination of pertussis toxin antibodies.** *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease* 1997; 8:163-167.

Iwasaki A, Medzhitov R. **Regulation of adaptative immunity by the innate immunity.** Science 2010; 327(5963): 291-295.

Jackson SP, Bartek J. **The DNA-damage response in human biology and disease.** Nature 2009; 461: 1071-1078.

Janeway CA Jr. **How the immune system protects the host from infection.** Microbes Infect. 2001; 3:1167-71.

Jastaneiah S. **Smallpox: an eradicated infection with persistent sequels – case report and a brief on smallpox.** Saudi Journal of Ophthalmology 2009; 23(2): 171-173.

Jatana SK, Nair MNG. **Combination vaccines.** MJAFI 2007; 63 : 167-171.

Jennings HJ, Lugowski C. **Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates.** J Immunol 1981; 127: 1011-1018.

Jessouroun E, Silveira IFB, Larangeira AP, Pereira S, Fernandes SA, Rabinovitch L, Frasch CE, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. **Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent N. meningitidis serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock.** Vaccine 2004; 22: 2617–2625.

Jivapisarnpong T. **Combined vaccines – case study.** Biologicals 2009; 37(6): 416-423.

Joiner KA. **Complement evasion by bacteria and parasites.** Annu. Rev. Microbiol. 1988; 42: 201–230.

Kabilan L, Andersson G, Lolli F, Ekre H , Olsson T, Troye-Blomberg M. **Detection of intracellular expression and secretion of interferon- γ at the single-cell level after activation of human T cells with tetanus toxoid *in vitro*.** European Journal of Immunology 1990; 20(5): 1085-1089.

Kaech SM., Ahmed R. **Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells.** Nat. Immunol. 2001; 2, 415–422.

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. **Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development.** Nat. Rev. Immunol. 2002; 2, 251–262.

Kalil J, Cunha-Neto E, Guilherme L. **Novas Estratégias de Vacinas**. Gazeta Médica da Bahia 2008; 78 (1): 65-71.

Kano FS, Vidotto O, Vidotto MC. **Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária**. Semina: Cien Agrar 2007; 28(4): 709-726.

Karakus R, Caglar K, Aybay C. **Evaluation of human antibody responses to diphtheria toxin subunits A and B in various age groups**. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 1065-1071.

Kaufmam SHE. **Immunity to intracellular bacteria**. Ann Rev Immunol 1991; 9:745- 772.

Khatami A, Pollard AJ. **The epidemiology of meningococcal disease and the impact of vaccines**. Expert reviews of vaccines 2010; 9(3): 285-298.

Katz SL. **John F. Enders and measles virus vaccine – a reminiscence**. Current topics in microbiology and immunology 2009; 329:3-11.

Katz SL, Wilfert CM, Robbins FC. **The role of tissue culture in vaccine development**. History of vaccine development 2011; 145-149.

Kidd S, Goodson JL, Aramburu J, Morais A, Gaye A, Wannemuehler K, Buffington J, Gerber S, Wassilak S, Uzicanin A. **Poliomyelitis outbreaks in Angola genetically linked to India; risk factors and implications for prevention of outbreaks due to wild poliovirus importations**. Vaccine 2011; 29(21): 3760-3766.

Kimmel SR, Burns IT, Wolfe RM, Zimmerman RK. **Addressing immunization barriers, benefits, and risks**. J Fam Practice 2007; 56(2): S61-S69.

Kind LS. **Relationship of anaphylaxis sensitizing and adjuvant properties of *Hemophilus pertussis* vaccine**. J. Immunol. 1957; 79:238-242.

Kniker WT, Lesourd BM, McBryde JL, Corriel RN. **Cell-mediated immunity assessed by Multitest CMI skin testing in infants and preschool children**. Am J Dis Child. 1985; 139(8):840-845.

Koch N, Jung M, Sabat R, Krätzschmar J, Döcke WD, Asadullah K, Volk HD, Grütz G. **IL-10 protects monocytes and macrophages from complement-mediated lysis**. JEM 2010; 207:1307-1319.

Kozbor D, Trinchieri G, Monos DS, Isobe M, Russo G, Haney JA, Zmijewski C, Croce CM. **Human TCR- ψ^+ / Σ^+ , CD8⁺ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion**. J. Exp. Med. 1989; 169: 1847-1851.

Kristiansen M, Aggerbeck H, Heron I. **Improved ELISA for determination of anti diphtheria and/or anti-tetanus antitoxin antibodies in sera.** APMIS 1997; 105(7-12): 843-853.

Krumina A, Logina I, Donaghy M, Rozentale B, Kravale I, Griskevica A, Viksna L. **Diphtheria with polyneuropathy in a closed community despite receiving recent booster vaccination.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005; 76(11): 1555–1557.

Kugelberg E, Gollan B, Tang CM. **Mechanisms in *Neisseria meningitidis* for resistance against complement-mediated killing.** Vaccine 2008; 26 Suppl 8:134-9.

Kumar H, Kawai T, Akira S. **Toll-like receptors and innate immunity.** Biochemical and Biophysical Research Communications 2009; 388(4): 621-625.

Kwok R. **Vaccines: the real issues in vaccine safety.** Nature 2011; 473: 436-438.

Lahiri DC. **Absence of specific antitoxin in persons exposed to risk of tetanus infection.** The Indian Journal of Medical Research 1939; 27:581–583.

Lambrecht BN, Kool M, Willart MAM, Hammad H. **Mechanism of action of clinically approved adjuvants.** Curr Opin Immunol. 2009; 21(1): 23-29.

Lanzavecchia A. **Antigen presentation by B lymphocytes: a critical step in T-B collaboration.** Curr Top Microbiol Immunol 1986; 130: 65–78.

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.

Lei QP, Shannon AG, Heller RK, Lamb DH. **Quantification of free polysaccharide in meningococcal polysaccharide–diphtheria toxoid conjugate vaccines.** Dev Biol Basel Karger 2000; 103:259-264.

Lequin, RM. **Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).** Clin Chem 2005; 51(12): 2415–2418.

Levin, M.J. (2008). **Zoster vaccine.** In Vaccines, S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, and P.A. Offit, eds. (Philadelphia, PA: Elsevier Inc), pp. 1057–1068.

Leung AKC. **“Variolation” and vaccination in late Imperial China, Ca 1570-1911.** History of vaccine development 2011; 5-12.

Llop FAM, Bermúdez JM. **Vacunas combinadas.** Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26 Supl 1:56-64.

Lopes CRC, Berezin EN. **Fatores de risco e proteção à infecção respiratória aguda em lactentes.** Ver saúde pública 2009; 43(6): 1030-1034.

Luke J, Carnes AE, Hodgson CP, Williams JA. **Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system.** Vaccine 2009; 27(46): 6424-6459.

Lutz HU, Fumia S, Schurtenberger C, Alaia V. **Stimulation of complement amplification or activation of the alternative pathway of complement?** Mol immunol 2007; 44: 3862-865.

Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. **Mecanismos de resposta imune às infecções.** An bras Dermatol 2004; 79(6):647-664.

MacLennan R. **Prevention of neonatal tetanus in developing countries.** In: Proceedings of the sixth international conference on tetanus, Lyon, France, 3–5 December 1981. Lyon, Fondation Merieux: 113–121.

MacLennan R, Schofield FD, Pittman M, Hardegree MC, Barile MF. **Immunization against neonatal tetanus in New Guinea. Antitoxin response of pregnant women to adjuvant and plain toxoids.** Bull World Health Organ. 1965; 32(5): 683–697.

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

Malone KM, Hinman AR. **Vaccination Mandates: The public health imperative and individual rights.** In: Law and Public Health Practice Second Edition. Goodman RA. Ed. Londres: Oxford University press, 2007.

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.** 5th ed. New York: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005.

Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. **Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.** J Exp Med. 1993 Apr 1;177(4):1199-204.

Manual de Normas de Vacinação. Ministério da Saúde. 3ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001.p. 29-30.

Marin M, Broder KR, Temte JL, Snider DE, Seward JF. **Use of combination measles, mumps, rubella, and varicella vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).** MMWR Recomm Rep. 2010; 59(RR-3):1-12.

Marrack P, McKee AS, Munks MW. **Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium.** Nature 2009; 9:287-293.

Marrack, P.; Kappler, J. W. **Subversion of the immunity system by pathogens.** Cell 1994; 76: 323-332.

Marshall GS, Marchant CD, Blatter M, Friedland LR, Aris E, Miller J. **Co-administration of a novel Haemophilus influenzae type b and Neisseria meningitidis serogroups C and Y tetanus toxoid conjugate vaccine does not interfere with the immune response to antigens contained in infant vaccines routinely used in the United States.** Land Biosc 2011; 7(2): 258-264.

Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y. **T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity.** 2009. Immunity 31 (5): 787-98.

Martins RM, Camacho LAB, Marcovitz R, Noronha TG, Maia MLS, Santos EM, Barbosa GG, Silva AMV, Souza PCNF, Lemos MCF, Homma A. **Immunogenicity, reactogenicity and consistency of production of a Brazilian combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis and Haemophilus influenza type b.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103(7): 711-718.

Matzkin H, Regev S. **Naturally acquired immunity to tetanus toxin in an isolated community.** Infect Imm 1985; 48:267-268.

Mayer S, Laumer M, Mackensen A, Andreesen R, Krause SW. **Analysis of the immune response against tetanus toxoid: enumeration of specific T helper cells by the Elispot assay.** Immunobiology 2002; 205(3):282-289.

McAleer JP, Liu B, Li Z, Ngoi SM, Dai J, Oft M, Vella AT. **Potent intestinal Th17 priming through peripheral lipopolysaccharide-based immunization.** J Leukoc Biol. 2010; 88:21-31.

McKee AS, MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P. **Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge?** BMC Biology 2010;8: 37-46.

McVernon J, Mitchison NA, Moxon ER. **T helper cells and efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccination.** Lancet Infect Dis 2004; 4: 40–43.

Mello MLR, Moraes JC, Barbosa HA, Flannery B. **Participação em dias nacionais de vacinação contra poliomielite: resultados de inquérito de cobertura vacinal em crianças nas 27 capitais brasileiras.** Rev. bras. epidemiol. 2010; 13 (2): 278-288.

Menon PS, Sahai G, Joshi VB, Murthy RG, Boparai MS, Thomas AK. **Field trial on frozen and thawed tetanus toxoid.** Indian J Med Res. 1976; 64(1):25-32.

Mills KHG. **Immunity to *Bordetella pertussis*.** Micr Infect 2001; 3 (8):655-677.

Mills KHG, 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. Immun. 1998; 66: 594–602.

Mills KH, McGuirk P. **Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection.** Semin Immunol. 2004; 16:107-17.

Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : 2005.

Minor P. **Vaccine-derived poliovirus (VDPV): impact of poliomyelitis eradication.** Vaccine 2009; 27(20): 2649-2652.

Mitchison A. **Latent help to and from H-2 antigens.** Eur J Immunol. 1992; 22(1):123-7.

Miyoshi M, Yoshizumi S, Jinushi M, Ishida S, Okui T, Okano M, Shouji M, Tanaka S, Saigusa J, Mori A, Tanabe H, Yamaguchi R, Nishimura Y, Shimizu H. **A case of paralytic poliomyelitis associated with poliovirus vaccine strains in Hokkaido, Japan.** Jpn J Infect Dis. 2010;63(3):216-217.

Moraes JC, Luna EJA, Grimaldi RA. **Imunogenicidade da vacina brasileira contra Hepatite B em adultos.** Rev Saúde Pública 2010; 44: 353-359.

Moreira MS. **Política de Imunização no Brasil: processo de introdução de novas vacinas** [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP); 2002.

Morgan AJ, Parker S. **Translational mini-review series on vaccines: the Edward Jenner museum and the history of vaccination.** Clin Exp Immunol. 2007; 147: 389-94.

Mortimer EA, Wharton M. **Diphtheria toxoid.** In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999. p.140-57.

Mosmann TR, Coffman RL. **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.** Annu Rev Immunol. 1989; 7:145-73.

Mothershed EA, Cassiday PK, Pierson K, Mayer LW, Popovic T. **Development of a Real-Time Fluorescence PCR Assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene.** Journal of Clinical Microbiology 2002; 40 (12): 4713-4719.

Munoz J. **Comparison of *Bordetella pertussis* cells and Freund's adjuvant with respect to their antibody inducing and anaphylactogenic properties.** J. Immunol. 1963; 90:132-139.

Munoz J, Bergman RR. **Histamine-sensitizing factors from microbial agents, with special reference to *Bodetella petussis*.** Bacteriol. Rev. 1968; 32:103-126.

Nakao H, Popovic T. **Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene.** Journal of Clinical Microbiology 1997; 35:1651–1655.

Namur JAM. **Toxóide diftérico: nova roupagem para uma vacina tradicional** [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

Nascimento-Carvalho CM, de Andrade ALS. **Vacinação contra *Haemophilus influenzae* tipo b: proteção a longo prazo.** J Pediatr 2006; 82(3): S109-S114.

Nasir A. **Nanotechnology in vaccine development: a step forward.** Journal of Investigative Dermatology 2009; 129:1055-1059.

National Immunization Program Centers for Disease Control and Prevention. **Epidemiology and Prevention of Vaccine – Preventable Diseases: Tetanus.** The Pink Book, 8th edition, January 2004: 65-73.

Novartis Vaccines and Diagnosticis Limited. Influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccine. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm182242.pdf>. Acesso em 26/26/2010.

Novotny P, Broughton ES, Cownley K, Hughes M, Turner WH. **Strain related infectivity of *Neisseria gonorrhoeae* for the guinea-pig subcutaneous chamber and the variability of the immune resistance in different breeds of guinea-pig.** Brit J Vener Dis 1978; 54: 88-96.

Nutt SL, Tarlinton DM. **Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends?** Nature 2011; 12(6): 472-477.

O'Hagan DT, Tsai T, Reed S. **Emulsion-based adjuvants for improved Influenza vaccines.** Birkhäuser Advances in Infectious Diseases, 2011; 2: 327-357.

Ohuabunwo C, Perevoscikovs J, Griskevica A, Gargiullo P, Brilla A, Viksna L, Glismann S, Wharton M, Vitek C. **Respiratory diphtheria among highly vaccinated military trainees in Latvia: improved protection from DT compared with Td booster vaccination.** Scand J Infect Dis. 2005; 37(11-12): 813-20.

Østergaard L, Lebacqz E, Poolman J, Maechlerand G, Boutriau G. **Immunogenicity, reactogenicity and persistence of meningococcal A, C, W-135 and Y-tetanus toxoid candidate conjugate (MenACWY-TT) vaccine formulations in adolescents aged 15–25 years.** Vaccine 2009; 27(1): 161-168.

Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S. **Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 4538-4542.

Parkman PD. **Combined and simultaneously administered vaccines.** A brief history. Combination vaccines and simultaneous administration. Annals of the New York Academy of Sciences 1995; 754:1-9.

Pasare C, Medzhitov R. **Toll-like receptors and acquired immunity.** Semin Immunol. 2004; 16:23-6.

Pearson FC. **Pyrogens: endotoxins, LAL testing, and depyrogenation.** New York: Marcel Dekker, 272 p., 1985.

Peel MM. **Measurement of tetanus antitoxin. II. Toxin neutralization.** J Biol Stand 1980; 8:191-207.

Peleg D, Harit-Bustan H, Katz Y, Peller S, Schlesinger M, Schonfeld S. **Inherited C3 deficiency and meningococcal disease in a teenager.** Pediatr Infect Dis J. 1992; 11(5): 401-404.

Pereira AC. **Coqueluche.** In: Tavares W, Marinho LA. Editors. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 1st Ed. São Paulo: Atheneu; 2005.cap.30.p.205-213.

Pérez-Melgosa M, Ochs HD, Linsley PS, Laman JD, van Meurs M, Flavell RA, Erst RK, Miller SI, Wilson CB. **Carrier-mediated enhancement of cognate T cell help: the basis of enhanced immunogenicity of meningococcal outer membrane protein polysaccharide conjugate vaccine.** Eur J Immunol 2001; 31: 2373-2381.

Perkins BA, Jonsdottir K, Briem H, Griffiths E, Plikaytis BD, Hoiby EA, Rosenqvist E, Holst J, Nokleby H, Sotolongo F, Sierra G, Campa HC, Carlone GM, Williams D, Dykes J, Kapczynski D, Tikhomirov E, Wenger JD, Broome CV. **Immunogenicity of two efficacious outer membrane protein-based serogroup B meningococcal vaccines among young adults in Iceland.** *J Infect Dis.* 1998; 177(3): 683-691.

Pichichero ME. **New combination vaccines.** *PCNA* 2000; 47: 395-406.

Pichichero ME. **Consider vaccine cost-effectiveness.** *Pediatric news* 2009; 43(11): 11.

Pollard AJ, Frasch C. **Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*.** *Vaccine* 2001; 19: 1327-1346.

Poirier B, Variot P, Delourme P, Maurin J, Morgeaux S. **Would an in vitro ELISA test be a suitable alternative potency method to the *in vivo* immunogenicity assay commonly used in the context of international Hepatitis A vaccines batch release?** *Vaccine* 2010; 28: 1796–1802.

Pöulabauer EM, Perterman R, Ehrlich HJ. **The influence of carrier protein on the immunogenicity of simultaneously administered conjugate vaccines in infants.** *Vaccine* 2009; 27: 1674-1679.

Prins JM, Lauw FN, Derkx BH, Speelman P, Kuijper EJ, Dankert J, van Deventer SJ. **Endotoxin release and cytokine production in acute and chronic meningococcaemia.** *Clin Exp Immunol.* 1998; 114(2):215-9.

Pugliese MV, Tura LFR, Andreazzi MFS. **Mães e vacinação das crianças: estudo de representações sociais em serviço público de saúde.** *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.* 2010; 10 (1): 75-84.

Puledran B, Ahmed R. **Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development.** *Cell* 2006; 124, 849-863.

Pulendran B, Ahmed R. **Immunological mechanisms of vaccination.** *Nature immunology* 2011; 12:509-517.

Quakyi EK, Hochstein HD, Tsai CM. **Modulation of the biological activities of meningococcal endotoxins by association with outer membrane proteins is not inevitably linked to toxicity.** *Infect Immun.* 1997; 65(5):1972-1979.

Ragupathi G, Gardner JR, Livingston PO, Gin DY. **Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer.** *Exp. Rev. Vaccines* 2011; 10(4): 463-470.

Ramanathan MP, Kutzler MA, Kuo YC, Yan J, Liu H, Shah V, Bawa A, Selling B, Sardesai NY, Kim JJ, Weiner DB. **Coimmunization with an optimized IL15 plasmid adjuvant enhances humoral immunity via stimulating B cells induced by genetically engineered DNA vaccines expressing consensus JEV and WNV E DIII.** *Vaccine* 2009; 27(32): 4370-4380.

Ramsay ME, Farrington CP, Miller E. **Age-specific efficacy of pertussis vaccine during epidemic and non-epidemic periods.** *Epidemiol Infect* 1993; 111:41-48.

Rappuoli R, Black S, Lambert PH. **Vaccine discovery and translation of new vaccine technology.** *The Lancet* 2011; 378 (9788): 360-368.

Ray SN, Ray K, Grover SS, Sharma RS, Sharma SP. **Sero-survey of diphtheria and tetanus antitoxin.** *Indian J Med Res.* 1978; 68:901-904.

Reacher M, Ramsay M, White J, De Zoysa A, Efstratiou A, Mann G, Mackay A, George RC. **Nontoxicogenic corynebacterium diphtheriae: an emerging pathogen in England and Wales?** *Emerg Infect Dis.* 2000; 6(6):640-5.

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

Remembering things past. *Nature immunology* 2011; 12(6): 461.

Report from the PHLS Epidemiological Research Laboratory and 21 area health authorities. **Efficacy of pertussis vaccination in England.** *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 1982; 285: 357–359.
gene. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181(Suppl. 1):S156–S167.

Rey M. **Discussion.** In: Proceedings of the sixth international conference on tetanus, Lyon, France, 3–5 December 1981. Lyon, Fondation Merieux, 178.

Riedel, S. **Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination.** *BUMC proceedings* 2005; 18: 21-25.

Rigano MM, Manna C, Giulini A, Vitale A, Cardi T. **Plants as biofactories for the production of subunit vaccines against bio-security-related bacteria and viruses.** *Vaccine* 2009; 27(25-26): 3463-3466.

Risi Júnior JB. **A produção de vacinas é estratégica para o Brasil.**, entrevista concedida a Carlos Fidelis Ponte. *História, Ciências, Saúde. Manguinhos* 2003; 10 (2): 771-783.

Robbins JB, Schneerson R, Trollfors B, Sato H, Sato Y, Rappuoli R, Keith JM. **The diphtheria and pertussis components of diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine should be genetically inactivated mutant toxins.** J Infect Dis. 2005; 191(1):81-8. Epub 2004.

Robbins JB, Schneerson R, Szu SC, Pozgay V. **Polysaccharide-protein conjugate vaccines.** Hist vac development 2011; 91-102.

Rodrigues Júnior JM, Lima KM, Castelo AAM, Martins LDB, Santos SAS, Faccioli LH, Silva CL. **É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose?** J Bras Pneumol 2004; 30: 468-477.

Rodriguez T, Lastre M, Cedré B, del Campo J, Bracho G, Zayas C, Taboada C, Diaz M, Sierra G, Pérez O. **Standardization of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Colorimetric Serum Bactericida Assay.** Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9(1): 109–114.

Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. **Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis.** APMIS. 2003; 111:725-40.

Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. **Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada.** J Clin Microbiol. 2006; 44(5):1625-1629.

Rosenberg AS, Yang JC, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Schwarz SL, Morton KE, Laurencot CM, Sherry RM. **Different adjuvanticity of incomplete Freund's adjuvant derived from beef or vegetable components in melanoma patients immunized with a peptide vaccine.** J Immunoth 2010; 33(6):626-629.

Roskamp L, Pegoraro M, Luz PR, Crestani S, Vaz RS. **Uma revisão sobre receptores opsônicos e não opsônicos.** RUBS 2005; 1(3): 12-16.

Ross AK, Eriksson F, Walters DC, Pisa P, King AD. **Optimization of skin electroporation in mice to increase tolerability of DNA vaccine delivery to patients.** Molec ther 2009; 17(9): 1637-1642.

Rowley DA, Fitch FW, Mosier DE, Solliday S, Coppleson L.W, Brown BW. **The rate of division of antibody-forming cells during the early primary immune response.** J. Exp. Med. 1968; 127:983-1002.

Rydell N, Sjöholm I. **Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvants.** Vaccine 2004; (9-10): 1265-1274.

Rydell N, Sjöholm I. **Mucosal vaccination against diphtheria using starch microparticles as adjuvant for cross-reacting material (CRM197) of diphtheria toxin.** Vaccine 2005; 23:2775–2783.

Sabbatini F, Bandera A, Ferrario G, Trabattoni D, Marchetti G, Fransetti F, Clerici M, Gori A. **Qualitative immune modulation by interleukin-2 (IL-2) adjuvant therapy in immunological non responder HIV-infected patients.** PLoS ONE 2010; 5(11): 1-6.

Sacchi CT, Tondella MLC, Brandileone MCC, Melles CEA, Paula MDN. ***Corynebacterium diphtheriae* isolada de sangue.** Rev. Inst. Adolfo Lutz 1985; 45(1/2): 73-79.

Sáfadi MAP, Barros AP. **Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações.** J. Pediatr. (Rio J.) 2006; 82(3):s34-s35.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.** J Immunol. 1995; 155(3):1151-1164.

Salusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. **From vaccines to memory and back.** Immunity 2010; 33, 451-463.

Sánchez S, Troncoso G, Criado MT, Ferreirós C. **In vitro induction of memory-driven responses against *Neisseria meningitidis* by priming with *Neisseria lactamica*.** Vaccine 2002; 20(23-24):2957-2963.

Saukkonen K, Cabellos C, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E. **Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization.** JEM 1991; 173(5): 1143-1149.

Schatzmayr HG. **Novas perspectivas em vacinas virais.** História, Ciências, Saúde – Manguinhos 2003;10(2): 655-669.

Scheerlinck JPY, Yen HH. **Defining immune memory resilience: implications for vaccine development.** Expert Ver. Vaccines 2010; 9(4), 351-353.

Scheifele D, Halperin S, Ferguson A. **Assessment of injection site reactions to an acellular pertussis-based combination vaccine, including novel use of skin tests with vaccine antigens.** Vaccine 2001; 19:4720–4726.

Scheifele DW, Halperin SA, Ochnio JJ, Ferguson AC, Skowronski DM. **A modified vaccine reduces the rate of large injection site reactions to the preschool booster dose of diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine: results of a randomized, controlled trial.** Pediatr Infect Dis J. 2005; 24(12): 1059-66.

Scheifele DW, Ochnio JJ. **The immunological bases for immunization series. Module 2: Diphtheria.** Immunization, vaccines and biological – World Health Organization, Update 2009.

Schvartz, I., D. Seger, and S. Shaltiel. **Vitronectin**. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999; 31: 539–544.

Segal S, Pollard AJ. **Vaccines against bacterial meningitis**. *Brit Med Bull* 2005; 72(1):65-81.

Sette A, Rappuoli R. **Reverse vaccinology: developing vaccines in the Era of Genomics**. *Immunity* 2010; 33(4): 530-541.

Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, Singh M, O'Hagan D, Pétrilli V, Tschopp J, O'Neill LAJ, Lavelle EC. **Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome**. *PNAS* 2009; 106(3): 80-875.

Sidey FM, Furman BL, Wardlaw AC. **Effect of hyperreactive to endotoxin on the toxicity of pertussis vaccine and pertussis toxin in mice**. *Vaccine* 1989; 7(3): 237-241.

Siegrist, C.A. (2008). **Vaccine immunology**. In *Vaccines*, S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, and P.A. Offit, eds. (Philadelphia, PA: Elsevier Inc), pp. 17–36.

Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, Rico CO, Rodriguez CR, Terry MH. **Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba**. *NIPH Ann.* 1991; 14(2):195-207; discussion 208-10.

Silva AT, Fuentes MS, Rodriguez R, Mayoral M, Mayorga Ca, Blanca M. **Reacção Anafiláctica ao Toxóide Tetânico**. *Rev Port Imunoalergologia* 2005; 13(1):89-93.

Silveira IAFB, Bastos RC, Neto MS, Laranjeira AP, Assis EF, Leal ML, Silva WC, Peralta JM, Jessouroun E. **Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid**. *Vaccine* 2007; 25(41): 7261-7270.

Simondon F, Preziosi MP, Yam A, Kane CT, Chabirand L, Iteaman I, et al. **A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal**. *Vaccine* 1997; 15:1606-12.

Simonsen O, Badsberg JH, Kjeldsen K, Moller-Madsen B, Heron I. **The fall-off in serum concentration of tetanus antitoxin after primary and booster vaccination**. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1986; 94:77-82.

Simonsen O. **Vaccination against tetanus and diphtheria: evaluations of immunity in the Danish population, guidelines for revaccination, and methods for control of vaccination programs**. *Dan Med Bull* 1989; 36: 24-47.

Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações. [Capturado em 01 de Janeiro de 2010] Disponível em: <http://pni.datasus.gov.br/apresentacao.asp>

Slütter B, Bal SM, Zhi D, Jiskoot W, Bouwstra JA. **Adjuvant effect of cationic liposomes and CpG depends on administration route.** J Contr Rel 2011; *In press*.

Smith PG. **Concepts of herd protection and immunity.** Procedia in vaccinology 2010; 2(2): 134-139.

Soddard MB, Pinto V, Keiser PB, Zollinger W. **Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B *Neisseria meningitidis* vaccines made from lipid A acylation mutants.** Clin vac immunol 2010; 17(1):98-107.

Sonobe MH, Trezena AG, Guilhen FB, Takano VL, Fratelli F, Sakauchi D, Morais JF, Prado SMA, Higashi HG. **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(1): 69-76.

Southern J, Crowley-Luke A, Borrow R, Andrews N, Miller E. **Immunogenicity of one, two or three doses of a meningococcal C conjugate vaccine conjugated to tetanus toxoid, given as a three-dose primary vaccination course in UK infants at 2, 3 and 4 months of age with acellular pertussis-containing DTP/Hib vaccine.** Vaccine 2006; 24: 215-219.

Srivastava IK, Liu MA. **Gene Vaccines.** Ann Int Med 2003; 138 (7): 550-559.

Stack ML, Ozawa S, Bishai DM, Mirelman A, TAM Y, Niessen L, Waker DG, Levine OS. **Estimated economic benefits during the 'Decade Of Vaccines' include treatment savings, gains in labor productivity.** Health Aff 2011; 30(6): 1021-1028.

Steed LL, Akporiaye ET, Friedman RL. **Bordetella pertussis induces respiratory burst activity in human polymorphonuclear leukocytes.** Infect Immun. 1992; 60(5): 2101-2105.

Stehr K, Cherry JD, Heininger U, Schmitt-Grohe S, Uberall M, Laussucq S, et al. **A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/ Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP (DTP) vaccine or DT vaccine.** Pediatrics 1998; 101:1-11.

Stockinger B, Veldhoen M. **Differentiation and function of Th 17 cells.** 2007. *Current Opinion Immunology* 19 (3): 281-6.

Tang XL, Peppler MS, Irvin RT, Suresh MR. **Use of bispecific antibodies in molecular Velcro Assays whose specificity approaches the theoretical limit of immunodetection for *Bordetella pertussis*.** *Clin and DiagnLab Immunol* 2004; 11 (4): 752-757.

Tenbroeck C, Bauer JH. **Studies on the relation of tetanus bacilli in the digestive tract to tetanus antitoxin in the blood.** *The Journal of Experimental Medicine* 1923; 37:479-489.

The United States Pharmacopeia-USP 30. 30. ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2007.

Toporovski R, Morrow MP, Weiner DB. **Interferons as potential adjuvants in prophylactic vaccines.** *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10(10): 1489-1500.

Trollfors B, Taranger J, Lagergard T, Lind L, Sundh V, Zackrisson G, Lowe CU, Blackwelder W, Robbins JB. **A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine.** *NEJM* 1995; 333: 1045-1050.

Ulmer JB, Sztein MB. **Promising cutting-edge technologies and tools to accelerate the discovery and development of new vaccines.** *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(3):374-376.

Upham JW, Rate A, Rowe J, Kusel M, Sly PD, Holt PG. **Dendritic Cell Immaturity during infancy restricts the capacity to express vaccine-specific T-Cell memory.** *Infection and Immunity* 2006; 74: 1106–1112.

Vermont C, van den Dobbelen G. ***Neisseria meningitidis* serogroup B: laboratory correlates of protection.** *FEMS* 2002; 34(2): 89-96.

Veronesi R, Cecin H, Corrêa A, Tavares J, Moraes C, Bertoldo OJ. **New concepts on tetanus immunization: naturally acquired immunity.** *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1975; 19(1):126-134.

Veronesi R, Bizzini B, Focaccia R, Coscina AL, Mazza CC, Focaccia MT, Carraro T, Honningman MN. **Naturally acquired tetanus immunity: further evidence in humans and animals from the Galapagos Islands.** *Proc VI Intern Confer Tetanus, Lyon, France 3-5 December 1981.* Lyon: Fondation Merieux, 1981:243-249.

Vogel FR, Hem SL. **Immunologic adjuvants.** In *Vaccines*, 4th ed. Stanley A. Plotkin and Walter A. Orenstein, eds., with assistance of Paul A. Offit. Philadelphia: Saunders 2004; 69–79.

Volanakis JE. **Human C-reactive protein: expression, structure, and function.** *Mol. Immunol.* 2001; 38: 189–197.

Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaeble WJ, Keeble AH. **Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation.** Immunobiology 2010; 215(1): 1-11.

Walory J, Grzesiowski P, Hryniewicz W. **Comparison of four serological methods for the detection of diphtheria anti-toxin antibody.** J immunol meth 2000; 245 (1-2): 55-65.

Walport MJ. **Complement: first of two parts.** N. Engl. J. Med. 2001; 344: 1058–1066.
microparticles as adjuvant. Vaccine 2004; 22:1265–1274.

Wassilak SGF, Orenstein WA, Sutter RW. **Tetanus toxoid.** In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999. p.441-74.

Weckx LY, Carvalho ES. **Calendário vacinal: dinâmica e atualização.** Jornal de Pediatria; 1999; 75(1): S149-S154.

Weckx LY, Divino-Goes K, Lihama DM, Carraro E, Bellei N, Granato CFH, Moraes-Pinto MI. **Effect of a single tetanus-diphtheria vaccine dose on the immunity of elderly people in São Paulo, Brasil.** Braz J Med Biol Res 2006; 39: 519-523.

Weiner DB, Kennedy RC. **Genetic Vaccines.** Sci Am 1999; 281: 34-41.

Weiner HL. **Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells.** Immunol Rev. 2001; 182:207-214.

Weiss A. **Mucosal immune defenses and the response of *Bordetella pertussis*.** ASM News 1997; 63: 22-28.

Wellhörner HH. **Tetanus: important new concepts.** In: Veronesi R (ed). Excerpta medica. Amsterdam, pp. 41, 1981.

WHO. **Global Programme for Vaccines and Immunization.** Module 3: Tetanus – 1993.

Wilkins GL, Tasman A. **On the immunological reactivity of tuberculous patients: preliminary report.** Br Med J 1959; 2:1305-1307.

Yamamoto A, Nagata N, Ochiai M, Kataoka M, Toyozumi H, Okada K, Horiuchi Y. **Enhanced sensitisation of mice with diphtheria tetanus acellular pertussis vaccine to local swelling reaction to the booster immunisation.** *Vaccine*, 2002; 20(25-26): 3088-3094.

Yuan L, Kang SY, Ward LA, To TL, Saif LJ. **Antibodysecreting cell responses and protective immunity assessed in gnotobiotic pigs inoculated orally or intramuscularly with inactivated human rotavirus.** *J. Virol.* 1998; 72, 330–338.

Youm JW, Won YS, Jeon JH, Moon KB, Kim HC, Shin KS, Joung H, Kim HS. **Antibody responses in mice stimulated by various doses of the potato-derived major surface antigen of Hepatitis B virus.** *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 2029-2032.

Zepp F, Schmitt HJ, Kaufhold A, Schuind A, Knuf M, Habermehl P, Meyer C, Bogaerts H, Slaoui M, Clemens R. **Evidence for induction of polysaccharide specific B-cell-memory in the 1st year of life: plain Haemophilus influenzae type b-PRP (Hib) boosters children primed with a tetanus-conjugate Hib-DTPa-HBV combined vaccine.** *Eur J Pediatr.* 1997; 156(1):18-24.

Zinkernagel RM. **On differences between immunity and immunological memory.** *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14, 523–536.

Zipfel PF, Skerka C, Hellwage J, Jokiranta ST, Meri S, Brade V, Kraiczky P, Noris M, Remuzzi G. **Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases.** *Biochem. Soc. Trans.* 2002; 30: 971–978.