

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM NEONATOS
VACINADOS COM BCG MOREAU E BCG RUSSIA**

JULIA BITENCOURT CARDOSO DOS PRAZERES

Salvador - Bahia

2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM NEONATOS
VACINADOS COM BCG MOREAU E BCG RUSSIA**

JULIA BITENCOURT CARDOSO DOS PRAZERES

Orientador (a): Prof. Dr. Sérgio Arruda.

Co-Orientador (a): Prof^a Dr^a Iukary Takenami

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2020

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

Ministério da Saúde do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Escrevo os meus agradecimentos em plena pandemia de COVID-19, infecção que muitas vezes se apresenta discretamente, mas que ceifa vidas, destrói famílias, nos tira a paz e desestabiliza o sistema de saúde. Há quase dois meses e meio em distanciamento social, qualquer lembrança dos meses que iniciaram a minha trajetória no mestrado parece, hoje, fazer parte de uma coleção de memórias distantes de uma utopia – ou uma distopia menos violenta, pelo menos.

Agora, em 2020, completo meus primeiros cinco anos como pesquisadora. Pesquisadora brasileira, nascida e criada em Salvador, cidade que contabiliza, enquanto escrevo, 477 óbitos causados pelo SARS-CoV2. Já foram mais de 25.000 mortes confirmadas em território nacional. Tenho um milhão de agradecimentos a fazer, os quais venho pensando e redigindo mentalmente por meses, mas, antes de qualquer coisa, presto as minhas homenagens e sentimentos àqueles que não estão mais conosco em vida, aos que não conseguiram vencer a guerra. Meus agradecimentos se estendem aos profissionais, da saúde ou dos serviços essenciais, que enfrentam (ou enfrentaram) bravamente o grande caos.

Para aprender como suportar, enfrentar, superar e evitar momentos como este, foi que escolhi seguir a carreira científica. Peço licença para prestar as minhas homenagens pessoais, pois estas devem ser eternizadas também.

Aos meus pais, Nildes e Manoel, tudo que estiver ao meu alcance, farei por vocês. Toda luta será retribuída com grandes vitórias e conquistas – como já vem sendo. Mãe, obrigada por colocar o meu bem-estar à frente do seu. Embora nem sempre compreendidos no passado, seus sacrifícios passam a fazer cada vez mais sentido e são dignos de reconhecimento. Eu sei que não foram fáceis, mas espero estar fazendo por onde.

Aos meus irmãos, Enrico e Gabriela, a emoção toma conta quando penso em vocês. Contem comigo para tudo e para sempre. Usufruam das conquistas, lutem por elas e me encontrem na primeira fileira, de pompom nas mãos, torcendo por vocês. Talvez vocês ainda não entendam completamente, mas ver vocês crescendo e se tornando quem são, é meu maior privilégio até hoje. Amo vocês! Com tudo que tenho em mim.

À minha família, por saber que, aonde quer que eu esteja, estarão todos torcendo e acreditando em mim. Obrigada por não me deixarem cair. Alguns mais próximos, outros mais distantes, nem sempre entendendo muito bem o que faço da vida, mas todos sempre presentes e me incentivando a ser mais e melhor. Isso faz toda a diferença!

Aos meus amigos, meus grandes amigos, que privilégio poder compartilhar as incertezas e as vitórias com vocês todos os dias. Nossas angústias e conquistas são compartilhadas na mesma intensidade. Obrigada por estarem por perto a todo momento, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, por anos a fio. E que seja assim sempre.

À Iukary, minha primeira orientadora e co-orientadora no mestrado, obrigada pelo convite para trabalhar contigo. Foi um prazer enorme te acompanhar todos esses anos e ainda poder contar com você. Ao Dr. Sérgio, agradeço imensamente por ter me dado a liberdade, autonomia e confiança para desenvolver meu trabalho. Cresci muito – não em altura, infelizmente, então ainda posso me perder em algum tubo de ensaio –, e sei que muito disso foi por ouvir teus conselhos e preocupações. Entre um otimismo exagerado e um pessimismo realista, com direito a realização de um sonho acadêmico em Oxford, conseguimos finalizar essa etapa. Obrigada pela confiança.

Ao meu time, meu grupo, meu laboratório P0. Quantas batalhas foram travadas e quantos desafios foram superados? Pessoas chegaram, outras foram embora, mas continuam fazendo parte da nossa história. Nossa casinha tem um pouco de cada um que passou. Nossos cafés, nossos cálculos de diluições, nossas discussões de artigo, comemorações de prêmios e abraços quando algo saía (ainda sai, e muito!) do nosso controle. Vocês são o melhor time do mundo. Obrigada por me ensinarem tanto sobre ciência e sobre a graça de estar entre pessoas maravilhosas.

Ao Instituto de Saúde Coletiva da UFBA e time BCG, esse projeto não teria saído do papel sem a coordenação e apoio de vocês. Por várias vezes, os desafios foram enormes. A responsabilidade de lidar com diversas famílias ao mesmo tempo, cada uma com suas questões, limitações e comprometimento; gerenciar uma equipe técnica e garantir que os objetivos do estudo fossem atingidos. Dessa vez, não só agradeço, como também parablenizo. Foi um prazer trabalhar com vocês.

À Fiocruz e colaboradores. Em tempos como este, sinto falta dos encontros corriqueiros e das convivências diárias. Dos abraços orgulhosos e inesperados que me fizeram chorar – de fato, pertenci à família IGM – aos grandes desafios que envolvem fazer ciência. A batalha que enfrentamos no Brasil, vocês (nós) dominam com maestria. Por vezes, a torcida de que tudo desse certo veio acompanhada de um cafezinho compartilhado no meio da tarde, da formação de uma força-tarefa para a realização dos trabalhos de campo ou daquela burocracia gigantesca resolvida. Por todo suporte, e sem citar nomes (são muitos), agradeço imensamente por terem sido a minha segunda família nesses anos.

Por isso e por tanto, deixo meus agradecimentos aqui registrados para a posteridade. Aos que venham a ler essa dissertação um dia, lembrem que nós somos a ciência, mas ela não nos resume. Somos muito mais. Existe vida além de um experimento que deu errado ou de um artigo rejeitado. Sigamos fortes e sempre em frente, mas sem medo de dar alguns passos para trás quando necessário – às vezes, estes são nossos melhores impulsos. O céu já não é mais o limite.

A missão foi cumprida.

Deu certo.

“I am among those who think Science has a great beauty.”

Marie Curie

PRAZERES, Julia Bitencourt Cardoso dos. Análise comparativa da resposta imune celular em neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia. 2020. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A BCG é a única vacina licenciada no mercado para uso contra a tuberculose (TB). No entanto, sua alta eficácia pode variar de zero a 80% contra a forma pulmonar da doença, e pode ser causada por diferenças biológicas entre as cepas, dentre outros fatos. No Brasil, devido ao desabastecimento local da cepa Moreau, a cepa Russia passou a ser administrada em 2017. **OBJETIVO:** Avaliar a resposta imune celular de neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia, e comparar a produção de citocinas estimuladas por antígenos micobacterianos. **MÉTODOS:** Este é um estudo trata-se de uma série de casos não randomizados, realizado na Maternidade Magalhães Netto. Após o nascimento, neonatos saudáveis foram alocados em dois grupos: vacinados com BCG Moreau e BCG Russia, e acompanhados periodicamente. Amostras biológicas foram coletadas em antes (pré-BCG) e após (pós-BCG) a vacinação, para realização de ensaios imunológicos *in vitro*, de quantificação de citocinas em culturas de sangue total na ausência ou presença de antígenos micobacterianos (BCG Moreau, BCG Russia e H37Rv-HK, através de ensaio de citometria por microesferas. O processo de formação de cicatriz também foi avaliado. **RESULTADOS:** Entre dezembro de 2018 e janeiro de 2019, 36 neonatos foram incluídos no estudo. Desse total, 21 foram excluídos. Foram avaliados os dados de seis neonatos vacinados com BCG Moreau (16,7%) e nove vacinados com BCG Russia (25%). Na avaliação basal de citocinas (cultura não estimulada), o grupo Moreau apresentou níveis elevados de IL-2 e IL-10 após a vacinação. Além disso, a vacinação estimulou a produção de IL-2 e IFN- γ em ambos os grupos, com aumento de IL-6, TNF e IL-10 após vacinação com BCG Russia. Em relação ao H37Rv-HK, a BCG não foi capaz de estimular produção de citocinas em nenhum dos dois grupos, com exceção da IL-2, aumentada após a vacinação com BCG Moreau. Em análise comparativa no momento pré-BCG, o grupo Moreau respondeu melhor em ambas as condições de estímulo *in vitro*. Após a vacinação, BCG Moreau induziu maior resposta inflamatória, com aumento na detecção de IL-6, TNF, IFN- γ e IL-10, enquanto BCG Russia estimulou IFN- γ , exclusivamente. A vacinação foi bem tolerada e a lesão apresentou evolução normal. Contudo, a BCG Russia induziu uma menor extensão e ausência da cicatriz vacinal, em alguns casos. **CONCLUSÕES:** Os perfis de citocinas induzidas após a vacinação com as cepas BCG Moreau e BCG Russia são complexos, mas semelhantes. Ambas cepas foram associadas com o padrão clássico Th1, com produção de IL-2 e IFN- γ , mas somente a BCG Russia estimulou as citocinas inflamatórias IL-6, TNF e IL-10. A vacina induziu leve resposta imune *in vitro* contra o Mtb, mas associado à inflamação após BCG Moreau. A imunização foi bem tolerada e a lesão apresentou evolução normal. No grupo vacinado com a BCG Russia, a maior regulação da resposta imune pela IL-10 pode explicar o suposto desenvolvimento de lesão mais leve e menor cicatrização.

Palavras-chave: Vacina BCG, Neonatos, Citocinas.

PRAZERES, Julia Bitencourt Cardoso dos. Comparative analysis of the cellular immune response in infants vaccinated with BCG Moreau and BCG Russia. 2020. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: BCG is the only licensed vaccine on the market for use against tuberculosis (TB). However, its high effectiveness varies from zero to 80% against the pulmonary form of the disease and can be caused by biological differences between the strains, among other facts. In Brazil, due to the local shortage of the Moreau strain, the Russia strain started to be administered in 2017. **OBJECTIVE:** To evaluate the cellular immune response of infants vaccinated with BCG Moreau and BCG Russia, and to compare the cytokines production stimulated by mycobacterial antigens. **METHODS:** This is a series of non-randomized cases study, carried out at Maternidade Magalhães Netto. After birth, healthy infants were allocated to two groups: vaccinated with BCG Moreau and vaccinated with BCG Russia, and followed up periodically. Biological samples were collected before (pre-BCG) and after (post-BCG) vaccination to perform in vitro immunological assays. Using a microsphere cytometry assay, cytokines were quantified in whole blood cultures in the absence or presence of mycobacterial antigens (BCG Moreau, BCG Russia, and H37Rv-HK). The scar formation process was also evaluated. **RESULTS:** Between December 2018 and January 2019, 36 newborns were included in the study. Of this total, 21 were excluded. The data of six neonates vaccinated with BCG Moreau (16.7%) and nine vaccinated with BCG Russia (25%) were evaluated. At baseline cytokine evaluation (non-stimulated culture), the Moreau group showed high levels of IL-2 and IL-10 after vaccination. Besides, vaccination stimulated the production of IL-2 and IFN- γ in both groups, with an increase in IL-6, TNF, and IL-10 after vaccination with BCG Russia. Regarding H37Rv-HK, BCG was not able to stimulate cytokine production in either group, except for IL-2, increased after vaccination with BCG Moreau. In a pre-BCG comparative analysis, the Moreau group responded better in both stimulus conditions in vitro. After vaccination (post-BCG), BCG Moreau induced a greater inflammatory response, with increased detection of IL-6, TNF, IFN- γ , and IL-10, while BCG Russia stimulated IFN- γ exclusively. Vaccination was well tolerated and the lesion evolved normally. However, BCG Russia induced a lesser extent and absence of the vaccine scar, in some cases. **CONCLUSIONS:** The cytokine profiles induced after vaccination with BCG Moreau and BCG Russia strains are complex but similar. Both strains were associated with the classic Th1 pattern, with the production of IL-2 and IFN- γ , but only BCG Russia stimulated the inflammatory cytokines IL-6, TNF, and IL-10. The vaccine induced a mild immune response in vitro against Mtb but associated with inflammation after BCG Moreau. Immunization was well tolerated and the lesion evolved normally. In the group vaccinated with the BCG Russia, the regulation of the immune response by IL-10 may explain the supposed development of a milder lesion and less scarring.

Palavras-chave: BCG Vaccine, Infants, Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Incidência de tuberculose no mundo em 2018.	17
Figura 2 -	Genealogia das cepas de BCG.	24
Figura 3 -	Distribuição das cepas de BCG no mundo entre 2003 e 2007.	26
Figura 4 -	Desenho de estudo e grupos BCG Moreau (A) ou BCG Russia (B).	30
Figura 5 -	Esquema metodológico dos ensaios in vitro de culturas de sangue total.	34
Figura 6 -	Fluxograma de população de estudo.	36
Figura 7 -	Produção basal de citocinas em neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia.	38
Figura 8 -	Produção de citocinas induzidas pela vacinação com BCG Moreau e BCG Russia.	40
Figura 9 -	Avaliação comparativa entre as concentrações de citocinas induzidas por Mtb no sobrenadante de cultura de sangue total dos neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia.	42
Figura 10 -	Produção de citocinas Mtb-específicas em neonatos vacinados com BCG.	43
Figura 11 -	Avaliação comparativa da produção precoce (pré-BCG) de citocinas em neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia, em diferentes condições.	47
Figura 12 -	Avaliação comparativa da produção de citocinas em neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia em diferentes condições, após a vacinação (pós-BCG).	48
Figura 13 -	Evolução da lesão vacinal de BCG Moreau pré e pós-BCG.	50
Figura 14 -	Evolução da lesão vacinal de BCG Russia pré e pós-BCG.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas dos neonatos imunizados com BCG.	37
Tabela 2 - Descrição numérica da produção de citocinas dos neonatos vacinados com BCG Moreau em diferentes condições de cultura <i>in vitro</i> .	45
Tabela 3 - Descrição numérica da produção de citocinas dos neonatos vacinados com BCG Russia em diferentes condições de cultura <i>in vitro</i> .	46

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR	Bacilo Álcool-ácido Resistente
BCG	Bacilo Calmette Guérin (do francês “ <i>Bacille Calmette Guérin</i> ”)
CBA	Ensaio de Citometria por Bead (do inglês “ <i>Cytometric Bead Array</i> ”)
CD	Células dendríticas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFP-10	Proteína 10 do filtrado de cultura (do inglês, “ <i>10 kDa culture filtrate antigen</i> “)
CMTB	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
CN	Controle Negativo
CXCL-8	Interleucina-8 (IL-8)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPI	Programa de Imunização Estendida
ESAT-6	Alvo antigênico precocemente secretado de 6kDa (do inglês “ <i>6 kDa early secretory antigenic target</i> ”)
FAP	Fundação Atauilho Paiva
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon-gama
IGRA	Ensaio de Liberação de Interferon Gama (do inglês, <i>Interferon-Gamma Release Assay</i>)
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL	Interleucina
IQR	Intervalo-interquartil
ISC	Instituto de Saúde Coletiva
LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MS	Ministério de Saúde
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF-K β	Ativador de fator nuclear Kappa-B (do inglês “ <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> ”)
NK	Célula assassina natural (do inglês, “ <i>Natural killer</i> ”)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNI	Programa Nacional de Imunização

PPD	Derivado Proteico Purificado
RD	Região de Diferença
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1640
SBF	Soro Bovino Fetal
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SII	<i>Serum Institute of India</i>
T0	Tempo zero; pré-BCG
T1	Tempo um; pós-BCG
TB	Tuberculose
TBEP	Tuberculose extrapulmonar
TBL	Tuberculose latente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDM	Trealose Dimicolato
Th	Célula T auxiliadora (do inglês, " <i>helper</i> ")
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFBA	Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	TUBERCULOSE: ASPECTOS GERAIS E AGENTE ETIOLÓGICO	16
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.3	TRANSMISSÃO E RESPOSTA IMUNE.....	17
2.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	19
2.5	CONTROLE DA TUBERCULOSE.....	20
2.5.1	Vacina BCG	20
2.5.1.1	<i>História e resposta imune</i>	20
2.5.1.2	<i>Eficácia e limitações</i>	22
2.5.2	Cepas Vacinais	24
2.5.2.1	<i>BCG Moreau e BCG Russia</i>	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	GERAL.....	29
3.2	ESPECÍFICOS.....	29
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
4.1	DESENHO DE ESTUDO.....	30
4.2	LOCAL DO ESTUDO	30
4.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO	31
4.4	TAMANHO AMOSTRAL.....	31
4.5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
4.6	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	32
4.6.1	Questionário	32
4.6.2	Coleta de sangue e vacina BCG	32
4.6.3	Cultura de sangue total	33
4.6.4	Quantificação de citocinas por ensaio de citometria com microesferas	34
4.6.5	Avaliação do processo de cicatrização da lesão vacinal	34
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5	RESULTADOS	36
5.1	FLUXOGRAMA DO ESTUDO E AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA DOS RECÉM-NASCIDOS.	36
5.2	PRODUÇÃO BASAL DE CITOCINAS EM NEONATOS VACINADOS COM BCG.	37
5.3	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA VACINAÇÃO COM BCG.....	39
5.4	PRODUÇÃO DE CITOCINAS MTB-ESPECÍFICAS EM NEONATOS VACINADOS COM BCG	41
5.5	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA RESPOSTA IMUNE DE NEONATOS VACINADOS COM BCG.	44
5.6	FORMAÇÃO DE CICATRIZ VACINAL.....	49
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO 1	65
	APÊNDICE 1	67
	APÊNDICE 2	69

1 INTRODUÇÃO

Tuberculose (TB), doença infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), atingiu globalmente cerca de 10 milhões de indivíduos em 2018, com uma taxa média de 130 casos a cada 100.000 habitantes. Além disso, a TB foi responsável pela morte de 1,5 milhão de pessoas. Apesar da gradual e discreta redução da incidência (2% entre 2017 e 2018), a doença ainda é considerada um grave problema de saúde pública (WHO, 2019). Embora a forma clínica da doença atinja principalmente os pulmões, o bacilo pode migrar para outros órgãos e tecidos, como linfonodos, pleura, ossos/articulações e meninges por disseminação hematogênica ou linfática, e causar uma TB extrapulmonar, forma grave e mais comum em crianças (RAMÍREZ-LAPAUSA; MENÉNDEZ-SALDAÑA; NOGUERADO-ASENSIO, 2015; WHO, 2018)

Uma das principais medidas de prevenção da doença é administração da vacina *Bacille Calmette Guérin* (BCG), nos primeiros meses ou anos de vida do recém-nascido. Sabe-se que a vacinação com BCG é indiscutivelmente eficaz em reduzir a morbimortalidade contra as formas extrapulmonares e/ou graves da doença (PEREIRA et al., 2007). No entanto, contra a forma pulmonar, cerca de 85% dos casos, a proteção ainda é limitada, variando entre 0 e 80% (MANGTANI et al., 2014). No Brasil, a eficácia da BCG contra a forma pulmonar da TB foi de 44% (IC 95%: 20-60), variando entre 51 (24-68) e 24% (-54-73), nas cidades de Salvador e Manaus, respectivamente.

É possível que alguns fatores possam influenciar na proteção: a pré-sensibilização com micobactérias ambientais, diferenças metodológicas de preparo, variação biológica entre as diversas cepas de BCG e, conseqüentemente, propriedades imunogênicas discordantes entre as cepas. No entanto, ainda não existe consenso sobre a real eficácia e o mecanismo de proteção imunológico induzido pela vacina BCG. Acredita-se que a atividade de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ seja fundamental, mas não suficientes para prevenção total da TB.

Recentemente, a fabricação da vacina BCG Moreau pela Fundação Atauilho Paiva (FAP) no Rio de Janeiro foi descontinuada, impactando significativamente no Programa Nacional de Imunização (PNI) do país. Em substituição à vacina BCG Moreau, a BCG Rússia passou a ser administrada também no Brasil. Esta cepa é fabricada pelo *Serum Institute of India* (SII) e utilizada em diversos países da Ásia, Europa, África, Américas Central e do Sul. A mudança de cepas, incita questionamentos sobre efeito protetor da vacina na população brasileira (ANTAS; FLORES-VALDEZ; SHANN, 2018). Portanto, ao considerar a utilização da cepa Rússia em substituição à cepa Moreau no Brasil, faz-se necessário o desenvolvimento

de um estudo que avalie e compare a resposta imune induzida pelas duas cepas em neonatos, assim como a influência da cepa na cicatrização vacinal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE: ASPECTOS GERAIS E AGENTE ETIOLÓGICO

O gênero *Mycobacterium* é constituído por mais de 170 espécies de micobactérias, incluindo bacilos patogênicos, não-patogênicos e oportunistas. Dentre as micobactérias patogênicas destaca-se o Mtb, agente causador da TB descoberto em 1882 pelo médico patologista Robert Koch, pertencente à ordem Actinomycetales e à família Mycobacteriaceae. Embora esta seja a principal micobactéria associada à doença, dependendo da região e do estado imunológico do hospedeiro, micobactérias de outras espécies do gênero também podem causar a doença (GAGNEUX, 2018; SOINI; MUSSER, 2001).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB é uma das 10 principais causas de óbitos no mundo e está no topo da lista de doenças infecciosas causadas por um único agente que mais mata, superando inclusive a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS) (WHO, 2019). No ano de 2018, foram notificados 10 milhões de casos novos, sendo 57% no sexo masculino, 32% em mulheres, 11% em crianças e 8,6% em pessoas que vivem com o HIV (Figura 1). Estes dados revelam a grande dificuldade de controle da doença, mais uma vez evidenciada como um problema prioritário de saúde pública no país e no mundo.

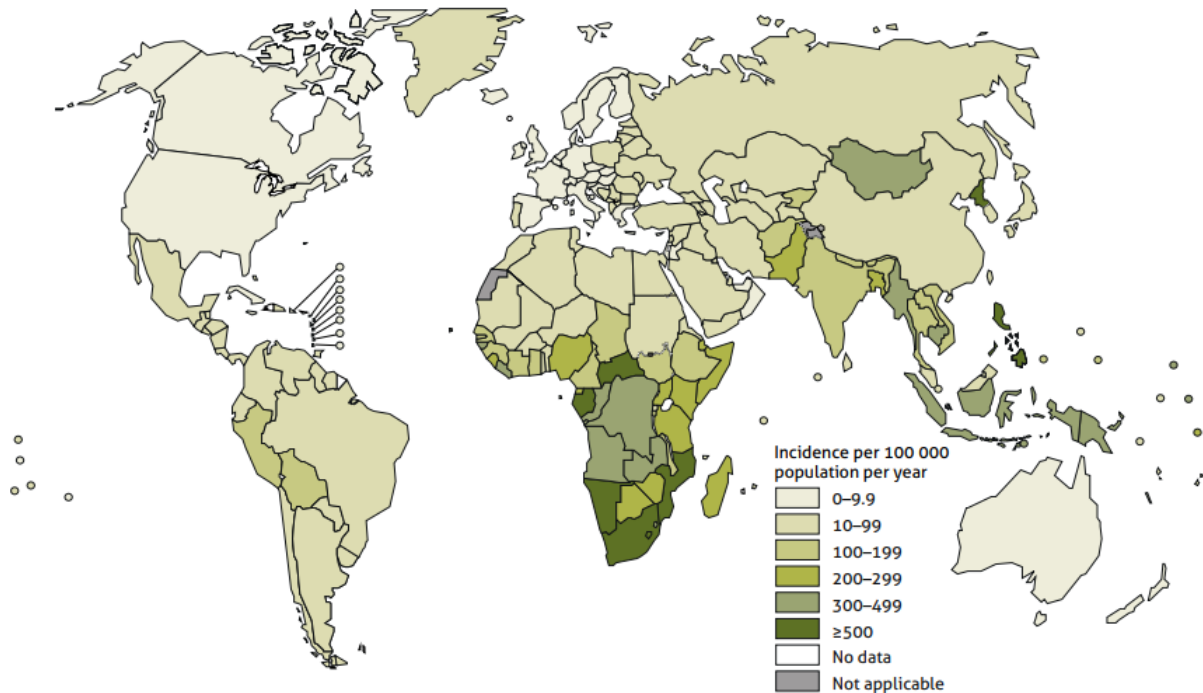


Figura 1. Incidência de tuberculose no mundo em 2018. Fonte: (WHO, 2019).

A TB atinge todos os países e pode afetar pessoas de qualquer idade. Cerca de 57% de todos os casos da doença ocorrem em indivíduos do sexo masculino e adultos. Em mulheres, essa estimativa chega aos 32%, e 11% em crianças (WHO, 2019). Embora os números ainda sejam altos, no período entre 2000 e 2018, a incidência de TB vem diminuindo cerca de 1,6% ao ano, o que é insuficiente para atingir o objetivo previsto no programa *The End TB Strategy* (WHO, 2015). Esse continua sendo um grande projeto de estratégias com o objetivo de reduzir o número de casos e óbitos provocadas pela TB até 2035. Deste modo, a vigilância epidemiológica deve priorizar medidas preventivas e de controle da TB. Tais estratégias devem ser planejadas de acordo com a realidade local dos municípios, de maneira que as metas e objetivos delineados pelo *The End TB Strategy* e pelo Ministério da Saúde (MS) sejam atingidos (WHO, 2019).

2.3 TRANSMISSÃO E RESPOSTA IMUNE

A transmissão do Mtb ocorre pelas vias aéreas, através da inalação de aerossóis contaminados com o bacilo, expelidos por um indivíduo bacilífero, durante a tosse, espirro ou contato próximo ao falar. A quantidade de bacilos expelidos, a cepa infectante, sua virulência e tempo de exposição são fatores que afetam diretamente a transmissão de um indivíduo infectado a um sadio (SCRIBA; COUSSENS; FLETCHER, 2016)

A infecção se inicia quando o *Mtb* atinge os alvéolos pulmonares e inicia-se uma resposta imune mediada pela atividade de células fagocíticas como macrófagos alveolares residentes, neutrófilos e células dendríticas (CD). O reconhecimento do patógeno induz uma cascata de sinalização que ativa o fator de transcrição NF- κ B no citoplasma das células. Essa via induz a produção de citocinas pró-inflamatórias importantes como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-12p80 (IL-12), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1-alfa (IL-1 α) e interleucina-1-beta (IL-1 β) (ZUIGA et al., 2012).

A eficiência da primeira linha de defesa define a resposta imune subsequente. É possível que a resposta imune inicial já seja capaz de eliminar algumas micobactérias. Nesses casos, no entanto, não há geração de resposta de memória (COOPER, 2009). A resposta predominante é mediada por fagócitos que podem processar e apresentar antígenos peptídicos através do complexo principal de histocompatibilidade do tipo I ou II (MHC-I ou MHC-II) para células não sensibilizadas nos linfonodos, com função auxiliadora potencial da resposta imune. Ao migrarem, os fagócitos apresentam os antígenos aos linfócitos T CD4+ e T CD8+, e a produção de IL-12 por macrófagos induz a polarização T *helper* 1 (Th1) nos linfócitos, essencial para controle e combate à infecção por *Mtb* (MOUTINHO D, 2011).

Os linfócitos T e células NK respondem ao estímulo produzindo IFN- γ , citocina inflamatória que ativa a capacidade microbicida dos macrófagos infectados, levando a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio capazes de eliminar o bacilo. Diversos estudos evidenciam o papel fundamental do IFN- γ na resposta imune, principalmente no contexto da TB (DOCKRELL; SMITH, 2017). No entanto, sabe-se que uma resposta imune baseada em IFN- γ não é suficiente para controle da infecção e redução da carga micobacteriana (ABEBE, 2012; ZENG; ZHANG; CHEN, 2018).

Mais recentemente, outros tipos celulares foram relatados na literatura como bons produtores de IFN- γ e, conseqüentemente, importantes no controle da infecção por *Mtb*: os linfócitos não convencionais, como linfócitos T $\gamma\delta$ e células NKT-*like* (BRANDES et al., 2009; ZUIGA et al., 2012). Linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 estão aumentados em pacientes com infecção latente (STERN et al., 2009) e são importantes mediadores da resposta imune inata em infecção por micobactéria (BRANDES et al., 2009; UMEMURA et al., 2007). Células NK e NKT-*like* produzem perforinas, granzimas e citocinas inflamatórias em resposta a estímulo com *Mtb* em indivíduos previamente sensibilizados (SULIMAN et al., 2016). Além de atuarem como células efetoras, estudos mais recentes evidenciam a capacidade destas células em conferir memória imunológica (COOPER, 2009).

No tecido, a relação entre a imunidade do hospedeiro e a atividade micobacteriana resulta na formação do granuloma, estrutura organizada e constituída por diversos tipos celulares. É possível que a persistência de bacilos vivos ou fragmentos de bacilos mantenha a resposta inflamatória granulomatosa, com a participação de células epiteliais, fibroblastos, macrófagos, células gigantes e linfócitos T CD4+ e CD8+. (ZUIGA et al., 2012). Sob ação primordial do TNF, os granulomas funcionam como uma barreira física de contenção da infecção. No entanto, podem também dificultar a entrada de antibióticos e proteger o patógeno da resposta imune adaptativa do hospedeiro, contribuindo para a sobrevivência do Mtb (BARRY et al., 2009).

Enquanto a relação patógeno-hospedeiro ainda não está elucidada por completo, novos estudos buscam entender a contribuição de diversos fatores no controle da infecção e prevenção da reativação da doença (SCRIBA; COUSSENS; FLETCHER, 2016). Recentemente, a associação de técnicas imunológicas para investigação dos fenótipos celulares, microambiente granulomatoso e fatores micobacterianos, juntamente com técnicas de tomografia computadorizada e tomografia computadorizada por emissão de pósitrons, vem trazendo novas aspectos interessantes sobre o funcionamento dos granulomas e seu metabolismo (BARRY et al., 2009; DORHOI; KAUFMANN, 2014; PAI et al., 2016).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os principais sintomas da TB incluem tosse persistente, seca ou produtiva, febre vespertina, perda de apetite e, conseqüentemente, a perda de peso, sudorese noturna (PAI et al., 2016). Ao exame clínico, nota-se ausculta pulmonar com diminuição do murmúrio vesicular, sopro anfórico ou aspecto normal. A TB pode se apresentar como uma infecção tuberculosa latente (ITBL), evidenciada pela existência de granuloma e resultados do teste tuberculínico, constituído pelo derivado protéico purificado (PPD), e do ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA) positivos, ou ativa, caracterizado pelo resultado positivo de cultura de escarro e baciloscopia. No entanto, atualmente, considera-se um espectro evolutivo da doença muito maior, indo desde um indivíduo imuno-competente capaz de eliminar a infecção, passando pela ITBL, doença subclínica e doença ativa (BARRY et al., 2009; PAI et al., 2016; ZUIGA et al., 2012).

Diversos fatores, incluindo a virulência do patógeno e competência imunológica do hospedeiro, irão influenciar a apresentação sintomática da doença, bem como a possível progressão da forma latente para a forma ativa. Além disso, sabe-se que a infecção pode ser

mantida durante anos em estado de latência, e o risco de reativação da doença pode persistir por toda vida. No entanto, é possível que a doença nunca seja estabelecida. Estima-se que de 5 a 10% dos indivíduos a infecção progredirá para doença ativa em um período variável de meses à anos após a primo-infecção (ANDREWS et al., 2012).

2.5 CONTROLE DA TUBERCULOSE

Uma importante estratégia de prevenção, sobretudo na saúde infantil, é a vacinação com BCG. Administrada em crianças desde 1921, a BCG é a única vacina disponível no mercado e, embora ainda tenha sua eficácia questionada, seu impacto vai além da redução da incidência de TB extrapulmonar em crianças. Existem evidências de que a vacina é capaz de reduzir a morbimortalidade infantil não associada com seu efeito na TB (HIGGINS et al., 2016; KLEINNIJENHUIS; VAN CREVEL; NETEA, 2014)

2.5.1 Vacina BCG

2.5.1.1 História e resposta imune

Em 1882, o médico alemão Heinrich Hermann Robert Koch descobriu o *Mycobacterium bovis*, bacilo causador da TB bovina (SAKULA, 1982). No entanto, somente 20 anos depois seu isolamento foi realizado por Edmond Nocard. Nos anos seguintes, o médico bacteriologista Albert León Charles Calmette e o médico veterinário Camille Guérin, pesquisadores do Instituto Pasteur em Lille, iniciaram estudos com a cepa enviada por Nocard. Em 1919, após 230 passagens do *M. bovis*, obtiveram uma cepa incapaz de progredir à doença em animais. Esta cepa atenuada e não virulenta, passou a ser conhecida como BCG em homenagem aos seus criadores (LUCA; MIHAESCU, 2013).

A BCG foi administrada em um ser humano pela primeira vez em 1921, na França, por Benjamin Weill-Hall, através da via oral no terceiro, quinto e sétimo dia após o nascimento de um bebê, cuja mãe faleceu horas após o parto com sintomas da TB, e que passaria a viver com sua avó também doente. Nenhuma reação adversa foi apresentada e a criança permaneceu saudável. Os resultados promissores obtidos motivaram o Instituto Pasteur a iniciar uma produção em massa do BCG (1928), com o objetivo de aumentar cada vez mais o número de crianças imunizadas com a nova vacina (LUCA; MIHAESCU, 2013).

A partir de 1924, culturas de BCG foram distribuídas para diversos laboratórios do mundo. Em 1925, uma dessas amostras chegou ao Brasil, por intermédio do médico uruguaio Júlio Elvio Moreau. Na época, a ausência de conhecimento acerca das possíveis alterações genéticas provocadas por passagens sucessivas de cultura, além da ausência de agências reguladoras nacionais e/ou internacionais, culminaram na geração de dezenas de subcepas (BENÉVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005).

Em 1974, a OMS incluiu em seu Programa de Imunização Estendida (EPI) a vacinação com BCG. Mundialmente, já foram mais de 3 bilhões de doses administradas e a cada ano são vacinados mais de 100 milhões de recém-nascidos (GUERRERO; DEBRIE; LOCHT, 2010). Em 2012, a cepa brasileira – a BCG Moreau Rio de Janeiro - foi reconhecida como estirpe de referência mundial (WHO, 2011).

Embora a BCG seja amplamente utilizada, o conhecimento sobre proteção induzida pela vacinação ainda é limitado e controverso. A ausência de um correlato de proteção vacinal prejudica a avaliação da eficácia, do mecanismo de proteção induzido, e tem implicações diretas no processo de desenvolvimento de novas vacinas (FLETCHER; DOCKRELL, 2016). O clássico padrão de resposta imune ao Mtb fez com que grande parte dos estudos de avaliação imunogênica da BCG fosse restrito, principalmente, à análise de células T CD4+ produtoras de IFN- γ e TNF (SOARES et al., 2008).

A avaliação da imunogenicidade da BCG (e de novos candidatos vacinais) tem sido bastante explorada através da análise imunofenotípica de células e quantificação de citocinas (FLETCHER; DOCKRELL, 2016). Em um estudo realizado por Kagina e colaboradores (2010) foi possível evidenciar que a vacina BCG induz um complexo padrão fenotípico de células e de citocinas. A estimulação *ex vivo* de sangue total de recém-nascidos induziu a expressão policlonal de citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF por linfócitos T CD4+, assim como em células T CD8+, mas em menor proporção. Em menor frequência, IL-4 e IL-10 também foram estimulados. Além disso, perfis celulares característicos de memória efetora e central, específicos para o BCG produziram diferentes citocinas (SOARES et al., 2008).

A maturação do sistema imune nos primeiros meses de vida parece ser importante para o desenvolvimento de uma resposta mais eficaz frente ao estímulo micobacteriano. Em um estudo realizado por Shey e colaboradores (2014), crianças mais velhas apresentaram maior expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-12p40, quando comparados com os primeiros dias de vida. Apesar da imunorregulação tendendo a um perfil mais Th2, resultados evidenciaram a quimiocina 8 (CXCL-8) como uma molécula efetora de sinalização de células

T, capaz de favorecer a indução de uma resposta antimicrobiana em neutrófilos e de produção de IFN- γ por células T $\gamma\delta$ (GIBBONS et al., 2014).

A hipótese de que a BCG é mais eficaz em crianças por induzir uma melhor imunidade protetora do que em adultos foi discutida e testada em um estudo realizado por Ritz e colaboradores (2012). Ambos os grupos produziram níveis comparáveis de células T polifuncionais, tanto T CD4+ quanto T CD8+ e T $\gamma\delta$ (RITZ et al., 2012a), sendo que a idade no momento da vacinação influencia a frequência de alguns tipos celulares (BIRK et al., 2017a). Segundo Kagina e colaboradores (2010), o perfil celular e de citocinas estimulados após a vacinação com BCG não foi associada a uma maior proteção vacinal.

Um outro aspecto da BCG está relacionado aos seus efeitos heterólogos, ou seja, efeitos que vão além da resposta contra a TB, doença para qual ela foi inicialmente desenvolvida (KLEINNIJENHUIS; VAN CREVEL; NETEA, 2014). A esse efeito foi dado o termo “imunidade treinada” – descrito como o processo pelo qual o estímulo antigênico, seja ele uma infecção ou imunização vacinal, é capaz de estimular efeitos contra patógenos não relacionados (NETEA; QUINTIN; VAN DER MEER, 2011). No caso da BCG, sua utilização mais comum fora do contexto da imunologia de doença infecciosa é no tratamento do câncer de bexiga (SYLVESTER; VAN DER MEIJDEN; LAMM, 2002). Porém, discussões recentes evidenciaram a imunidade treinada da BCG à modificações epigenéticas em células da imunidade inata como monócitos e macrófagos, através do receptor NOD-2 e metilação de histonas do DNA, melhorando a capacidade dessas células de responder aos estímulos antigênicos subsequentes (KLEINNIJENHUIS et al., 2012).

2.5.1.2 Eficácia e limitações

O primeiro estudo sobre a eficácia do BCG foi publicado por Calmette em 1927, onde foi relatado que de 969 crianças nascidas de mães ou em contato próximo com indivíduos doentes, e vacinadas entre os anos 1921 e 1927, apenas 3,9% morreram de TB ou causa indeterminada. Em comparação, a mortalidade no grupo de crianças não vacinadas foi de 32,6% (BLOOM, 1994).

Desde então, diversas publicações têm demonstrado variações na eficácia da vacina BCG, especialmente contra a forma pulmonar (BARRETO; PEREIRA; FERREIRA, 2006; HART; SUTHERLAND, 1977; PEREIRA et al., 2007). Estudos realizados em São Paulo, Recife e em diversas regiões do mundo, demonstraram uma elevada proteção conferida pela

primeira dose da vacina BCG contra meningite tuberculosa e a TB miliar (DANTAS et al., 2006; MANGTANI et al., 2014; WÜNSCH FILHO et al., 1990). A BCG é administrada no primeiro mês de vida do recém-nascido e é, indiscutivelmente, eficaz na redução da morbidade e mortalidade por TB nessas formas (RODRIGUES; DIWAN; WHEELER, 1993). Independentemente do tipo de estudo (ensaio clínico ou caso-controle), a proteção é superior a 80%, o que justifica a sua utilização nas políticas públicas brasileiras (PEREIRA et al., 2007).

Por outro lado, os estudos que avaliam a proteção da vacina contra a TB pulmonar são bastante heterogêneos, apresentando eficácia variável entre 0 e 80%, dependendo principalmente do local de estudo e idade dos participantes (MANGTANI et al., 2014). No Brasil, a hipótese de que a revacinação poderia reforçar a imunidade perdida ao longo do tempo foi testada, e se mostrou inviável. A segunda dose da BCG em crianças com idade escolar apresentou eficácia de 9 a 12%, sendo maior em Salvador (quase 20%) do que em Manaus (praticamente zero), dependendo também do grupo avaliado (BARRETO et al., 2011).

Além disso, observa-se que as maiores taxas de eficácia são observadas no período neonatal, com uma diminuição da resposta imune induzida pela vacina com o aumento da idade (BARRETO et al., 2011; RODRIGUES; DIWAN; WHEELER, 1993). Em 2016, Nguipdod-Djomo e colaboradores (2016) sugeriram a partir de dados provenientes de população norueguesa, que a proteção conferida pela vacina BCG parece durar mais do que a previamente descrita na literatura, podendo chegar até os 45 anos de idade, aproximadamente. No entanto, a efetividade vacinal reduziu ao longo dos anos. A vacinação em criança de idade escolar oferece proteção moderada por pelo menos 20 anos (MANGTANI et al., 2017).

As variações observadas na eficácia da vacina têm mobilizado grupos de pesquisadores na investigação do que pode estar causando essas variações. Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar essas divergências, e dentre elas, o mascaramento e/ou bloqueio da resposta imune por conta de uma pré sensibilização com micobactérias ambientais, diferenças metodológicas de preparo, a variação biológica entre as diversas cepas do BCG e, conseqüentemente, propriedades imunogênicas discordantes entre as cepas, podendo também provocar reações discordantes. No entanto, não existe consenso a respeito (BROSCH et al., 2007; DOCKRELL; SMITH; LALOR, 2012).

2.5.2 Cepas Vacinais

Devido a distribuição da cepa original de BCG para diversos países no início do século XX e a quase inexistente padronização de protocolos para passagem das culturas, as cepas continuaram em processo de evolução (Figura 2) (ABDALLAH et al., 2015). Em 1999, ensaios de hibridização foram realizados por Behr e colaboradores afim de estudar as diferenças gênicas entre o Mtb e o *M. bovis*, e entre o *M. bovis* e suas cepas filhas de BCG (BEHR; CIÛ; SALAMON, 1999). Os resultados encontrados permitiram a identificação de regiões gênicas exclusivas do Mtb. Devido ao contínuo processo de atenuação do *M. bovis*, diversas outras regiões gênicas foram sendo progressivamente perdidas. As subcepas vacinais apresentam deleções nas regiões de diferença (RD)1, RD2, RD8, RD14 e RD16.

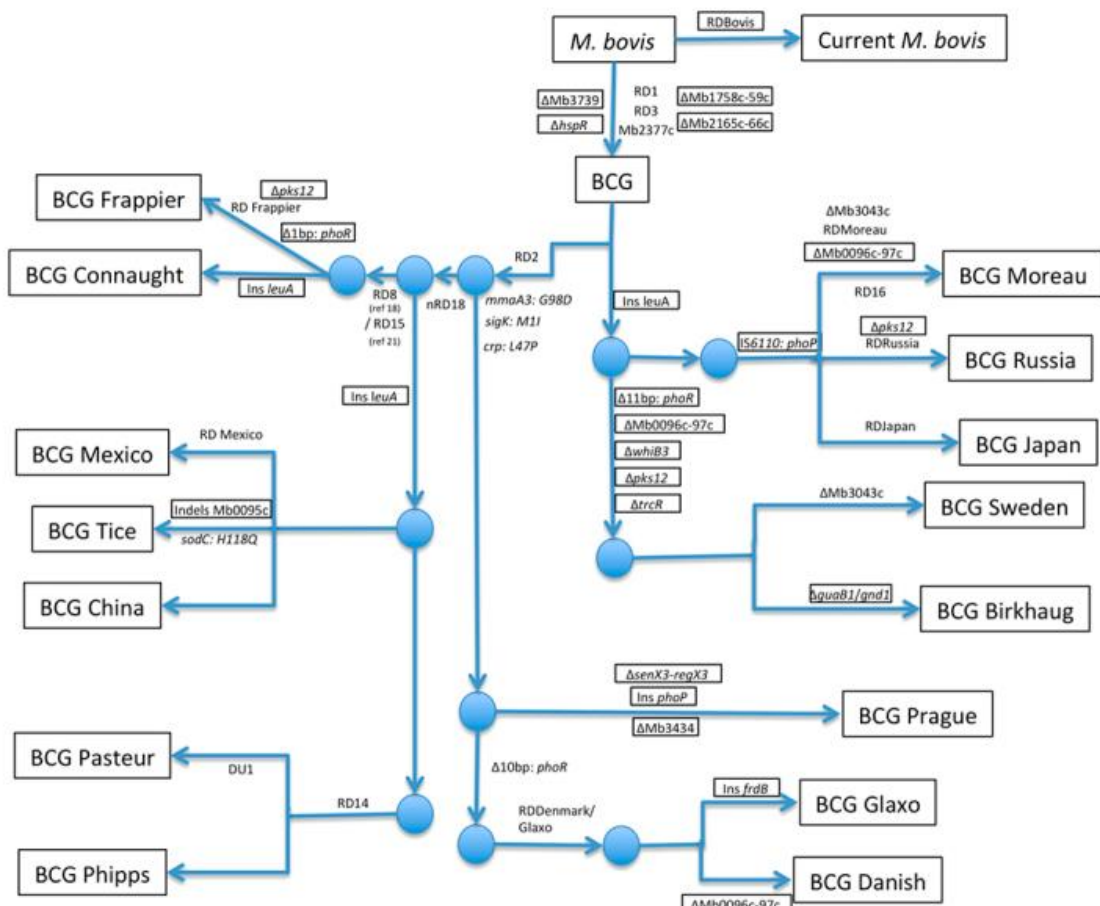


Figura 2. Genealogia das cepas de BCG. Fonte: (ABDALLAH et al., 2015).

A suspeita em relação a qual mutação era de fato responsável pela atenuação da BCG foi levantada em vários estudos filogenéticos (ABDALLAH et al., 2015; BEHR; SMALL,

1999; BROSCHE et al., 2007; HAYASHI et al., 2009; LEUNG et al., 2008; PAN et al., 2011). A RD1, região ausente nas cepas de BCG e presente no Mtb, inclui genes associados a fatores de virulência como o antígeno alvo de secreção primária (ESAT-6) e a proteína de filtrado de cultura de 10 kDa (CFP-10). Nos ensaios *in vitro*, a cepa laboratorial de Mtb H37Rv *knock-out* para RD1 foi capaz de mimetizar o BCG atenuado, apresentando menor virulência quando comparada com a cepa original, e similar a virulência de cepas vacinais, mostrando que a perda dessa região foi essencial para a atenuação das cepas seguintes (LEWIS et al., 2003).

Assim, diante de tantas mutações que levaram à diferentes graus de atenuação, as cepas vacinais de BCG são cientificamente classificadas em dois grupos. As cepas iniciais (“*early strains*”) conservam três tipos de ácidos micólicos na parede celular (*alfa-*, *keto-*, *methoxy-*), fortes indutores de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias. As cepas que seguiram a partir da mutação deletéria no gene *mma3*, responsável pela produção de ácido metoximicolato, foram chamados de cepas tardias (“*late strains*”). O trealose dimicolato (TDM) extraído das cepas iniciais possuem maior propriedade imunostimuladora do que o mesmo composto extraído das cepas tardias (HAYASHI et al., 2009).

A distribuição das cepas de BCG pelo mundo foi relatada por Ritz e Curtis (2009), ao discutir que as divergências entre elas podem estar relacionadas com alterações na epidemiologia de eventos adversos pós-BCG e eficácia variável (Figura 3) (RITZ; CURTIS, 2009). Evidências sugerem que as diferenças genéticas entre cepas de BCG podem influenciar na eficácia protetora da vacinação contra a TB. Segundo Wu e colaboradores (2007), neonatos vacinados com três cepas de BCG apresentaram padrões de expressão gênica distintos. A vacinação com a cepa Moreau e Danish induziu maior expressão de citocinas envolvidas na resposta imune adaptativa, como IL-12, IL-27 e IFN- γ . Enquanto que crianças vacinadas com a cepa Japão tiveram respostas imunes mais associadas com o perfil pró-inflamatório, como IL-1a, IL-1b, IL-6, em resposta ao CFP-10. Um estudo sobre o padrão de morte celular e produção intracelular de citocinas teve resultados que corroboraram com a imunogenicidade mais acentuada da cepa Moreau em relação às cepas tardias. Nos ensaios *in vitro*, a cepa Moreau foi capaz de induzir mais apoptose e estimular melhor produção de citocinas do tipo Th1, já relatadas como fundamentais na resposta imune a TB (PONTE et al., 2017).

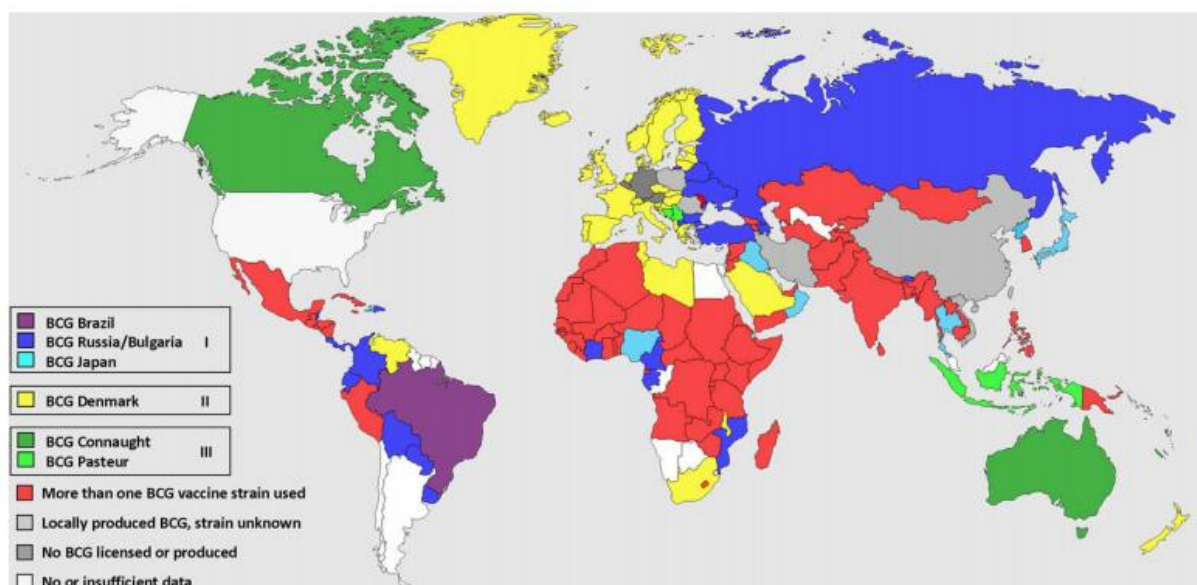


Figura 3. Distribuição das cepas de BCG no mundo entre 2003 e 2007. Fonte: (RITZ; CURTIS, 2009).

Corroborando a hipótese da variação entre as cepas, uma análise transcriptômica e proteômica realizada em 14 cepas de BCG demonstrou a existência de perfis metabólicos distintos, capazes de induzir adaptações na parede celular e, conseqüentemente, refletir na propriedade imunogênica dessas bactérias (ABDALLAH et al., 2015).

Estudos que comparem a resposta imune frente a vacinação com diferentes cepas de BCG são necessários para melhor compreensão das lacunas ainda existentes, já que a identificação de correlatos de proteção induzidos pela vacinação podem auxiliar no controle da TB (BEHR, 2002; PONTE et al., 2017; RITZ et al., 2008). No entanto, apesar de termos evidências suficientes que demonstrem a disparidade genotípica e fenotípica das cepas de BCG, ainda não foram realizadas avaliações suficientes capazes de determinar a superioridade de uma única cepa em relação às demais. A identificação de uma vacina mais imunogênica e protetora pode ter efeitos dramáticos no controle da doença em escala mundial, principalmente em crianças (RITZ et al., 2012b).

A crise na produção de diversas BCGs pelo mundo já teve seu reflexo no aumento da incidência de meningite tuberculosa em 2017 (DU PREEZ et al., 2019). Evidenciando esse problema, no ano anterior, a Fundação Atila Paiva (FAP) suspendeu a produção da BCG Moreau no Brasil devido a problemas nas “boas práticas de fabricação” (CERNUSCHI et al., 2018). Assim, devido à descontinuidade desta produção, o Brasil passou a utilizar, desde janeiro de 2018 a vacina BCG Rússia, desenvolvida na Serum Institute of India (SII). A substituição

da cepa vacinal do país foi reportada em 2017, no entanto, a produção local da BCG Moreau já foi reestabelecida.

2.5.2.1 BCG Moreau e BCG Russia

De acordo com análises genealógicas, as cepas BCG Moreau e BCG Russia são próximas e fazem parte das cepas iniciais, sendo ambas portanto, cepas imunogênicas (HAYASHI et al., 2009). Ambas se diferenciam das demais cepas por apresentarem um polimorfismo gênico (IS6110) próximo ao gene *phoP*, parte do sistema *phoP-phoR*, envolvido no metabolismo de fosfato (BROSCH et al., 2007). Tal mutação também foi associada a fatores de virulência lipídica da parede celular das bactérias, assim como no sistema ESX de secreção (LEUNG et al., 2008).

O genoma completo do BCG Moreau foi descrito em 2011 por Gomes e colaboradores (2011), sendo confirmada a deleção da RD16, característica da cepa quando comparada com o *Mtb*, a deleção nos genes *fadD26-ppsA* (976 pares de base), e a presença da duplicação em tandem DU2-I (referente a região IS6110) (GALVÃO et al., 2014; GOMES et al., 2011). A cepa brasileira vem sendo descrita como uma das mais imunogênicas e com menores taxas de efeitos adversos (BENÉVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005). Em 2008, Keller e colaboradores identificaram uma deleção mutação no gene *recA* da cepa BCG Russia, o que possivelmente confere uma maior estabilidade contra mutações posteriores. Em 2015, o genoma completo da BCG Russia foi publicado por Ludannyy e colaboradores. Outras características da BCG Russia, como a região DU2-I, a duplicação do IS6110, e a RDRussia, foram encontradas posteriormente em uma análise mais robusta (SOTNIKOVA et al., 2016). Atualmente, a BCG Russia é utilizadas em diversos países da Ásia, Europa, África, América do Central e do Sul (Figura 3) (LUDANNYY et al., 2015).

Considerando a ausência de estudos que utilizem os mesmos critérios e metodologias, Ritz e colaboradores (2012b) realizaram um estudo de avaliação de eficácia com três cepas tardias de BCG. A vacinação de neonatos com a cepa Russia induziu menor proporção de células T CD4+ polifuncionais (0,007%) do que os grupos vacinados com BCG Denmark (0,013%) e BCG Japão (0,016%). A supressão de *mce2A*, *mce2B*, *mce2C*, *mce2D*, *mce4A*, *yrbE4A* e *yrbE4B* foi encontrada em diversas cepas de ambos os grupos (cepas recentes e tardias), como BCG Pasteur, Moreau, Connaught e Frappier. Por outro lado, a expressão do gene regulador do operon *mce1*, o *mce1R*, esteve aumentada em todas as cepas, menos na BCG Russia (ABDALLAH et al., 2015). Segundo Casali, White e Riley (2006), a super-expressão

do gene regulatório está associado à menor atividade do operon *mce1*, e conseqüentemente, atenuação da cepa.

Em relação à cicatriz vacinal, nenhum estudo realizou a comparação direta da BCG Moreau e BCG Rússia. No entanto, a cicatriz é considerada como a confirmação de uma vacinação efetiva e, portanto, corresponde ao estado vacinal “positivo” (BIRK et al., 2017b; SANTIAGO et al., 2003). Além disso, a presença da cicatriz vacinal foi correlacionada com a positividade do teste tuberculíco em neonatos, sendo a maioria (72,9%) vacinada antes do sétimo dia pós nascimento (DHANAWADE et al., 2015).

Dessa maneira, apesar dos estudos descrevendo as similaridades entre as cepas BCG Moreau e BCG Rússia, é evidente que cada cepa possui suas particularidades. Entretanto, ainda não é possível assumir que essas diferenças entre as cepas sejam observadas *in vivo*, uma vez que quase não há avaliações simultâneas, e a divergência de metodologias impede uma interpretação mais complexa dos dados. É interessante que toda e qualquer oportunidade de comparação entre as cepas vacinais de BCG sejam exploradas ao máximo, visando um melhor entendimento sobre a imunidade protetora conferida, assim como possível superioridade de uma cepa sobre outra, e suas implicações nos programas de imunização.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a resposta imune celular de neonatos vacinados com BCG Russia e BCG Moreau.

3.2 ESPECÍFICOS

- I. Analisar o perfil de citocinas induzidas em culturas de sangue total após administração vacinal de BCG Moreau e BCG Russia.
- II. Comparar a produção de citocinas estimuladas por antígenos micobacterianos antes e após a vacinação com BCG Moreau e BCG Russia.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 DESENHO DE ESTUDO

Após alta hospitalar, neonatos saudáveis encaminhados para vacinação foram identificados e recrutados para o estudo (pré-BCG), mediante aceite dos responsáveis. A alocação dos neonatos nos grupos (BCG Moreau e BCG Russia) ocorreu de acordo com a disponibilidade de estoque das vacinas e rotina/demanda estabelecida pela maternidade. Durante o mês de dezembro de 2018, somente a vacina BCG Moreau foi aplicada, devido ao prazo limite de uso dos lotes vacinais. A partir de janeiro, os neonatos foram vacinados somente com BCG Russia. Por esses motivos, não foi possível realizar a randomização e cegamento do estudo.

Durante os três meses de acompanhamento, as visitas foram realizadas pela equipe técnica do projeto. Quando a visita local não foi possível, esta foi substituída por ligação aos pais. Ao final dos três meses, os neonatos foram reavaliados em uma visita realizada pela equipe da Fiocruz, onde nova amostra biológica foi obtida para repetição dos ensaios imunológicos (Pós-BCG; Figura 4).

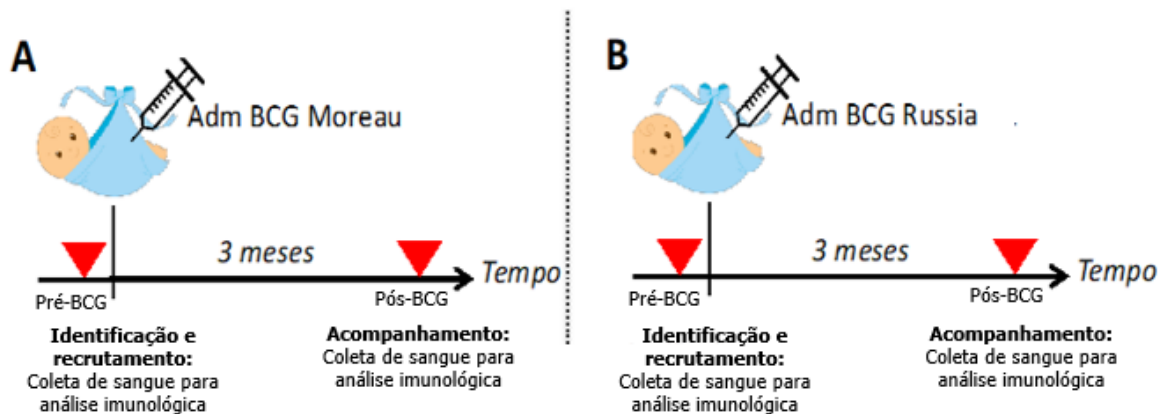


Figura 4. Desenho de estudo e grupos BCG Moreau (A) ou BCG Russia (B).

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi conduzido na Maternidade de Referência Professor José Maria de Magalhães Netto (Distrito Sanitário da Liberdade, rede pública de saúde do Estado da Bahia), no bairro do Pau Miúdo em Salvador, Bahia, sendo todas as análises laboratoriais executadas

no Instituto Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (IGM – Fiocruz Bahia). Considerando a dimensão local do estudo, todas as visitas domiciliares foram realizadas nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas.

4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população de estudo foi composta por neonatos, considerando os seguintes critérios de inclusão: nascidos entre 38^a e 41^a semana de gestação, sem patologias genéticas reportadas ou de outra natureza; com até 7 dias de vida; peso acima de 2kg; e ainda não vacinados com BCG; moradoras de Salvador ou Lauro de Freitas. Os critérios de exclusão utilizados foram: evidência de TB pulmonar ou extrapulmonar; mãe em uso de drogas imunomoduladoras durante a gravidez e/ou amamentação; mãe e/ou neonato com suspeita ou diagnóstico de imunodeficiência ou infecção por HIV; mãe com suspeita ou diagnóstico de doença crônica; neonato com suspeita ou diagnóstico de doença aguda e/ou crônica.

4.4 TAMANHO AMOSTRAL

Estipulou-se um universo amostral de conveniência coerente com o tempo, os custos e a viabilidade dos ensaios laboratoriais. Após finalização do acompanhamento e já considerando as perdas de seguimento, os neonatos foram avaliados em dois grupos de estudo:

BCG Moreau (n=6): neonatos vacinados com BCG Moreau.

BCG Russia (n=9): neonatos vacinados com BCG Russia.

4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os dados utilizados neste trabalho foram obtidos durante a realização do projeto intitulado: “Avaliação da efetividade da BCG Russia no Brasil”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), conforme o parecer nº 2.850.322, CAAE: 81681517.2.0000.5030. Seguindo a Resolução 466/12, todos os responsáveis pelos participantes do estudo foram esclarecidos verbalmente e por escrito sobre os objetivos do trabalho, sua forma de participação, possibilidades de reações adversas e complicações, procedimentos a serem seguidos nestes casos e formas de contato com o coordenador do estudo.

Todos os responsáveis pelos participantes atestaram sua concordância com o estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo estes assinados e arquivados no IGM sob a guarda do pesquisador proponente. Toda participação no estudo foi voluntária e os dados pessoais coletados durante o estudo serão mantidos em confidencialidade. Para isso, cada indivíduo recebeu um único número de identificação como participante do estudo.

4.6 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

4.6.1 Questionário

Após recrutamento dos neonatos, mediante concordância dos pais ou responsáveis legais sobre a participação no estudo e assinatura do TCLE, foi aplicado um questionário com o objetivo de coletar dados demográficos, idade, gênero, histórico médico, estado imunológico, fatores de risco, vacinação prévia com BCG. Os voluntários foram acompanhados semanalmente para identificar possíveis eventos adversos e verificação do processo de cicatrização pós-vacina. Os dados foram registrados em *tablets* com sistema digital de informação programados para incluir todos os dados desde o momento inicial do estudo até o final do acompanhamento.

4.6.2 Coleta de sangue e vacina BCG

Após aplicação do TCLE e questionário, foi realizada uma punção venosa para coleta de aproximadamente 2mL de sangue em tubo com heparina. As amostras coletadas na maternidade foram levadas pela equipe do projeto à Fiocruz em um período máximo de duas horas em acondicionamento ambiente, e processadas conforme protocolo de cultura de sangue total (item 4.6.3) no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), em até três horas após a coleta.

As cepas de BCG foram fornecidas pela Secretaria Municipal de Saúde do Município de Lauro de Freitas, e administradas na sala de vacina da Maternidade de Referência Magalhães Neto. Todas as vacinas foram mantidas em condição padronizadas de refrigeração (2 a 8°C) e armazenamento máximo de 6 horas após abertura do vial. A vacina foi aplicada sob via intradérmica na região do músculo deltoide, sendo 0,1ml de BCG Moreau e 0,05ml de BCG Rússia, de acordo com as normas dos respectivos fabricantes. A escolha da cepa vacinal foi realizada de acordo com

o dinâmica semanal de vacinação do hospital. Além disso, dados relacionados ao desenvolvimento de TB nos bebês incluídos no estudo, assim como a correlação entre doença e formação de cicatriz vacinal, poderão ser publicados futuramente após finalização da coorte epidemiológica.

4.6.3 Cultura de sangue total

Sangue venoso foi diluído 1:5 em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antimicótico/antibiótico. O volume total diluído foi distribuído em uma placa de 96 poços com fundo U, 200µL/poço, conforme descrito na literatura (SMITH et al., 2017). Dependendo do volume sanguíneo disponível, 8 poços foram estimulados nas seguintes condições experimentais: controle negativo (CN: sem estímulo, apenas sangue total diluído em RPMI), Mtb (H37Rv-inativo por calor) e BCG (Moreau ou Russia). Após um período de 72 horas de incubação à 37°C em estufa com 5% de CO₂, os sobrenadantes de cultura de cada condição foram coletados, distribuídos em duas alíquotas e armazenadas à -20°C, para posterior quantificação de citocinas. As hemácias depositadas no fundo dos poços foram lisadas com *Red Blood Cell Lysis Buffer* (NH₄Cl, KHCO₃ e EDTA-2Na) preparado *in house* e lavadas posteriormente com salina 0,9%.

As cepas vacinais BCG Moreau (FAP) e BCG Russia (SII) foram reconstituídas de acordo com as instruções da bula e diluídas em meio de cultura RPMI suplementado para ajuste de concentração (2×10^3 bacilos/mL). Experimentos de padronização foram realizadas para determinação da concentração ideal de bacilos utilizadas nos ensaios de cultura de sangue total. Para avaliação da possível resposta protetora induzida pela vacinação com BCG contra a infecção pelo agente causador da doença, também foram realizadas culturas de sangue total na presença de 2×10^3 bacilos de Mtb inativados por calor (H37Rv-HK) (SHEY et al., 2014). Os leucócitos totais recuperados após a coleta do sobrenadante das culturas e lise das hemácias foram criopreservados para análises imunofenotípicas posteriores

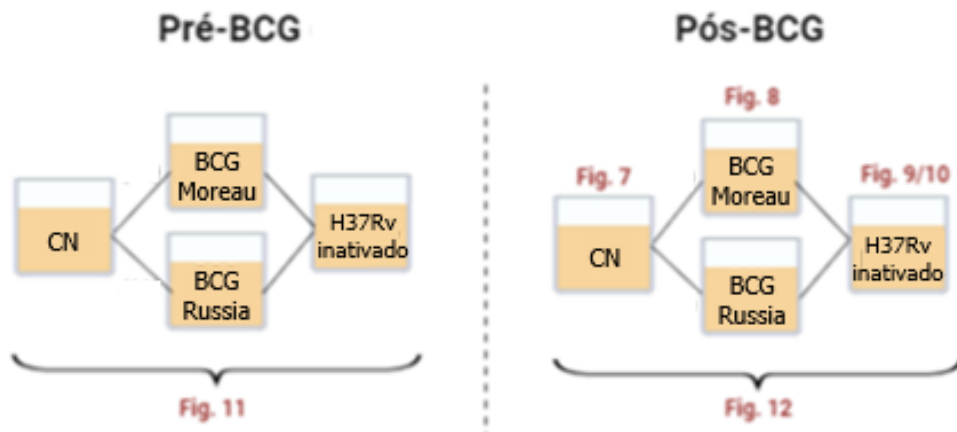


Figura 5. Esquema metodológico dos ensaios in vitro de culturas de sangue total. Em vermelho: figura corresponde aos dados de cada condição. CN: controle negativo.

4.6.4 Quantificação de citocinas por ensaio de citometria com microesferas

A quantificação de citocinas foi realizada nas amostras de sobrenadantes de culturas, com a utilização do kit BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Biosciences, San Diego, CA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Foi utilizado um volume de 50µL de cada amostra no ensaio, para quantificação de IL-2 (limite de detecção: 2,6pg/mL), IL-4 (4,9 pg/mL), IL-6 (2,4 pg/mL), IL-10 (4,5 pg/mL), IFN-γ (3,7 pg/mL), TNF (3,8 pg/mL) e IL-17A (18,9 pg/mL). Todas as amostras (pré-BCG e pós-BCG) foram processadas simultaneamente em um mesmo experimento para evitar variação interexperimental.

4.6.5 Avaliação do processo de cicatrização da lesão vacinal

O local de aplicação da vacina foi avaliado e medido periodicamente até a 12ª semana de acompanhamento ou até a formação da cicatriz. A lesão foi medida com auxílio de uma fita métrica e registrada com fotos. Foi definida como reação normal à vacina, uma induração com ou sem vermelhidão ao redor, com diâmetro menor que 10mm. Todas as fotos foram realizadas usando um tablet (modelo utilizado para preenchimento dos questionários digitais) ou celular, sendo o backup atualizado semanalmente e armazenado no ISC-UFBA sob proteção da equipe coordenadora do estudo. Posteriormente, as fotos foram classificadas de acordo com o grupo ao qual o RN foi incluído e sua identificação no estudo. As fotos foram nomeadas com a data de registro, número de identificação do questionário de cada RN, número da semana (entre T0 – pré vacinação e S24 – 24 semanas pós vacinação), e número da versão da foto.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram organizados digitalmente em uma planilha Excel (Microsoft Excel 2016) e analisados usando o programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Variáveis categóricas e numéricas, foram descritas em tabelas através da frequência absoluta (n), relativa (%) e mediana (medida de tendência central) e intervalo-interquartil (IQR; medida de dispersão), respectivamente. Gráficos tipo *dotplot* foram utilizados para avaliar a quantificação e comparação das citocinas produzidas pelos RNs dos grupos BCG Moreau e BCG Russia, em diferentes tempos. Para avaliar a distribuição da amostra, foi realizado o teste *D'agostino-Pearson*. O teste *Wilcoxon* foi usado para para avaliar a significância estatística de amostras não paramétricas entre dois grupos pareados, e o teste *t-student*, para amostras paramétricas entre dois grupos não pareados. Para comparação de amostras não paramétricas, entre três ou mais grupos não pareados foi usado o teste *Kruskal-Wallis*. Variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste Exato de *Fisher*. A significância estatística foi determinada a partir de valores de $p < 0,05$. Nos gráficos, os valores de p significativos foram descritos usando asteriscos: $<0,05^*$, $<0,01^{**}$, $<0,001^{***}$ e $<0,0001^{****}$.

5 RESULTADOS

5.1 FLUXOGRAMA DO ESTUDO E AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA DOS RECÊM-NASCIDOS.

Entre dezembro de 2018 e janeiro de 2019, 36 neonatos vacinados com BCG foram recrutados para o estudo. De acordo com a disponibilidade de lote vacinal e rotina/demanda da maternidade, ou seja, não randomizada, os neonatos foram alocados em dois grupos: BCG Moreau e BCG Russia. Dos 36, 13 (36,1%) RNs foram excluídos devido a coleta venosa sem sucesso ou coleta insuficiente de sangue. Dentre os 23 neonatos restantes, sete foram vacinados com a cepa Moreau, e 16 com a cepa Russia. Após uma perda de seguimento de oito neonatos, foram acompanhados seis (16,7%) neonatos vacinados com a cepa Moreau e nove (25%) vacinados com a cepa Russia (Figura 6).

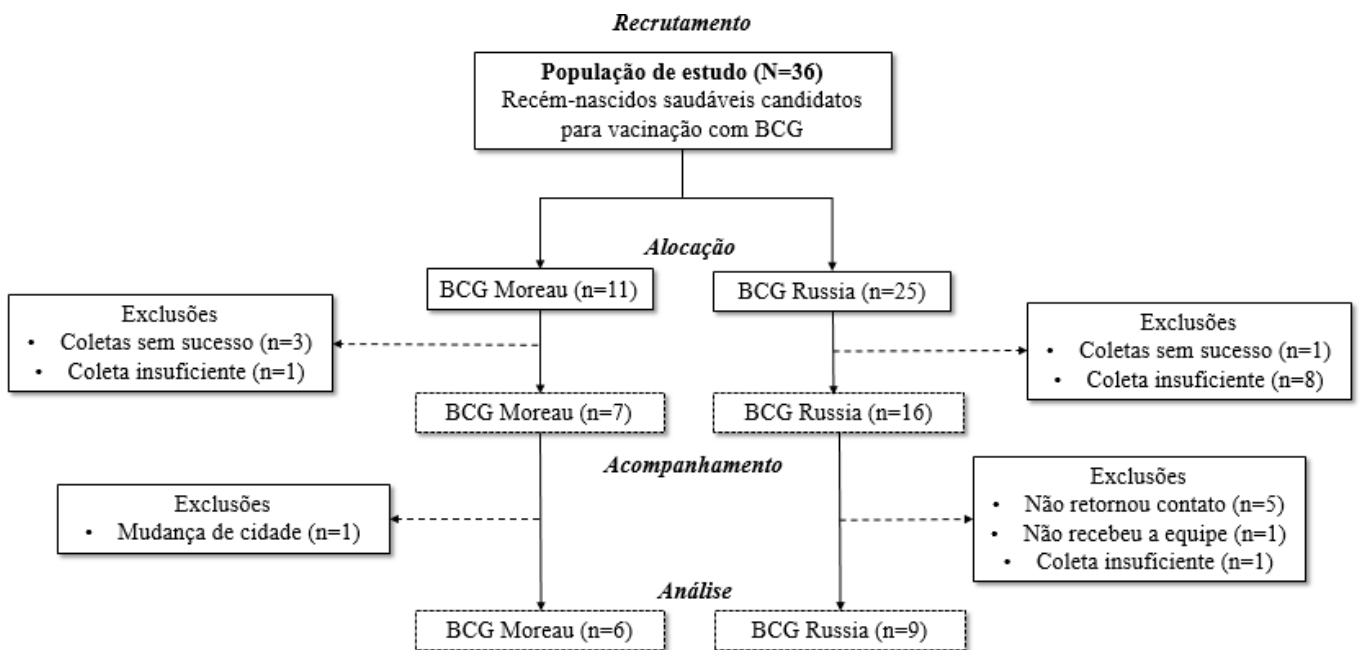


Figura 6. Fluxograma de população de estudo.

As informações coletadas através dos questionários foram descritas na Tabela 2. Apesar do recrutamento ter sido feito em livre demanda, não houve diferença estatística entre as características avaliadas nos dois grupos, como sexo genital, peso, comprimento ao nascer e idade.

Quanto à avaliação de imunização materna, foi observada a presença ou ausência da cicatriz vacinal da BCG em ambos os membros superiores. A cicatriz esteve presente em 4

(66,6%) das mães dos RNs do grupo BCG Moreau e em 6 (66,6%) mães de RNs do grupo BCG Russia. Além disso, três mães (de neonatos vacinados com BCG Moreau) reportaram contato prévio com pacientes diagnosticados com TB, sem definição sobre o tipo de contato e duração.

Tabela 1. Características demográficas de neonatos imunizados com BCG.

Variável	Recém-nascidos		Valor de p
	BCG Moreau n (%)	BCG Russia n (%)	
N (%)	6 (40)	9 (60)	
Sexo, n (%)			
Feminino	4 (66,6)	3 (33,3)	0,314 ^a
Masculino	2 (33,3)	6 (66,6)	
Idade (dias) ± DP	3,5 ± 1,1	3,1 ± 1,0	0,424 ^b
Peso (g) ± DP	3080,0 ± 326,7 [#]	3310 ± 525,9	0,354 ^b
Comprimento (cm) ± DP	48,5 ± 1,29 ^{&}	49,1 ± 3,7 [#]	0,657 ^b
Cicatriz vacinal materna (%)	4 (66,6) ^{&}	6 (66,6) [§]	>0,999 ^b
Contato materno TB (%)			
Sim	3 (75)	0 (0)	0,033^a
Não	1 (25)	6 (100)	

[#]Dado de 1 participante não disponível. [&]Dado de 2 participantes não disponíveis. [§]Dado de 3 participantes não disponíveis.

^a Teste Exato de Fisher

^b Teste *t-student* não pareado

5.2 PRODUÇÃO BASAL DE CITOCINAS EM NEONATOS VACINADOS COM BCG.

A resposta imune basal dos neonatos foi avaliada através da detecção de citocinas dos sobrenadantes de culturas não estimuladas (CN) nos momentos pré-BCG e pós-BCG. Após três meses, o grupo vacinado com BCG Moreau apresentou aumento na produção das citocinas IL-2, IL-10, características de uma resposta menos inflamatória e mais regulatória. Em contrapartida, nenhuma mudança foi detectada no perfil de citocinas no grupo vacinado com BCG Russia. Não houve nenhuma diferença em relação às demais citocinas (Figura 7).

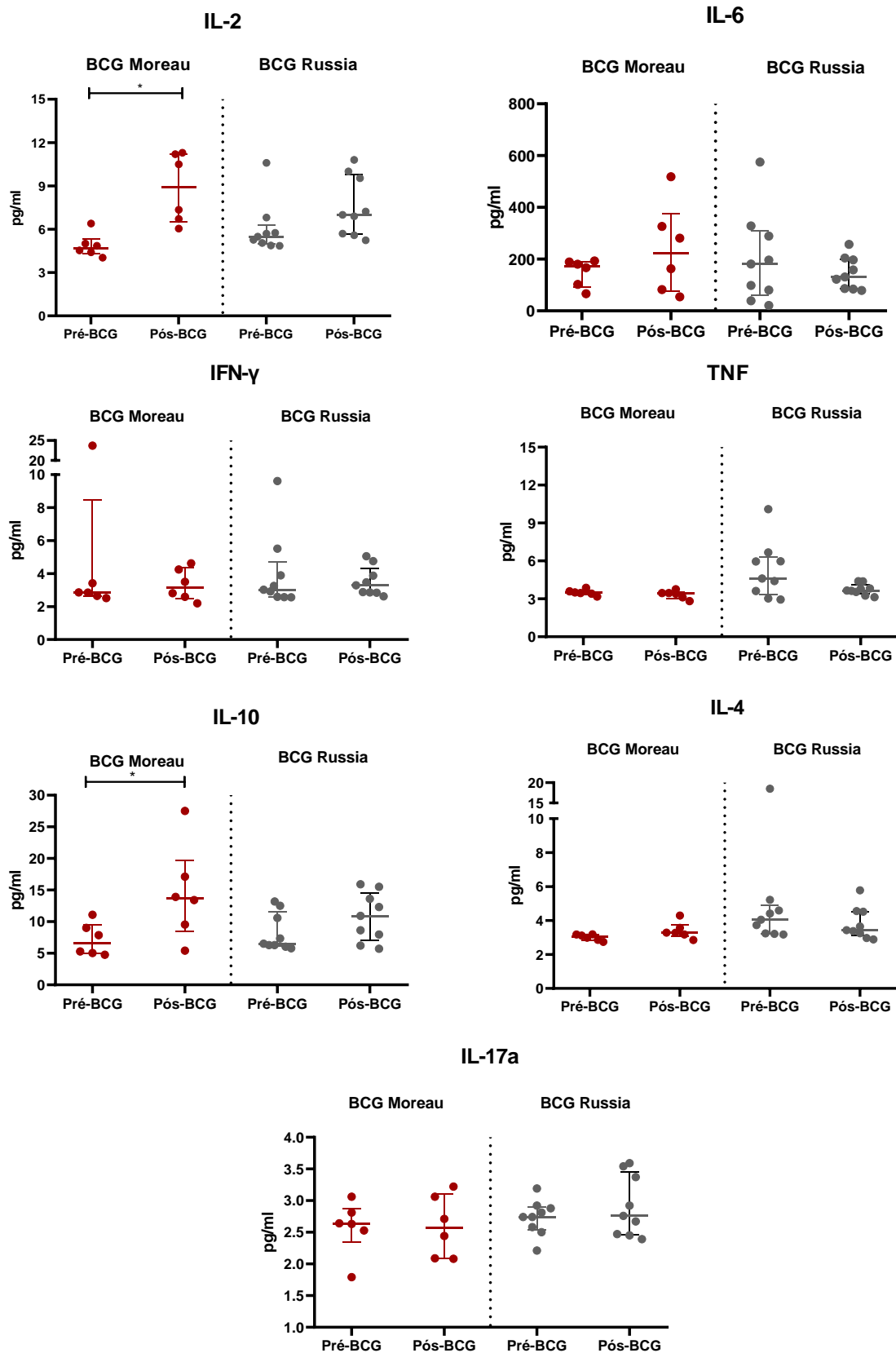


Figura 7. Produção basal de citocinas em neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia.

Teste Wilcoxon * $p < 0,05$.

5.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA VACINAÇÃO COM BCG

A vacinação com BCG estimulou a produção de IL-2 (Moreau, $p = 0,031$ e Rússia, $p = 0,003$) e IFN- γ (Moreau, $p = 0,031$ e Rússia, $p = 0,003$) em ambos os grupos. Embora também tenha sido observado um aumento na detecção de IL-6 ($p = 0,003$), TNF ($p = 0,003$) e IL-10 ($p = 0,003$) após vacinação com BCG Rússia, os níveis dessas citocinas foram mais altos no grupo Moreau (sem significância estatística). As citocinas IL-4 e IL-17a não tiveram alteração (Figura 8).

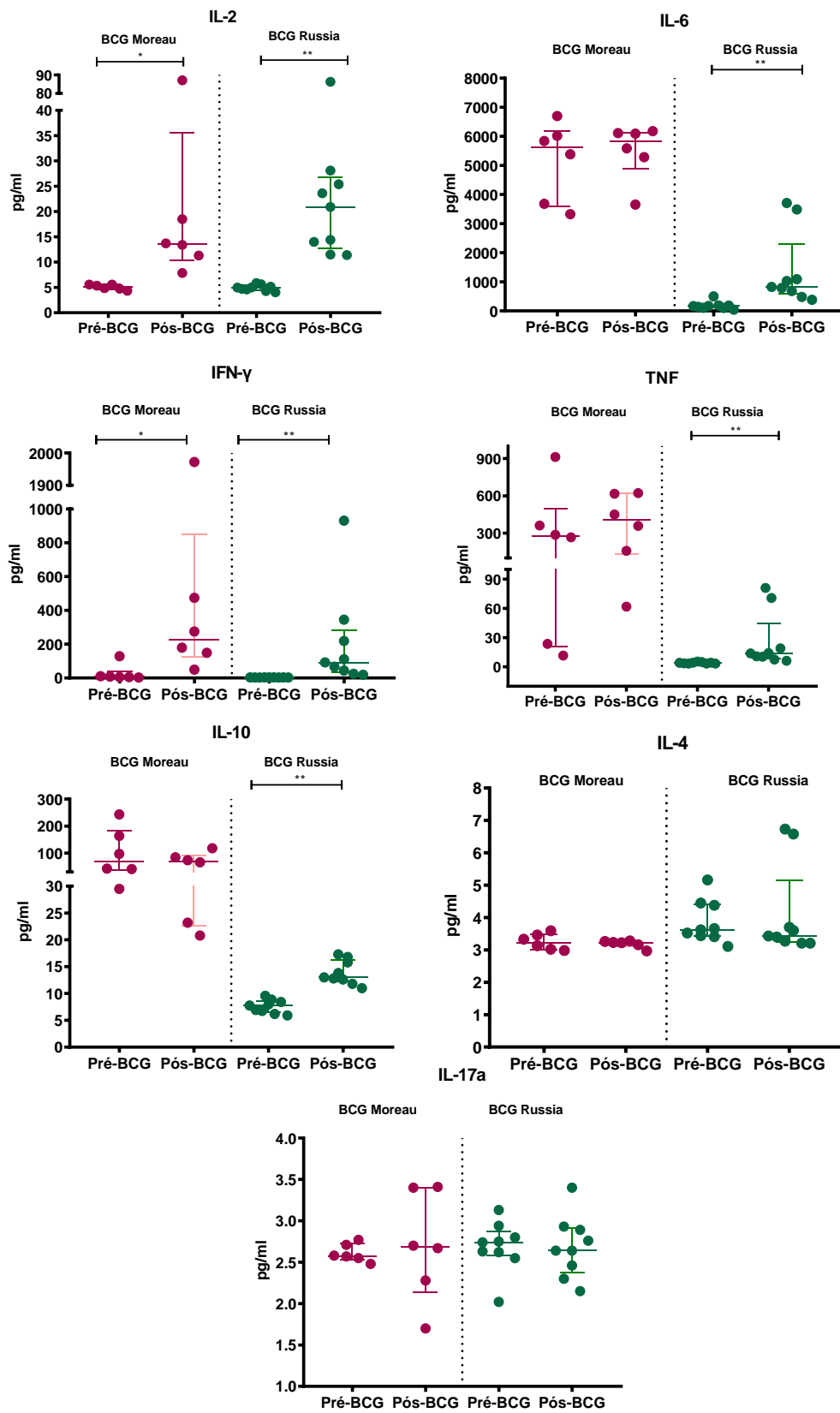


Figura 8. Produção de citocinas induzidas pela vacinação com BCG Moreau e BCG Russia. Teste Wilcoxon * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS MTB-ESPECÍFICAS EM NEONATOS VACINADOS COM BCG

A resposta imune específica ao Mtb foi avaliada em cultura de sangue total na presença de H37Rv inativado pelo calor (H37Rv-HK). Considerando que nem todas as amostras do grupo BCG Russia foram testadas nessa condição, somente os experimentos realizados com o antígeno foram incluídos.

Como mostrado na Figura 9, ambas as cepas vacinais induziram níveis elevados de IL-6, citocina característica de resposta inflamatória aguda, seguida de TNF, IFN- γ e IL-10. Demais citocinas foram detectadas em níveis mais baixos. Além disso, em nenhum dos dois grupos avaliados o estímulo *in vitro* com H37Rv-HK induziu diferença entre os momentos pré e pós-BCG, com exceção da IL-2 ($p = 0,031$), aumentada após a vacinação com a cepa Moreau. Apesar de ser possível observar uma discreta variação em outras citocinas, nenhuma apresentou significância estatística (Figura 10).

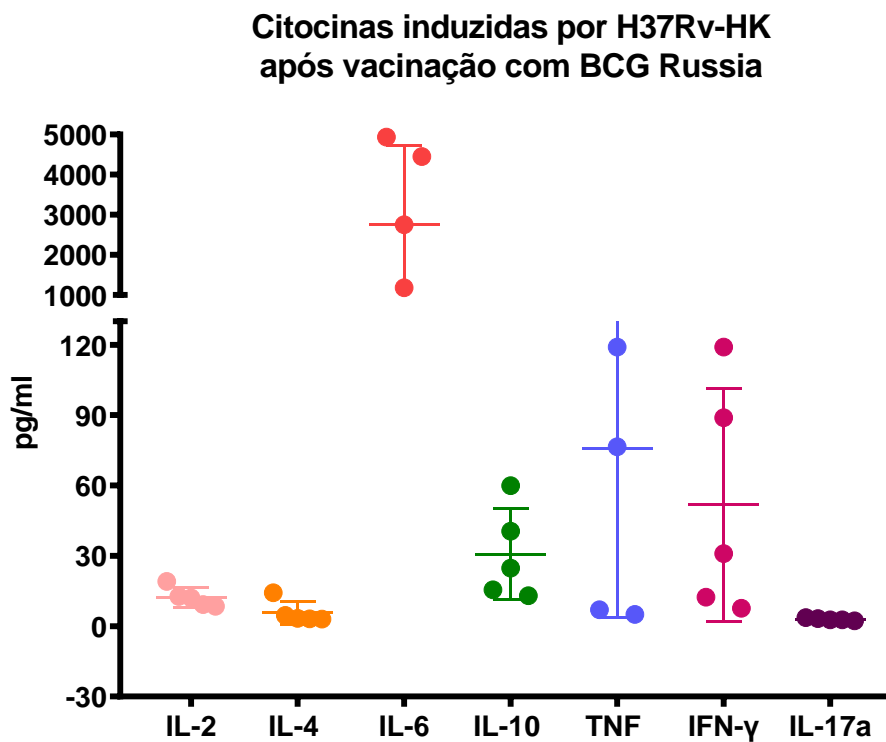
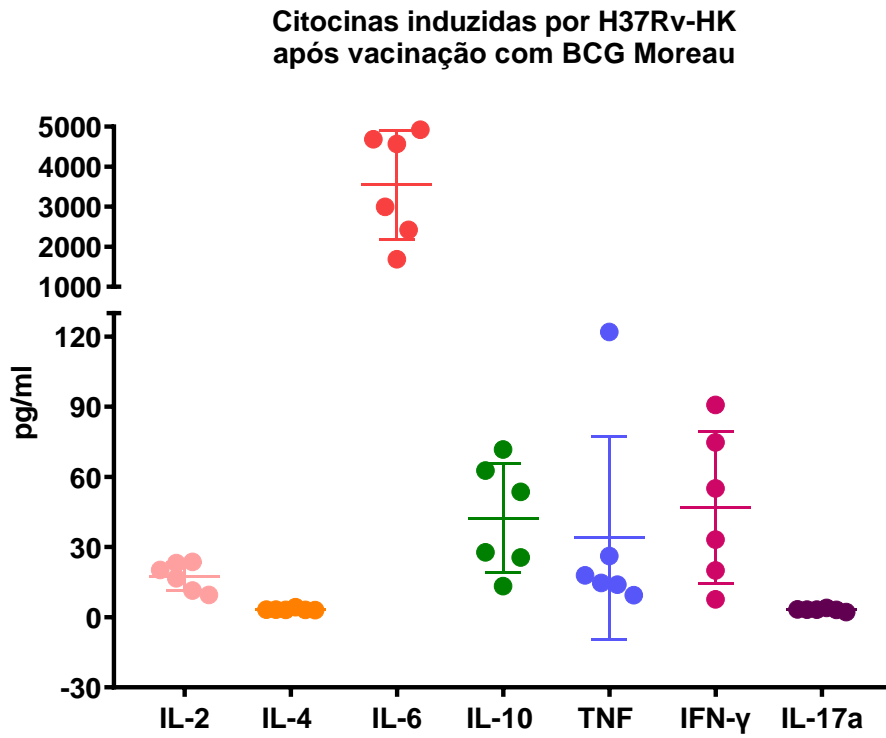


Figura 9. Avaliação comparativa entre as concentrações de citocinas induzidas por Mtb no sobrenadante de cultura de sangue total dos neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia.

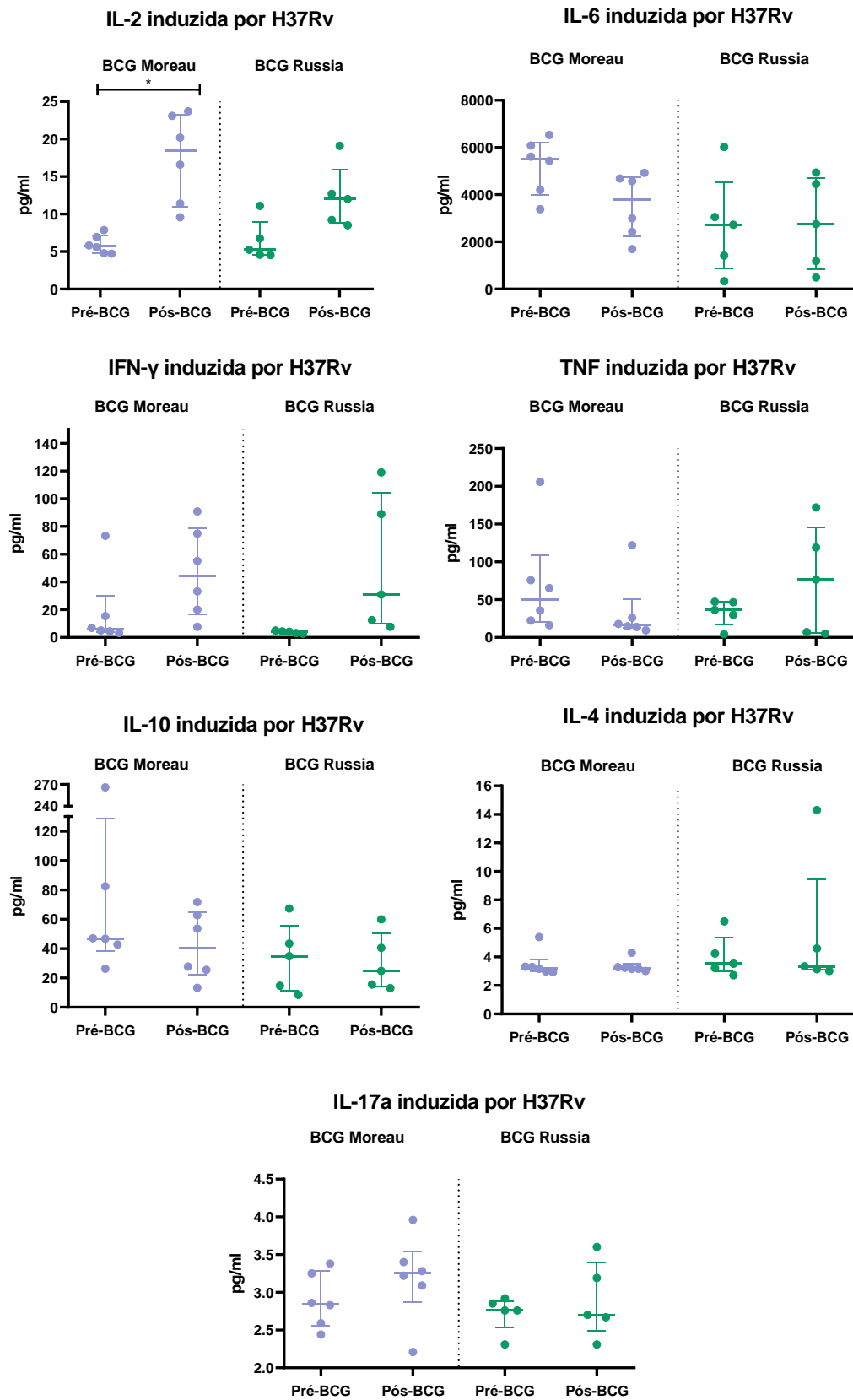


Figura 10. Produção de citocinas Mtb-específicas em neonatos vacinados com BCG. Teste Wilcoxon * $p < 0,005$.

5.5 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA RESPOSTA IMUNE DE NEONATOS VACINADOS COM BCG.

A partir da comparação dos resultados obtidos na quantificação de citocinas, foi possível avaliar os padrões de resposta imune nas diferentes condições de estímulo celular *in vitro*. Diferentemente das análises anteriores que consideraram o pré e pós-BCG em um mesmo gráfico, aqui, a produção de citocinas foi mostrada separadamente. Dessa maneira, observa-se o padrão precoce de citocinas estimuladas em recém-nascidos pouco tempo após o nascimento (pré-BCG) e após um período de maturação do sistema imune (pós-BCG). As dosagens foram comparadas na ausência ou presença de antígenos micobacterianos (CN, BCG Moreau ou BCG Russia e H37Rv-HK), e apresentadas nas Figuras 11 e 12. Os dados foram descritos individualmente para cada RN vacinado com BCG Moreau e BCG Russia, nas Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente. Para avaliar a imunidade induzida pela BCG, as culturas foram realizadas com a cepa de BCG correspondente à cepa vacinal administrada.

Após o nascimento, foi possível observar um comportamento semelhante das citocinas IL-6, TNF e IL-10. No pré-BCG, foi observada maior resposta ao estímulo com a cepa Moreau (IL-6, $p = 0,0202$, TNF, $p = 0,001$, e IL-10, $p = 0,009$) e H37Rv (IL-6, $p = 0,157$, TNF, $p = 0,008$, e IL-10, $p = 0,093$) quando comparadas com o CN. A produção de IL-6 ($p = 0,005$) e IL-10 ($p = 0,015$) pós estímulo com H37Rv foi mais alta do que o estímulo vacinal com a cepa Russia (Figura 11).

Após a vacinação, destaca-se uma resposta inflamatória mais acentuada no grupo Moreau, com aumento na detecção de IL-6 ($p = < 0,001$), TNF ($p = < 0,001$), IFN- γ ($p = < 0,0004$) e IL-10 ($p = 0,0481$), quando comparadas com o CN. Em contrapartida, a vacinação com BCG Russia induziu uma maior produção de IFN- γ ($p = 0,0015$), exclusivamente. O estímulo com H37Rv também foi capaz de induzir níveis mais elevados de IL-6 ($p = 0,0243$) e TNF ($p = 0,0150$) pós vacinação com a cepa Moreau; em resposta à cepa Russia, houve aumento em IL-2 ($p = 0,0002$) e IL-6 ($p = 0,0223$). Não foi detectada nenhuma alteração de IL-4 e IL-17a frente aos estímulos testados (Figura 11).

Tabela 2. Descrição numérica da produção de citocinas dos neonatos vacinados com BCG Moreau em diferentes condições de cultura *in vitro*.

ID	Antígeno	IL-2		IL-4		IL-6		IL-10		TNF		IFN- γ		IL-17a	
		T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
RN3	CN	5,01	11,3	2,86	3,28	167	518	9,02	13,4	3,46	3,45	23,7	2,2	2,53	2,71
	BCG M	5,58	18,5	3,13	3,28	6698	6180	243	84,1	913	358	129	179	2,48	3,41
	H37Rv	7,86	23,7	3,17	3,16	6531	2994	266	27,7	75,7	13,9	73,2	7,62	3,25	3,22
RN4	CN	4,53	6,04	3,11	3,18	189	281	11,1	27,5	3,87	3,45	2,86	2,81	2,63	3,22
	BCG M	5,35	13,4	3,46	3,23	6020	6109	164	118	287	622	2,87	474	2,77	2,67
	H37Rv	5,59	16,6	3,32	4,29	5428	4570	82,4	71,7	65,4	17,9	3,29	33,2	2,83	3,96
RN6	CN	4,4	6,71	3,19	4,29	66	82,6	5,03	5,42	3,59	3,41	2,51	4,25	2,81	3,06
	BCG M	4,34	7,86	3,33	3,16	5838	3654	97	20,8	266	61,8	7,85	49,7	2,58	2,28
	H37Rv	4,72	11,4	3,29	3,24	5612	4926	42,7	53,6	35,6	26,2	4,38	20	2,86	3,09
RN7	CN	4,03	7,35	2,74	2,85	102	54,5	4,77	9,53	3,18	2,82	2,65	2,59	2,64	2,09
	BCG M	5,57	87,1	3,02	3,22	5383	5586	41	23,2	361	617	10,5	1972	2,55	2,7
	H37Rv	5,83	23,1	2,98	3,02	6084	1689	46,7	13,3	206	14,7	15,4	90,8	2,44	3,4
RN8	CN	6,39	11,2	3,18	3,29	193	163	5,28	17,1	3,41	3,12	3,41	3,5	1,79	2,44
	BCG M	4,74	11,3	3,59	3,26	3323	6094	29,5	73,7	11,5	158	4,87	275	2,57	3,4
	H37Rv	6,95	20,2	5,39	3,16	3385	2425	26,2	25,5	16,2	9,4	6,84	55,1	3,38	2,21
RN9	CN	4,85	10,5	2,99	3,57	180	326	7,86	13,9	3,5	3,76	2,85	4,62	3,06	2,08
	BCG M	4,85	13,7	2,98	2,97	3682	5284	42,6	65,6	23,6	450	4,99	149	2,71	1,7
	H37Rv	4,78	9,57	2,93	3,28	4204	4685	47	62,7	22,3	122	5,09	74,8	2,59	3,28

ID: identificação; CN: controle negativo; BCG M: BCG Moreau; T0: pré-BCG; T1: pós-BCG.

Tabela 3. Descrição numérica da produção de citocinas dos neonatos vacinados com BCG Rússia em diferentes condições de cultura *in vitro*.

ID	Antigen	IL-2		IL-4		IL-6		IL-10		TNF		IFN- γ		IL-17a	
		T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
RN17	CN	5,05	5,59	4,41	2,89	98,2	84,6	5,8	12,3	3,62	3,13	3,89	2,84	2,92	2,47
	BCG R	5	14,4	5,16	3,6	102	786	8,86	11	3,37	7,48	3,59	44	2,63	2,46
	H37Rv	5,23	12	2,72	3,14	6023	489	67,3	15,5	47,2	5,02	4,91	7,62	2,31	2,7
RN20	CN	5,49	5,23	3,24	3,65	20,7	86,3	7,34	7,97	4,4	3,26	2,56	2,62	2,81	2,39
	BCG R	5,15	11,5	3,52	3,21	44,2	382	7,96	12,6	3,37	14,1	2,81	18,9	2,02	2,15
	H37Rv	4,53	8,5	3,53	3,34	2723	1180	43,4	13	36,3	7,04	4,37	12,4	2,76	2,31
RN21	CN	5,27	9,54	3,73	5,78	38,9	158	6,05	13,6	2,94	4,38	2,57	5,05	2,74	2,76
	BCG R	5,88	20,9	4,38	6,58	136	1027	8,43	12,8	3,59	19	3,16	219	2,94	2,76
	H37Rv	11,1	19,1	4,24	4,59	3053	4936	34,8	40,5	29,9	119	3,16	119	2,76	3,19
RN22	CN	6,81	6,9	3,21	3,25	289	122	10,6	15,5	5,96	3,63	2,59	2,86	2,88	2,45
	BCG R	4,28	25,4	3,41	3,7	167	824	6,75	15,8	4,09	10,7	2,86	111	2,8	2,93
	H37Rv	4,57	9,22	3,22	3,02	331	4451	8,43	24,7	4,35	172	2,68	88,9	2,92	2,67
RN23	CN	5,75	10,8	3,18	4,56	575	78,8	12,5	6,22	5,97	3,82	3,02	4,76	2,21	3,59
	BCG R	4,98	23,6	3,44	6,73	186	686	7,76	13	5,38	13,7	2,88	92,6	2,55	3,4
	H37Rv	6,74	12,7	6,49	14,3	1414	2750	14,6	59,9	46,6	76,5	4,13	30,9	2,85	3,6
RN27	CN	5,7	10	5,22	3,43	196	197	6,29	10,9	4,61	3,79	5,51	3,29	2,74	3,54
	BCG R	4,04	86,3	3,62	3,27	497	3711	5,92	17,3	4,81	70,7	3,12	931	2,74	2,64
	H37Rv	4,5	172	4,19	3,62	6321	6196	455	323	1016	663	4,35	1506	2,57	3,11
RN29	CN	10,6	7,23	18,5	4,52	80	131	13,2	15,9	6,67	3,65	9,61	3,87	3,19	3,37
	BCG R	5,61	14	4,45	3,43	183	480	9,58	16,8	4,2	6,24	3,53	24,6	2,75	2,3
	H37Rv	5,91	22,7	5,54	3,21	6208	5713	249	247	49	218	5,31	143	2,67	2,59
RN31	CN	4,87	7	4,05	3,38	181	204	6,28	8,63	3,03	3,55	2,92	2,88	2,5	2,92
	BCG R	4,71	11,4	3,11	3,4	169	1092	6,93	11,8	3,33	10,4	2,55	66,7	2,62	2,89
	H37Rv	7,02	11,9	6,93	3,12	6106	6256	269	647	352	846	12,1	870	2,74	2,76
RN36	CN	4,85	5,69	4,59	2,97	328	257	6,52	5,72	10,1	4,39	3,25	3,47	2,58	2,67
	BCG R	4,6	28,1	3,66	3,21	107	3488	6,19	13,8	4,22	81	3,51	345	3,13	2,64
	H37Rv	4,28	36,3	3,45	3,39	6386	6252	424	483	804	1310	3,16	1406	2,57	3,05

ID: identificação; CN: controle negativo; BCG R: BCG Rússia; T0: pré-BCG; T1: pós-BCG.

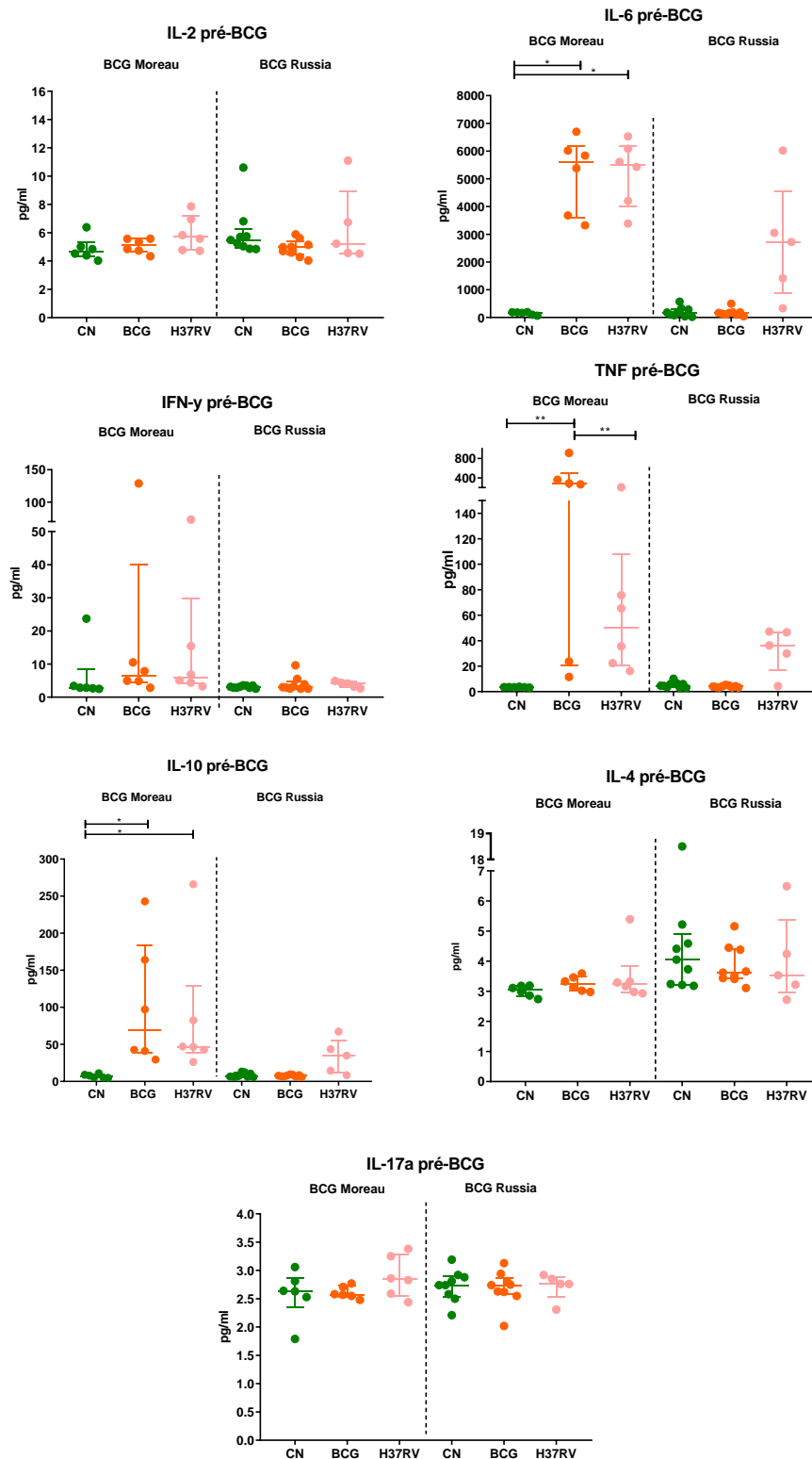


Figura 11. Avaliação comparativa da produção precoce (pré-BCG) de citocinas em neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia, em diferentes condições. CN: controle negativo; BCG: BCG Moreau ou BCG Russia, respectivamente; H37Rv: H37Rv-HK. Teste Kruskal-Wallis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

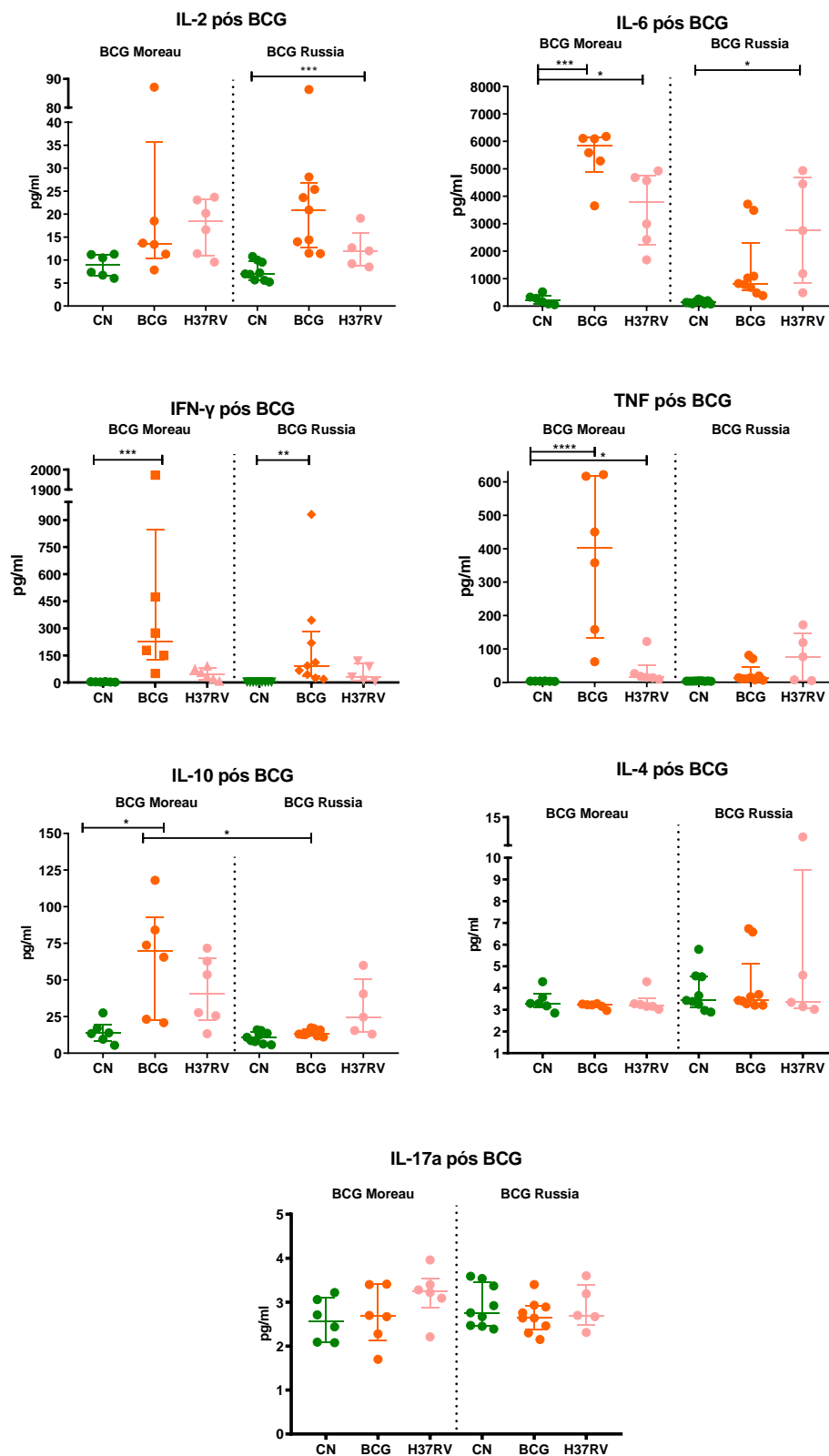


Figura 12. Avaliação comparativa da produção de citocinas em neonatos vacinados com BCG Moreau e BCG Russia em diferentes condições, após a vacinação (pós-BCG). CN: controle negativo; BCG: BCG Moreau ou BCG Russia, respectivamente; H37Rv: H37Rv-HK. Teste Kruskal-Wallis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.6 FORMAÇÃO DE CICATRIZ VACINAL

Durante o período de acompanhamento dos neonatos, 197 fotos foram documentadas. Do total, oito RNs tiveram fotos do momento pré e pós-BCG, sendo três do grupo Moreau e cinco do Rússia (Figura 13 e Figura 14, respectivamente).

No pré-BCG, observou-se a formação de uma pequena pápula em decorrência da introdução do líquido vacinal sob via intradérmica, característica da vacinação. No entanto, a pápula formada no RN07 foi menos definida do que nos outros dois apresentados do grupo Moreau, e o RN31 não apresentou pápula, somente um ponto diminuto de sangramento. Todos os demais exibiram os aspectos esperados, considerando ambos os grupos.

De maneira geral, a vacinação foi bem tolerada e a lesão apresentou evolução normal, desde formação do nódulo inicial, papula, pústula, úlcera e crosta. RNs dos dois grupos progrediram para a resolução da lesão com formação da cicatriz característica da BCG. Contudo, é possível evidenciar uma menor extensão da cicatriz vacinal nos RN17, 20 e 31 (BCG Rússia), tendo este último apresentado resolução completa da lesão sem formação de cicatriz após 24 semanas (Figura 14).

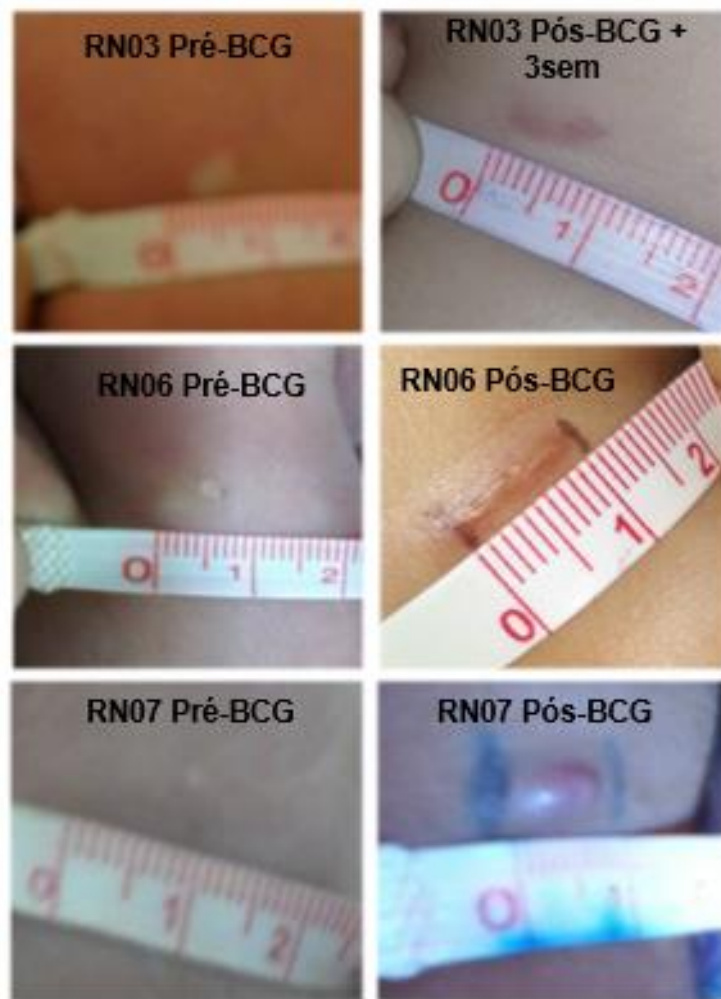


Figura 13. Evolução da lesão vacinal de BCG Moreau pré e pós-BCG.

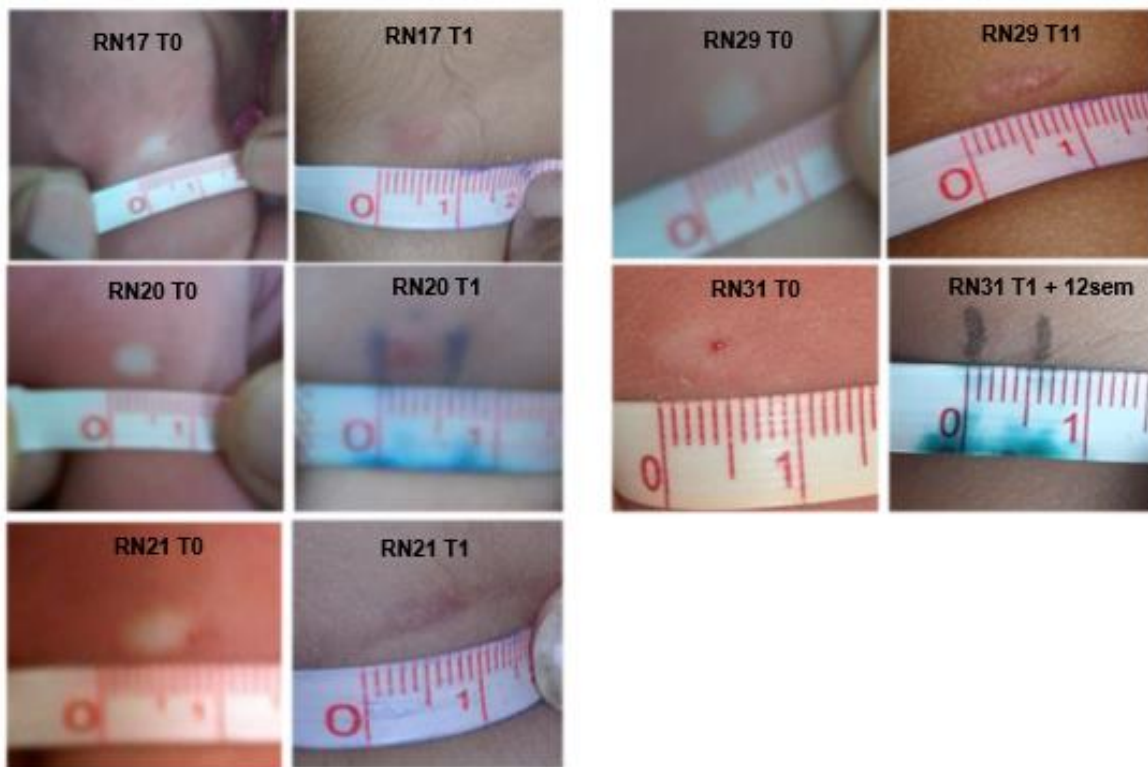


Figura 14. Evolução da lesão vacinal de BCG Russia pré e pós-BCG.

5 DISCUSSÃO

A eficácia variável da BCG vem sendo discutida há muito anos e diversos fatores parecem influenciar sua resposta imune protetora. Dentre as possíveis explicações, destacam-se as diferenças genéticas entre as cepas vacinais, que afetam seus metabolismos e imunogenicidade. No entanto, a avaliação dessa hipótese se torna complexa e de difícil manejo em um cenário global, principalmente devido às diferentes metodologias utilizadas para avaliação de eficácia, local e população de estudo, variação dos níveis de exposição à micobactérias ambientais, assim como, a utilização de diferentes cepas de BCG. No Brasil, a substituição da cepa Moreau pela Rússia abriu caminho para a realização de uma análise imunológica comparativa entre duas cepas de BCG (ANTAS; FLORES-VALDEZ; SHANN, 2018), extremamente necessária para a identificação e validação de correlatos de proteção (SATTI; MCSHANE, 2019).

Apesar dos esforços em diminuir a influência de vieses neste estudo, é possível que alguns fatores tenham limitado as interpretações aqui realizadas. Embora o tamanho amostral tenha sido reduzido, é importante considerar que, ainda assim, a realização dos cálculos estatísticos foi possível com a maioria dos dados quantitativos. Além disso, os hábitos alimentares (com ou sem suplementação) e a continuidade da amamentação não foram documentados. Segundo Pabst e colaboradores (1989), a amamentação de bebês vacinados com BCG após o nascimento aumentou significativamente a resposta imune mediada por células, mas não teve efeito algum nos bebês vacinados após um mês do nascimento.

A não realização do hemograma após o nascimento impediu a contagem estimada dos leucócitos circulantes no sangue venoso dos bebês. Consequentemente, a quantidade de células interagindo *in vitro* com os estímulos antigênicos utilizados na cultura de sangue total pode ter sido diferente entre os participantes, levando a uma maior ou menor intensidade de resposta imunológica. Da mesma forma, a separação de células mononucleares do sangue periférico (do inglês “PBMC”) se tornou inviável devido ao volume extremamente reduzido de material biológico coletado. Como já descrito na literatura, a realização de cultura de sangue total se mostra uma ótima alternativa nesses casos (DEENADAYALAN; MADDINENI; RAJA, 2013; SILVA et al., 2013; SMITH et al., 2017).

Dentre as variáveis demográficas avaliadas no questionário, todas as características foram comparáveis entre os grupos, com exceção do contato materno com indivíduos diagnosticados com TB. No entanto, não foram considerados os dados de cinco das 15 mães, o que, portanto, dificulta a comparação direta. Além disso, o tipo de contato e a duração não

foram questionados. Possíveis associações entre o contato prévio com TB e maior ou menor resposta imune neonatal serão discutidas posteriormente.

Neste estudo, a produção basal de citocinas (culturas sem estímulo) aumentou exclusivamente no grupo de neonatos vacinados com BCG Moreau. As citocinas IL-2, IL-4 e IL-10 podem ter sido estimuladas devido à fatores intrínsecos da cepa Moreau, descrita como uma das mais imunogênicas (BENÉVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005). Associado a isso, a maturação natural do sistema imune e/ou a exposição ambiental podem influenciar a elevação dos níveis basais de IL-4 e IL-10 (DECKER; GROBUSCH; RITZ, 2017; FIGUEIREDO et al., 2009).

Embora apresentadas sempre como cepas muito semelhantes devido à filogenia próxima, os resultados encontrados na Figura 7 evidenciam as propriedades imunogênicas distintas das cepas de BCG Moreau e BCG Russia. Uma das possíveis hipóteses pode estar relacionada ao contato materno com indivíduos diagnosticados com TB. Mawa e colaboradores (2015) mostraram que a ITBL materna foi associada com uma menor resposta de células T CD4+ PPD-específicas produtoras de IFN- γ , e diminuição rápida da concentração de anticorpos específicos para o Mtb. Aqui, apesar de não ter sido considerada a ITBL, é possível que a exposição intrauterina à antígenos micobacterianos possa ter influenciado a modificação da resposta imune neonatal no grupo Moreau, como identificado no comportamento do RN3 no CN pré-BCG (Tabela 2, T0). Além disso, a transferências de anticorpos maternos pode influenciar a capacidade da vacina em estimular a resposta imune (GLEZEN, 2003).

Shey e colaboradores (2014) mostraram que, ao longo dos nove primeiros meses de vida, o sistema imune de recém-nascidos tende a se tornar mais pró-inflamatório em resposta à micobactéria. Logo, a maturação da resposta inata contribui para uma maior produção de citocinas como TNF, IL-6 e IL-12p40 em bebês mais velhos quando comparados com recém-nascidos. Aqui, a vacinação com BCG Russia estimulou um aumento significativo na produção de TNF e IL-6, corroborando o já esperado para a faixa etária. Em compensação ao estímulo pró-inflamatório, houve também aumento em IL-10, citocina regulatória (ETNA et al., 2014). Diferentemente dos estudos de Hanekom (2005) e Soares (2008), onde neonatos produziam somente IL-10 ou IFN- γ , sugerindo um equilíbrio dinâmico entre a imunidade clássica e regulatória, aqui, neonatos vacinados com BCG Russia produziram simultaneamente IL-10 e IFN- γ . Além disso, apesar de não apresentar resultados estatisticamente significantes para essas citocinas, a vacinação com BCG Moreau estimulou maior concentração do que a vacinação com a cepa Russia. Contudo, a concentração de cada citocinas pode não refletir necessariamente

sua importância biológica, uma vez que algumas podem ter atividade aumentada mesmo em concentrações muito baixas (AL-ATTIYAH; EL-SHAZLY; MUSTAFA, 2012).

Como esperado, o aumento de IL-2 e IFN- γ após a vacinação foi percebido em ambos os grupos em níveis similares, evidenciando uma resposta imune comum às duas cepas. Ao que parece, as diferenças genéticas entre as duas cepas não influenciam a resposta clássica Th1 induzida pela vacinação com BCG. Embora seja fundamental na imunopatologia da TB, somente o IFN- γ não é suficiente para determinar a proteção vacinal (ABEBE, 2012). Tal hipótese ficou evidente quando a vacina booster MVA85A, sabidamente indutora de linfócitos T CD4+ e IFN- γ foi incapaz de induzir proteção contra a TB (TAMERIS et al., 2013). Diante das evidências, a avaliação mais complexa de mecanismos celulares e imunológicos vem sendo encorajada para melhor caracterização da resposta à vacina (SATTI; MCSHANE, 2019).

Em relação à imunidade protetora contra o Mtb conferida pela vacina, não foi detectada nenhuma diferença após estímulo *in vitro* com o antígeno específico. Em ambos os grupos, os níveis das citocinas se mantiveram os mesmos pré e pós-BCG, sendo a IL-2 a única exceção no grupo vacinado com BCG Moreau. Em Ritz et al., (2012b), as diferenças induzidas pela imunização com BCG Japão, BCG Denmark e BCG Rússia também não foram observadas após o estímulo *in vitro* com H37Rv. Nesse caso, após a vacinação com BCG Japão, o estímulo com PPD induziu maior secreção de citocinas tipo Th1 (IFN- γ , IL-2 e IL-12), IL-6, IL-10, MCP-1 e MCP-1b. Nas culturas não estimuladas (CN), também não houve variação. Um sistema imune imaturo pode apresentar capacidade reduzida de reconhecer antígenos e provocar uma resposta leve à antígenos estranhos (SIMON; HOLLANDER; MCMICHAEL, 2015).

Ao comparar a indução de citocinas após o nascimento, somente os neonatos do grupo Moreau secretaram níveis mais elevados de IL-6, IL-10 e TNF em relação ao controle. Nesse caso, o grupo Moreau já apresenta uma resposta imune mais intensa ao estímulo *in vitro* do que o grupo Rússia, antes mesmo da vacinação, o que pode sugerir uma maior influência do sistema imune materno nesse grupo. Em Mawa (2007), neonatos de mães com LTBI apresentaram regulação negativa de interferon e vias inflamatórias, e associação positiva com níveis aumentados de IL-12p70 ($p = 0,014$), MCP-1 ($p = 0,011$) e MIP-1b ($p = 0,007$), quando comparados com neonatos de mães sem LTBI após uma semana da vacinação. No entanto, seis semanas depois, ambas as vias de interferon e inflamação estavam positivamente reguladas. Aqui, um dos fatores limitantes para tal comparação está relacionado ao não diagnóstico de LTBI nas mães, o que, portanto, impede a associação direta entre LTBI e influencia na resposta imune neonatal. Além disso, o tamanho amostral reduzido não permite nenhuma inferência nesse contexto. Nenhuma outra diferença foi encontrada entre os grupos.

Apesar da limitação existente relacionada ao conhecimento da dinâmica de expressão de citocinas na infância, é importante considerar a idade como um fator associado a tais alterações ao longo do tempo. O aumento de IFN- γ e TNF, por exemplo, foi correlacionado positivamente com a idade, tanto em revisão sistemática quanto em estudo experimental (DECKER; GROBUSCH; RITZ, 2017; DECKER et al., 2017).

Em análise comparativa, a BCG Moreau induziu maior resposta inflamatória, com participação de IL-6, TNF, IFN- γ e IL-10; enquanto a BCG Rússia estimulou somente o aumento de IFN- γ . Soares e colaboradores (2008) mostraram que, de fato, a imunidade induzida pela BCG envolve a atuação de um perfil complexo de citocinas e fenótipos celulares, retomando a ideia de que avaliar somente o IFN- γ como correlato de proteção vacinal não é suficiente. Em contrapartida, a indução de complexo perfil celular e de citocinas estimulados após vacinação com BCG não foi associada com maior proteção contra o desenvolvimento da TB em crianças por até dois anos após a imunização (KAGINA et al., 2010).

Ao avaliar a indução de resposta imune *in vitro* específica ao H37Rv, a imunização com BCG Moreau estimulou níveis mais elevados de IL-6 e TNF, enquanto BCG Rússia estimulou IL-6 e IL-2. Em Ritz (2012b), a imunização com BCG Rússia foi considerada inferior à BCG Japão por induzir concentrações menores de citocinas Th1. No entanto, a relevância biológica dos ensaios de quantificação de citocinas *in vitro* não é garantida, já que a proteção só pode ser avaliada em coorte. Por outro lado, a capacidade altamente imunoestimuladora das cepas iniciais de BCG evidenciada na literatura pode ser questionada (HAYASHI et al., 2009). Aqui, a BCG Moreau, além de induzir citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF), também estimula aumento de IL-10 quando comparada com a BCG Rússia. Outras citocinas como IL-1b, IL-8 e IL-12 não foram avaliadas, o que, portanto, impede a comparação entre os estudos.

Segundo Boer e colaboradores (2015), a resposta imune *in vitro* pró-inflamatória foi correlacionada com maior reação local após a vacinação com BCG, enquanto lesões mais leves foram associadas a um perfil mais regulatório de células T CD8+. Dessa maneira, é possível que o processo de cicatrização da lesão vacinal reflita os diferentes níveis de citocinas estimulados e, conseqüentemente, a reatogenicidade local provocada pelas diferentes cepas BCG Moreau e BCG Rússia demonstrados aqui.

Segundo Santiago e colaboradores (2003), é possível utilizar a cicatrização da BCG como uma medida sensível de determinar a vacinação no primeiro mês de vida, em até três anos após a vacinação. No entanto, a ausência de cicatriz foi relacionada com um maior risco de infecção por Mtb em crianças habitantes de regiões endêmicas – e, portanto, mais expostas ao risco (SOYSAL et al., 2005). Nesse caso, é importante considerar o desenvolvimento da cicatriz

vacinal como dependente da cepa administrada. Em um estudo realizado em Uganda, a proporção de crianças que desenvolveram a cicatriz vacinal foi diferente entre os grupos vacinados com diferentes cepas de BCG: a vacinação com BCG Russia esteve relacionada com 52,2% de formação de cicatriz vacinal, enquanto BCG Bulgaria e BCG Denmark foram associadas com 64,1% e 92,6%, respectivamente. Além disso, neonatos com cicatriz apresentaram maiores níveis de IFN- γ e IL-13 em resposta à antígenos micobacterianos (ANDERSON et al., 2012). A vacinação com BCG Russia também induziu menor reação local (mediana 2 mm; IQR, 1–4 mm) ($p = 0,001$) significamente menor do que crianças vacinadas com BCG Denmark (mediana 5 mm; IQR 4–7 mm) e BCG Japão (mediana 5 mm; IQR, 3–7 mm). Aqui, apesar de não ter sido realizada nenhuma avaliação estatística relacionada ao tamanho das lesões causadas pela vacinação com as cepas Moreau e Russia, foi possível observar uma resolução mais branda da lesão no grupo vacinado com a cepa Russia, corroborando os achados na literatura. Além disso, após 24 semanas da vacinação, a ausência de cicatriz só foi observada no grupo Russia.

6 CONCLUSÕES

Os perfis de citocinas induzidas após a vacinação com as cepas BCG Moreau e BCG Russia são complexos, mas semelhantes. Ambas cepas foram associadas com o padrão clássico Th1, com produção de IL-2 e IFN- γ , mas somente a BCG Russia estimulou as citocinas inflamatórias IL-6, TNF e IL-10. Em contrapartida, a cepa Moreau parece ser mais imunogênica, pois induziu concentrações mais elevadas dessas citocinas antes mesmo da vacinação. A vacina induziu leve resposta imune *in vitro* contra o Mtb, mas associado à inflamação após BCG Moreau. No geral, a imunização foi bem tolerada e a lesão apresentou evolução normal, com resolução completa e formação de cicatriz no grupo vacinado com BCG Moreau. No grupo vacinado com a cepa BCG Russia, a maior regulação da resposta imune pela IL-10 pode explicar o suposto desenvolvimento de lesão mais leve e menor cicatrização.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, A. M. *et al.* Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–15, dez. 2015.

ABEBE, F. Is interferon-gamma the right marker for bacille Calmette-Guérin-induced immune protection? The missing link in our understanding of tuberculosis immunology. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 169, n. 3, p. 213–219, 2012.

AL-ATTIYAH, R.; EL-SHAZLY, A.; MUSTAFA, A. S. Comparative Analysis of Spontaneous and Mycobacterial Antigen-Induced Secretion of Th1, Th2 and Pro-Inflammatory Cytokines by Peripheral Blood Mononuclear Cells of Tuberculosis Patients. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 75, n. 6, p. 623–632, jun. 2012.

ANDERSON, E. J. *et al.* The influence of BCG vaccine strain on mycobacteria-specific and non-specific immune responses in a prospective cohort of infants in Uganda. **Vaccine**, v. 30, p. 2083–2089, 2012.

ANDREWS, J. R. *et al.* Risk of progression to active tuberculosis following reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 784–791, 2012.

ANTAS, P. R. Z.; FLORES-VALDEZ, M.; SHANN, F. An opportunity to compare the effects of BCGMoreau and BCG-Russia in Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 22, n. 9, p. 1108–1109, 2018.

BARRETO, M. L. *et al.* Evidence of an effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: Second report of the BCG-REVAC cluster-randomised trial. **Vaccine**, v. 29, n. 31, p. 4875–4877, 12 jul. 2011.

BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 7, p. 45–54, 2006.

BARRY, C. E. *et al.* The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, 2009.

BEHR, M. A. BCG - Different strains, different vaccines? **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 86–92, 2002.

BEHR, M. A.; CIÛ, M. A. W. W. P.; SALAMON, H. Comparative Genomics of BCC Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. **Science**, v. 284, n. May, p. 1520–1524, 1999.

BEHR, M. A.; SMALL, P. M. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. **Vaccine**, v. 17, n. 7–8, p. 915–922, 1999.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T. *et al.* BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis - Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 459–465, ago. 2005.

- BIRK, N. M. *et al.* Effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination at birth on T and B lymphocyte subsets: Results from a clinical randomized trial. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017a.
- BIRK, N. M. *et al.* The association between Bacillus Calmette-Guérin vaccination (1331 SSI) skin reaction and subsequent scar development in infants. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017b.
- BLOOM, B. R. **Tuberculosis : pathogenesis, protection, and control**. [s.l.] ASM Press, 1994.
- BOER, M. C. *et al.* Mycobacterium bovis BCG vaccination induces divergent proinflammatory or regulatory T cell responses in adults. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 7, p. 778–788, 2015.
- BRANDES, M. *et al.* Cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells induce robust CD8⁺ $\alpha\beta$ T cell responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2307–12, 2009.
- BROSCH, R. *et al.* Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 13, p. 5596–5601, 2007.
- CASALI, N.; WHITE, A. M.; RILEY, L. W. Regulation of the Mycobacterium tuberculosis *mce1* operon. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 441–449, jan. 2006.
- CERNUSCHI, T. *et al.* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine: A global assessment of demand and supply balance. **Vaccine**, v. 36, n. 4, p. 498–506, 2018.
- COOPER, A. M. Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 393–422, 2009.
- DANTAS, O. M. S. *et al.* A case-control study of protection against tuberculosis by BCG revaccination in Recife, Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 5, p. 536–541, 2006.
- DECKER, M.-L.; GROBUSCH, M. P.; RITZ, N. Influence of Age and Other Factors on Cytokine Expression Profiles in Healthy Children—A Systematic Review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, 2017.
- DECKER, M. L. *et al.* Cytokine profiling in healthy children shows association of age with cytokine concentrations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- DEENADAYALAN, A.; MADDINENI, P.; RAJA, A. Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.
- DHANAWADE, S. S. *et al.* Scar formation and tuberculin conversion following BCG vaccination in infants: A prospective cohort study. **Journal of family medicine and primary care**, v. 4, n. 3, p. 384–387, 2015.

DOCKRELL, H. M.; SMITH, S. G. **What have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years?** *Frontiers in Immunology*, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601272/pdf/fimmu-08-01134.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2018.

DOCKRELL, H. M.; SMITH, S. G.; LALOR, M. K. Variability between countries in cytokine responses to BCG vaccination: What impact might this have on protection? *Expert Review of Vaccines*, v. 11, n. 2, p. 121–124, 2012.

DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. E. Perspectives on host adaptation in response to *Mycobacterium tuberculosis*: Modulation of inflammation. *Seminars in Immunology*, v. 26, n. 6, p. 533–542, 2014.

DU PREEZ, K. *et al.* **Global shortages of BCG vaccine and tuberculous meningitis in children.** *The Lancet Global Health* Elsevier, , 1 jan. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30554756>. Acesso em: 26 jan. 2019.

ETNA, M. P. *et al.* Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. *Seminars in Immunology*, v. 26, n. 6, p. 543–551, 2014.

FIGUEIREDO, C. A. *et al.* Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. *Environmental Health Perspectives*, v. 117, n. 5, p. 845–849, 2009.

FLETCHER, H. A.; DOCKRELL, H. M. Human biomarkers: can they help us to develop a new tuberculosis vaccine? *Future Microbiology*, v. 11, n. 6, p. 781–787, jun. 2016.

GAGNEUX, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 202–213, 2018.

GALVÃO, T. C. *et al.* The BCG Moreau RD16 deletion inactivates a repressor reshaping transcription of an adjacent gene. *Tuberculosis*, v. 94, n. 1, p. 26–33, jan. 2014.

GIBBONS, D. *et al.* Interleukin-8 (CXCL8) production is a signature T cell effector function of human newborn infants. *Nature Medicine*, v. 20, n. 10, p. 1206–1210, 2014.

GLEZEN, W. P. Effect of maternal antibodies on the infant immune response. *Vaccine*. *Anais*, v. 21, n. 24, p. 3389–3392, 2003.

GOMES, L. H. F. *et al.* Genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 19, p. 5600–5601, 2011.

GUERRERO, G. G.; DEBRIE, A. S.; LOCHT, C. Boosting with mycobacterial heparin-binding haemagglutinin enhances protection of *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated newborn mice against *M. tuberculosis*. *Vaccine*, v. 28, n. 27, p. 4340–4347, 2010.

HANEKOM, W. A. The immune response to BCG vaccination of newborns. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1062, p. 69–78, 2005.

HART, P. D.; SUTHERLAND, I. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. **British Medical Journal**, v. 2, n. 6082, p. 293–295, jul. 1977.

HAYASHI, D. *et al.* Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 116–128, 2009.

HIGGINS, J. P. T. *et al.* Association of BCG, DTP, and measles containing vaccines with childhood mortality: Systematic review. **BMJ (Online)**, v. 355, 2016.

KAGINA, B. M. N. *et al.* Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 8, p. 1073–1079, 2010.

KELLER, P. M.; BÖTTGER, E. C.; SANDER, P. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural recA mutant. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2008.

KLEINNIJENHUIS, J. *et al.* Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17537–17542, 2012.

KLEINNIJENHUIS, J.; VAN CREVEL, R.; NETEA, M. G. Trained immunity: Consequences for the heterologous effects of BCG vaccination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 1, p. 29–35, 2014.

LEUNG, A. S. *et al.* Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–12, 2008.

LEWIS, K. N. *et al.* Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* Mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 1, p. 117–123, 1 jan. 2003.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG Vaccine. **Mædica**, v. 8, n. 1, p. 53–8, 2013.

LUDANNYY, R. *et al.* Whole-Genome Sequence of *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia). **Genome Announc**, v. 3, n. 6, p. 1320–15, 2015.

MANGTANI, P. *et al.* Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 4, p. 470–480, 15 fev. 2014.

MANGTANI, P. *et al.* The duration of protection of school-aged BCG vaccination in England: a population -based case-control study. **International Journal of Epidemiology**, sept., p. 1–9, 2017.

MAWA, P. A. *et al.* The impact of maternal infection with *Mycobacterium tuberculosis* on the infant response to bacille Calmette-Guérin immunization. **Philosophical Transactions of**

the **Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1671, 2015.

MAWA, P. A. *et al.* Maternal BCG scar is associated with increased infant proinflammatory immune responses. **Vaccine**, v. 35, n. 2, p. 273–282, 5 jan. 2017.

MOUTINHO D, I. L. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. v. 21, n. 1, p. 42–48, 2011.

NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. M. Trained immunity: A memory for innate host defense. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 5, p. 355–361, 2011.

NGUIPDOP-DJOMO, P. *et al.* Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: A retrospective population-based cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 219–226, 2016.

PABST, H. F. *et al.* Effect of breast-feeding on immune response to BCG vaccination. **Lancet**, v. 1, n. 8633, p. 295–7, 11 fev. 1989.

PAI, M. *et al.* Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16076, 2016.

PAN, Y. *et al.* Whole-genome sequences of four Mycobacterium bovis BCG vaccine strains. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 12, p. 3152–3153, 2011.

PEREIRA, S. M. *et al.* BCG vaccine against tuberculosis: Its protective effect and vaccination policies. **Revista de Saude Publica**, v. 41, SUPL. 1, p. 59–66, set. 2007.

PONTE, C. *et al.* The patterns of in vitro cell-death and inflammatory cytokines induced by distinct BCG vaccine strains are differentially induced in human mononuclear cells. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2 jan. 2017.

RAMÍREZ-LAPAUSA, M.; MENÉNDEZ-SALDAÑA, A.; NOGUERADO-ASENSIO, A. Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. **Revista española de sanidad penitenciaria**, v. 17, n. 1, p. 3–11, jun. 2015.

RITZ, N. *et al.* Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 5, p. 821–841, 2008.

RITZ, N. *et al.* A comparative analysis of polyfunctional t cells and secreted cytokines induced by bacille calmette-guérin immunisation in children and adults. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012a.

RITZ, N. *et al.* The influence of bacille Calmette-Guérin vaccine strain on the immune response against tuberculosis: A randomized trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 2, p. 213–222, 2012b.

RITZ, N.; CURTIS, N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. **Tuberculosis**, v. 89, n. 4, p. 248–251, jul. 2009.

RODRIGUES, L. C.; DIWAN, V. K.; WHEELER, J. G. Protective effect of bcg against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: A meta-analysis. **International Journal of**

Epidemiology, v. 22, n. 6, p. 1154–1158, 1993.

SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Thorax**, v. 37, n. 4, p. 246–51, abr. 1982.

SANTIAGO, E. M. *et al.* A prospective study of bacillus Calmette-Guérin scar formation and tuberculin skin test reactivity in infants in Lima, Peru. **Pediatrics**, v. 112, n. 4, 2003.

SATTI, I.; MCSHANE, H. Current approaches toward identifying a correlate of immune protection from tuberculosis. **Expert Review of Vaccines**, v. 18, n. 1, p. 43–59, 23 nov. 2019.

SCRIBA, T. J.; COUSSENS, A. K.; FLETCHER, H. A. Human Immunology of Tuberculosis. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 4, p. 1–23, 2016.

SHEY, M. S. *et al.* Maturation of Innate Responses to Mycobacteria over the First Nine Months of Life. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 10, p. 4833–4843, 2014.

SILVA, D. *et al.* A whole blood assay as a simple, broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to Mycobacterium tuberculosis antigens. **Acta Tropica**, v. 127, n. 2, p. 75–81, 2013.

SIMON, A. K.; HOLLANDER, G. A.; MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1821, p. 20143085, 2015.

SMITH, S. G. *et al.* Whole Blood Profiling of Bacillus Calmette–Guérin-Induced Trained Innate Immunity in Infants Identifies Epidermal Growth Factor, IL-6, Platelet-Derived Growth Factor-AB/BB, and Natural Killer Cell Activation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. June, p. 1–11, 2017.

SOARES, A. P. *et al.* Bacillus Calmette-Guerin Vaccination of Human Newborns Induces T Cells with Complex Cytokine and Phenotypic Profiles. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 3569–3577, 2008.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. **Molecular Diagnosis of Mycobacteria**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://clinchem.aaccjnl.org/content/clinchem/47/5/809.full.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2018.

SOTNIKOVA, E. A. *et al.* Complete genome sequence of mycobacterium bovis strain BCG-1 (russia). **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, 2016.

SOYSAL, A. *et al.* Effect of BCG vaccination on risk of Mycobacterium tuberculosis infection in children with household tuberculosis contact: A prospective community-based study. **Lancet**, v. 366, n. 9495, p. 1443–1451, 22 out. 2005.

STERN, J. N. H. *et al.* Molecular signatures distinguishing active from latent tuberculosis in peripheral blood mononuclear cells, after in vitro antigenic stimulation with purified protein derivative of tuberculin (PPD) or Candida: A preliminary report. **Immunologic Research**, v. 45, n. 1, p. 1–12, 2009.

SULIMAN, S. *et al.* Bacillus Calmette–Guérin (BCG) Revaccination of Adults with Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection Induces Long-Lived BCG-Reactive NK Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 4, p. 1100–1110, 15 ago. 2016.

SYLVESTER, R. J.; VAN DER MEIJDEN, A. P. M.; LAMM, D. L. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: A meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. **Journal of Urology**, v. 168, n. 5, p. 1964–1970, 2002.

TAMERIS, M. D. *et al.* Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: A randomised, placebo-controlled phase 2b trial. **The Lancet**, v. 381, n. 9871, p. 1021–1028, 2013.

UMEMURA, M. *et al.* IL-17-Mediated Regulation of Innate and Acquired Immune Response against Pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin Infection. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 6, p. 3786–3796, 2007.

WHO. **Report TB 2018**. [s.l.: s.n.].

WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. **World Health Organisation Technical Report Series**, n. 979: Annex 3; p. 137–185, 2011.

WHO, W. H. O. The End TB Strategy. 2015.

WHO, W. H. O. Global Tuberculosis Report 2019. **WHO**, 2019.

WU, B. *et al.* Unique gene expression profiles in infants vaccinated with different strains of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. **Infection and immunity**, v. 75, n. 7, p. 3658–64, jul. 2007.

WÜNSCH FILHO, V. *et al.* Effectiveness of BCG vaccination against tuberculous meningitis: a case-control study in São Paulo, Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, n. 1, p. 69–74, 1990.

ZENG, G.; ZHANG, G.; CHEN, X. Th1 cytokines, true functional signatures for protective immunity against TB? **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 3, p. 206–215, 2018.

ZUÑIGA, J. *et al.* Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

ANEXO 1

Parecer Consubstanciado do CEP.

UFBA - INSTITUTO DE SAÚDE
COLETIVA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA BAHIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da eficácia da 1ª dose da vacina BCG cepa Russian no Brasil.

Pesquisador: Susan Martins Pereira Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 81681517.2.0000.5030

Instituição Proponente: Instituto de Saúde Coletiva / UFBA

Patrocinador Principal: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis - DEVIT

DADOS DO PARECER

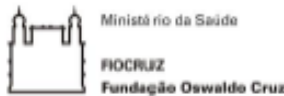
Número do Parecer: 2.850.322

Apresentação do Projeto:

A tuberculose (TB) é uma doença de elevada magnitude no mundo, com altos índices de prevalência (170/100.000 habitantes) e mortalidade (14 óbitos/100.000 habitantes) nos diversos países. Em 2015, foram estimados 10,4 milhões de casos novos de tuberculose, equivalente a incidência de 142 casos por 100 000 habitantes (WHO, 2016). Estima-se que um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e cerca de 10% desta população tem risco de desenvolver TB ativa (WHO, 2016). O Brasil está incluído entre os vinte países com maior carga de tuberculose, representado através do número de casos (WHO, 2016). Na década de 80 foram notificados em torno de oitenta mil casos anualmente; em 1992 oitenta e seis mil casos foram notificados e tratados. A partir de 2000 estima-se que de quatro a cinco mil pessoas morrem de tuberculose a cada ano. Em 2003, o controle da tuberculose foi destacado como prioridade dentre as políticas públicas do Brasil. A vacina utilizada na rotina,

desde a sua implantação tem sido a cepa BCG-Moreau, produzida pela Fundação Ataulfo de Paiva, que possui elevada segurança, eficácia contra formas pulmonares e disseminadas, além de ser imunogênica e apresentar baixo nível de eventos adversos. Devido à descontinuidade de produção da vacina BCG pela Fundação, o Brasil passará a utilizar, a partir de novembro de 2017, a vacina BCG Russian, desenvolvida na Serum Institute India. Desta forma, torna-se necessário implementar um estudo de avaliação de eficácia vacinal, comparando-se a vacina com cepa BCG Russian-I e a BCG Moureau.

APÊNDICE 1



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: "Avaliação da resposta imune de neonatos vacinados com as cepas BCG Moreau e Rússia em Salvador"

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao (à) seu (sua) filho (a).

Esse estudo é necessário para que possamos estudar como o sistema imunológico do (da) seu (sua) filho (a) responde à vacinação com BCG, essa vacina que seu (sua) filha irá receber em até alguns dias após o nascimento. Para isso, vocês serão acompanhados durante alguns meses. Também investigaremos a presença ou ausência de algumas doenças sindrômicas de origem genética que cursam com deficiência intelectual, deficiência física, ou mesmo transtornos do espectro autista. Em caso positivo, queremos descobrir as possíveis causas funcionais e/ou genéticas e poderemos orientar para melhor tratamento do seu filho.

Estou ciente de que:

- I) Será feita uma coleta de, no mínimo, 2 mL e de, no máximo, 4 mL de sangue de uma veia do (da) meu (minha) filho (a) para realização de testes para avaliação imunológica em dois momentos: 1) na Unidade, antes da vacinação com BCG; 2) Doze semanas após a vacinação ou quando orientado pela equipe de pesquisa. Nos dois momentos, a coleta de sangue será igual e todos os esforços serão feitos para minimizar a dor ou complicações geradas por este procedimento;
- II) Os riscos da coleta de sangue são hematoma local (rouxidão) e/ou algum desconforto;
- III) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido;
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;
- VII) Caso eu deseje, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.
- VIII) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu (minha) filho (a). Poderei contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA (CEP-ISC-UFBA) a qualquer momento para esclarecer dúvidas ou realizar qualquer tipo de contato referente aos termos aqui descritos. O contato pode ser feito por telefone ou de forma presencial: Rua Basílio da Gama, s/n – 2º andar – 40110-040 – Salvador, Bahia. Horário de funcionamento: 2ª a 6ª feira, das 08 às 15h. Email: cepisc@ufba.br Tel. (71) 3283-7419;
- IX) Como responsável pelo meu (minha) filho (filha), devo assinar na última página do referido Termo e rubricar todas as demais folhas;



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz



INSTITUTO DE
 SAÚDE COLETIVA
 Universidade Federal da Bahia

- X) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, assinar na última página do referido Termo;
 XI) Resolução CNS 466/2012 – Estou recebendo uma via deste Termo de Assentimento Livre e Esclarecido. Uma outra via ficará com o pesquisador responsável pela pesquisa.

Salvador, de de 20

Assinatura do Responsável 1

Nome (em letra de forma) e grau de parentesco

Pesquisador Responsável pelo Projeto:

DR. SÉRGIO MARCOS ARRUDA / DRA. SUSAN PEREIRA

INFORMAÇÕES DE CONTATO DO PARTICIPANTE

LOCAL DE NASCIMENTO DA CRIANÇA (NOME DO HOSPITAL/MATERNIDADE):

NOME DA CRIANÇA:

DATA DE NASCIMENTO DA CRIANÇA:/...../..... DATA DE VACINAÇÃO (BCG):/...../.....

NOME DA MÃE (COMPLETO SEM ABREVIÇÕES):

TELEFONE (COM DDD): CELULAR: RESIDENCIAL:

ENDEREÇO:

NOME DO PAI (COMPLETO SEM ABREVIÇÕES):

TELEFONE (COM DDD): CELULAR: RESIDENCIAL:

ENDEREÇO (SE IGUAL COLOQUE 'MESMO'):

APÊNDICE 2

Manuscrito a ser submetido para publicação.

Modulation of the cytokine response by BCG Moreau and BCG Russian strains after vaccination in Brazilian infants

Julia Bitencourt^a, Alice Sarno^a, Carlos Oliveira^a, Ramon Andrade^b, Iukary Takenami^c, Susan Pereira^b, Sérgio Arruda^{a,d}

^a*Laboratório Avançado de Saúde Pública, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (IGM/Fiocruz), Salvador, Bahia 40296 710, Brazil*

^b*Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia 40110-040, Brazil*

^c*Colegiado de Medicina, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Paulo Afonso, BA 48607 190, Brazil*

^d*Universidade Estadual da Bahia (UNEB), Salvador, BA 41150 000, Brazil*

E-mail addresses: juliabcp@hotmail.com (J. Bitencourt), juniorasoliveira@gmail.com (C. Oliveira), sarnoalice@gmail.com (A. Sarno), ramon.andrade.souza@gmail.com (R. Andrade), iukary.takenami@univasf.edu.br (I. Takenami), susanmartins@gmail.com (S. Pereira), sa@bahia.fiocruz.br (S. Arruda)

Correspondence should be addressed to Sérgio Arruda; sa@bahia.fiocruz.br

1. Introduction

The Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine was developed by Léon Charles Albert Calmette and Jean-Marie Camille Guérin almost 100 years ago and, even today, it is one of the main measures to prevent tuberculosis (TB) disease. Despite its importance against several forms of TB, previous study demonstrated that the vaccine protection is limited against the pulmonary form, varying between 0 to 80% [1].

Many low-incidence countries, such as the United States, do not routinely vaccinate with BCG due the low protective efficacy after immunization (Ref). On the other hand, several countries of Asia, Europe, Africa, Central and South America still use BCG vaccine as a way to reduce morbidity and mortality against severe forms of the disease [2]. In Brazil, the vaccine is part of the National Immunization Program (NIP) and is administered intramuscularly in the first months of life. The effectiveness of BCG against pulmonary TB is 44% (95% CI: 20-60%), ranging from 24% (54-73%) to 51% (24-68%) in the cities of Manaus and Salvador, respectively [3].

There is still no consensus about the protective mechanism induced by the BCG vaccine [4] especially because genetic variations in BCG strains may induce different immune response in the host [5]. Studies have shown a distinct pattern in genetic and immunogenic properties among BCG strains, although little is known about how these differences may affect the protection induced by the vaccine [5]. Some other factors may influence vaccine protection, such as environmental mycobacteria pre-sensitization, methodological differences in vaccine preparation, biological variation between the different strains of BCG and, consequently, discordant immunogenic properties between the strains [5–7].

BCG Moreau is the vaccine strain produced and used in Brazil, since the 1920s. However, in 2017, the Ataulpho Paiva Foundation (FAP) discontinued the BCG Moreau vaccine manufacture, which significantly affected Brazil's NIP. Thus, BCG Moreau was replaced by BCG Russia, produced by the Serum Institute of India (SII). Although both strains are classified as early strains and furthermore are assumed to share very small genetic differences, BCG Russia has never been used in Brazil [8,9].

The impact of the BCG Russia strain on Brazilian population is unknown. This article discusses the differences between BCG strains, focusing on modulation of cytokine response, contributing to a better evaluation of the vaccine strains in the country. The impacts of these findings including immunogenicity and healing process are discussed. These new insights have extremely important implications for NIP and its actions on a national basis.

2. Materials and Methods

2.1. Study design

A case series study was carried out to investigate the cytokine production patterns of two BCG strains in healthy early-vaccinated infants. The study was conducted at the Maternity Hospital Professor José Maria de Magalhães Neto in Salvador, Brazil. In this health unit, infants were vaccinated with BCG Moreau RDJ (FAP) or Russian BCG-I (SII) in the first week of life, according to vaccine stock availability (vaccine validity) and to the vaccination routine of the maternity hospital. No randomization or blinding was used in this study.

2.2 Study population

The study population includes infants aged < 7 days, with a birth weight > 2kg and no previous vaccination with BCG. The exclusion criteria were: evidence of pulmonary or extrapulmonary TB, use of any immunomodulatory drug by the mother during pregnancy or breastfeeding,

apparent or diagnosed congenic or any other type of disease, mother with human immunodeficiency virus (HIV) infection and both mother and infant with any acute or chronic disease. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Bahia (UFBA) (protocol number: 81681517.2.0000.5030) with written informed consent obtained from all infants' parents. Furthermore, this study was part of a larger research project aiming to evaluate the effectiveness of the first dose of BCG Russian-I against TB.

After providing written consent, the parents were invited to answer a questionnaire and the infants were submitted to peripheral blood collection (Pre-BCG, T₀). During a three-month follow-up, home visits were carried out to exam scar formation, and a new blood sample was collected on the last visit (Post-BCG, T₁). To minimize loss to follow-up, the team kept direct contact with the parents before and after home visits by cell phone.

2.3 Vaccination and scar evaluation

The BCG Moreau RDJ and Russian BCG-I vaccines were provided by the Municipal Health Department of Lauro de Freitas, located 26km from Salvador. All vaccinations were administered via intradermal in the left upper arm with 0.1 ml of BCG Moreau RDJ and 0.05 ml of Russian BCG-I. BCG scar formation was measured and photographed during home-visits by a single observer. The digital photos were carried out by the parents when home-visit was not possible. Thus, presential or *on-line* follow-up were documented periodically until the 12th week or until complete scar tissue formation.

2.4 Blood collection and *in vitro* assays

Two ml of whole blood were collected in heparin tube. All samples were stored at room temperature up to two hours before the *in vitro* assays and then diluted in culture medium (1:5) as previously described [10]. Total diluted volume was distributed in a 96-well U-bottom plate,

200 μ L/well. Depending on the available blood volume, approximately eight wells were stimulated under each conditions: negative control (media and cells only), heat-killed H37Rv and BCG (Moreau or Russian BCG-I). After 72 hours at 37°C 5% CO₂, culture supernatants were collected, distributed in two aliquots and stored at -20°C for further analysis.

2.5 Cytokine quantification

Cytokines levels were measured in whole blood culture supernatants using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) kit (BD Biosciences, San Diego, CA), according to the instructions provided by the manufacturer. A volume of 50 μ L of each sample was used in the assay for the quantification of IL-2 (detection limit: 2.6 pg/mL), IL-4 (4.9 pg/mL), IL-6 (2.4 pg/ml), IL-10 (4.5 pg/ml), IFN- γ (3.7 pg/ml), TNF (3.8 pg/ml) and IL-17A (18.9 pg/ml). All samples were processed simultaneously to avoid inter-experimental variation.

2.6 Statistical analysis

The data obtained were analysed using the GraphPad Prism v.5.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA). To evaluate the sample distribution, the D'agostino-Pearson test was performed. The Wilcoxon test were used to assess the statistical significance of non-parametric paired samples. Categorical variables were assessed by Fisher's exact test.

3. Results

3.1 Participants characteristics

Between December 2018 and January 2019, 36 infants were vaccinated with either BCG Moreau RDJ or Russian BCG-I at the maternity hospital and assessed for eligibility for the study. After enrolment, 13 (36.1%) infants were excluded: four (30.8%) due to unsuccessful phlebotomy and nine (36.2%) due to insufficient blood collection. Of the 36 infants, 23 (63.9%)

were enrolled in this study, seven (30.4%) infants were vaccinated with BCG Moreau RDJ and 16 (69.6%) with Russian BCG-I. However, during follow-up visits, eight (34.8%) infants were excluded from the final analysis: one (12.5%) because changed address, six (75%) lost contact in the follow-up period and one (12.5%) insufficient blood collection. The study flowchart is described in Figure 1.

Figure 1. Study flowchart.

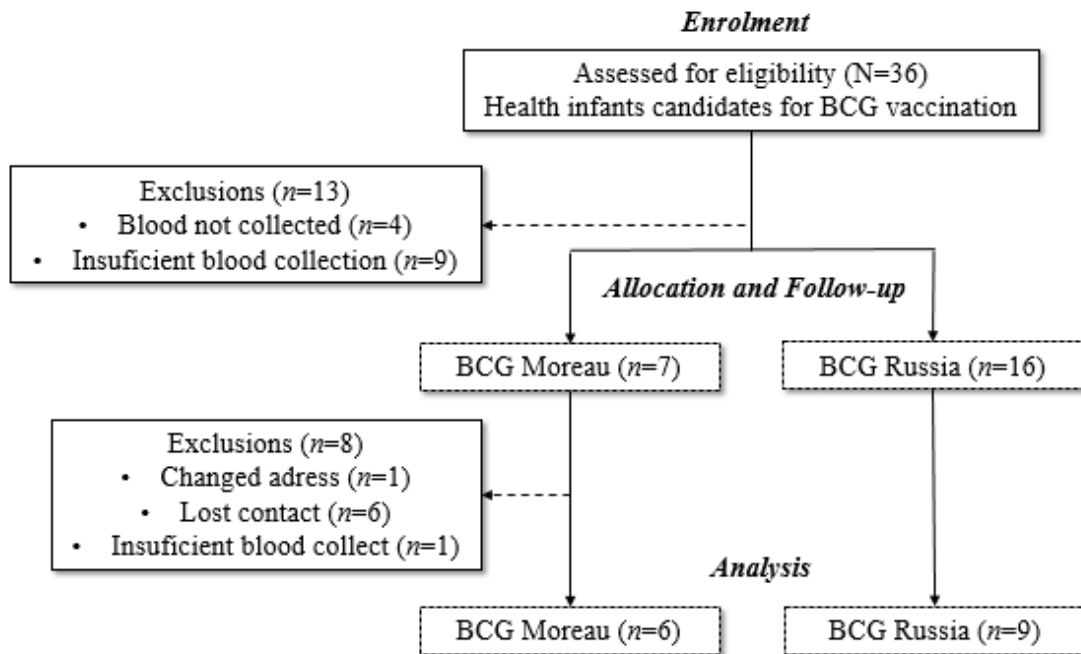


Table 1 lists the demographic characteristics of 15 infants enrolled in the study. There was no statistical difference between the characteristics assessed in both groups, related to sex, age, weight and height ($p > 0.05$). The presence or absence of BCG scar were observed to determine maternal vaccination status. In this regard, the scar was present in all six (100%) and eight (88.89%) mothers of infants vaccinated with BCG Moreau RDJ and Russian BCG-I, respectively. In addition, three (50%) mothers of infants vaccinated with BCG Moreau RDJ reported previous contact with patients diagnosed with pulmonary TB ($p = 0.044$).

Table 1. Demographic characteristics of infants immunized with BCG Moreau RDJ and Russian BCG-I.

Characteristics	BCG Moreau Group, N=6	BCG Russian Group, N=9	<i>p</i> -value
Sex, <i>n</i> (%)			
Female	4 (66.6)	3 (33.3)	0.314
Male	2 (33.3)	6 (66.6)	
Age (days)			
Mean \pm SD	3.5 \pm 1.04	3.11 \pm 0.78	0.547
Median, IQR	3.5, 2.75-4.25	3.0, 2.5-4.0	
Weight (g)			
Mean \pm SD	3,080 \pm 326.7 [#]	3310 \pm 525.9	0.437
Median, IQR	3065, 2760-3408 [#]	3255, 2840-3790	
Height (cm)			
Mean \pm SD	49.2 \pm 1.92 [#]	49.13 \pm 2.53 [#]	0.816
Median, IQR	49, 47.50-51.00 [#]	49.5, 48.25-50 [#]	
Maternal BCG scar, <i>n</i> (%)	6 (100)	8 (88.89)	>0.999
Maternal TB exposure, <i>n</i> (%)			
Yes	3 (50)	0 (0)	0.044
No	3 (50)	9 (100)	

[#]Data not available from one individual.

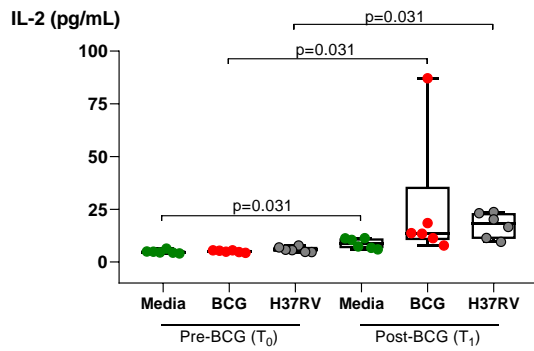
3.2 *In vitro* cytokine response before and after BCG Moreau RDJ and BCG Russian-I vaccination

The background immune responses of infants were assessed by detecting cytokines levels from supernatants of unstimulated whole blood cultures pre (T₀) and post-BCG (T₁) vaccination. Interestingly, it is plausible to assume that before receiving any vaccine all infants have the same cytokine response. After three months, infants vaccinated with BCG Moreau RDJ showed an increase in the production of cytokines IL-2 (T₀: median 4.69 pg/ml, IQR 4.30-5.35 vs T₁: median 8.92 pg/ml, IQR 6.54-11.23, *p* = 0.031), IL-10 (T₀: median 6.57 pg/ml, IQR 4.96-9.54 vs T₁: median 13.65 pg/ml, IQR 8.50-19.70, *p* = 0.031) and IL-4 (T₀: median 3.05 pg/ml, IQR: 2.83-3.18 vs T₁: median 3.28 pg/ml, IQR 3.09-3.75, *p* = 0.031), which was not observed in the BCG Russian-I vaccinated infants. There was no significant difference in the other cytokine levels measured (*p*>0.05).

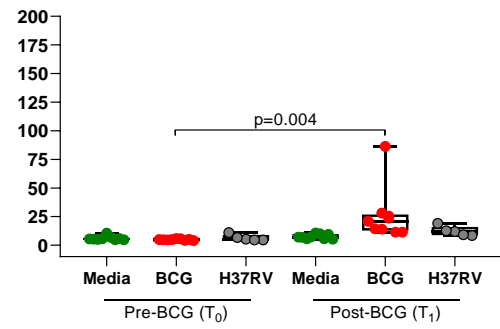
The infants' whole blood cells before and after vaccination were exposed to the corresponding vaccine strain (BCG Moreau RDJ and BCG Russian-I) and to H37Rv. Re-exposure of blood cells from BCG Moreau RDJ group to BCG *in vitro* increased the production of IL-2 (T₀: median 5.10 pg/ml, IQR 4.64-5.57 vs T₁: median 13.55 pg/ml, IQR 10.44-35.65, $p = 0.031$) and IFN- γ (T₀: median 6.42 pg/ml, IQR 4.37-40.13 vs T₁: median 227.0 pg/ml, IQR 124.2-848.5, $p = 0.031$) (Figure 2). The same result was observed in BCG Russian-I group: IL-2 (T₀: median 4.98 pg/ml, IQR 4.44-5.38 vs T₁: median 20.90 pg/ml, IQR 12.75-26.75, $p = 0.004$) and IFN- γ (T₀: median 3.12 pg (2.83-3.52) vs T₁: median 92.60 pg/ml, IQR 34.3-282, $p = 0.004$). In addition, higher levels of IL-6 (T₀: median 167 pg/ml, IQR 104.5-184.5 vs T₁: median 824 pg/ml, IQR 583-2290, $p = 0.004$), TNF (T₀: median 4.09 pg/ml, IQR 3.37-4.51 vs T₁: median 13.7 pg/ml, IQR 8.94-44.85, $p = 0.004$) and IL-10 (T₀: median 7.76 pg/ml, IQR 6.47-8.64 vs T₁: median 13 pg/ml, IQR 12.2-16.3, $p = 0.004$) were only observed with BCG Russian-I bacilli *in vitro* stimulus. Cytokines IL-4 (BCG Moreau RDJ: T₀: median 3.23 pg/ml, IQR 3.01-3.49 vs T₁: median 3.22 pg/ml, IQR 3.11-3.26, $p = 0.437$; BCG Russian-I: T₀: median 3.62 pg/ml, IQR 3.42-4.41 vs T₁: median 3.43 pg/ml, IQR 3.24-5.14, $p = 0.800$) and IL-17a (BCG Moreau RDJ: T₀: median 2.57 pg/ml, IQR 2.53-2.72 vs T₁: median 2.68 pg/ml, IQR 2.13-3.40, $p = >0.999$; BCG Russian-I: T₀: median 2.74 pg/ml, IQR 2.58-2.87 vs T₁: median 2.64 pg/ml, IQR 2.38-2.91, $p = 0.796$) did not change pre and post-vaccination.

The specific immune response to *M. tuberculosis* was evaluated in whole blood cell culture in the presence of heat-killed H37Rv stimuli. With the exception of an increased level of IL-2 after BCG Moreau RDJ vaccination (T₀: median 5.71 pg/ml, IQR 4.76-7.17 vs T₁: median 18.4 pg/ml, IQR 10.94-23.25, $p = 0.031$), no other cytokine quantification changed over time. Although not statistically significant, IL-6 was seemingly higher even before vaccination in the same group (T₀: median 5520 pg/ml, IQR 3999-6196 vs T₁: median 3782 pg/ml, IQR 2241-4745, $p = 0.062$).

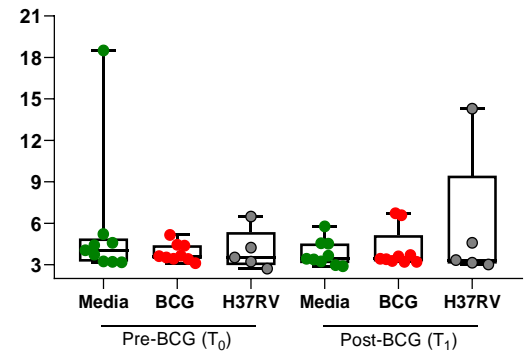
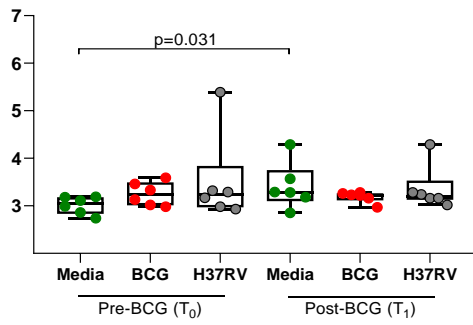
BCG Moreau



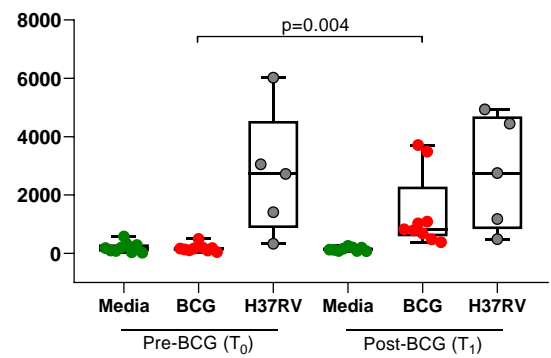
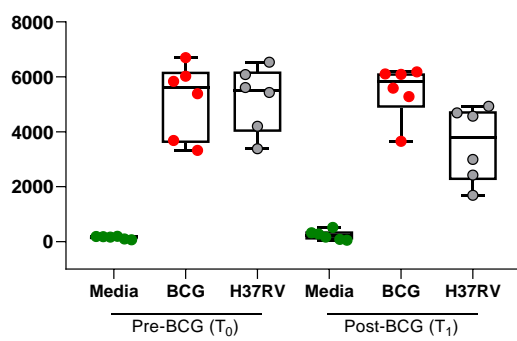
BCG Russian

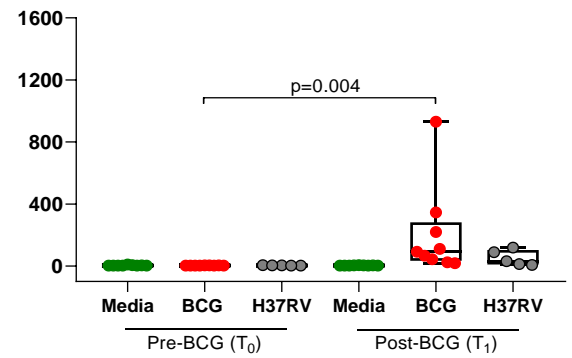
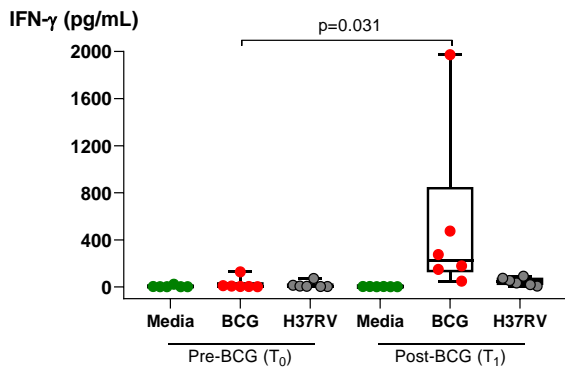
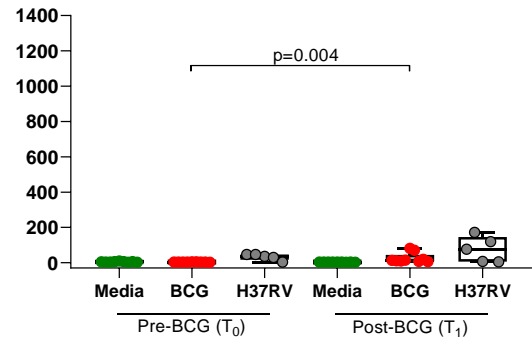
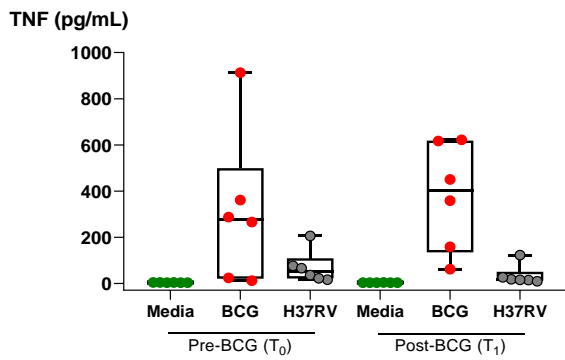
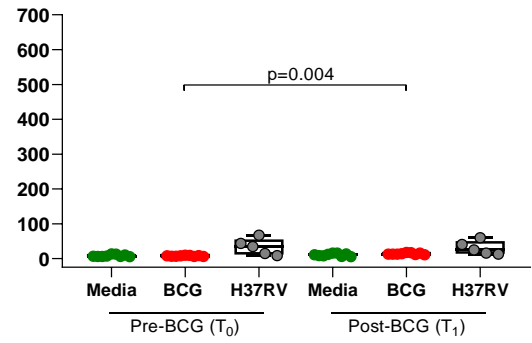
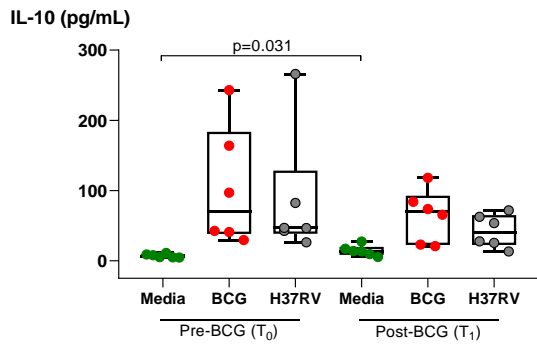


IL-4 (pg/mL)



IL-6 (pg/mL)





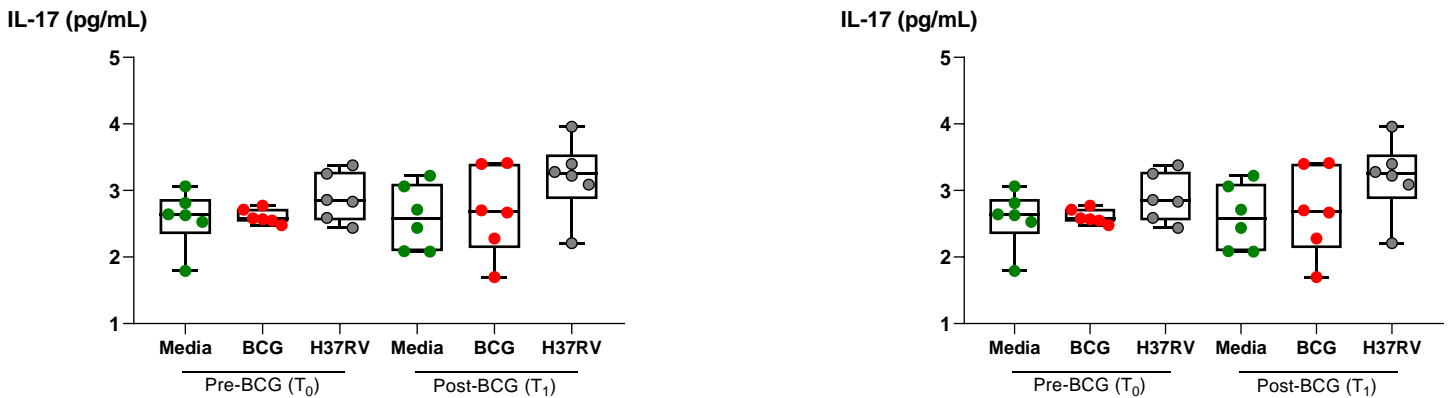


Figure 2. Cytokine production induced in whole blood culture in response to BCG strain (red) and H37Rv (light grey) after and before vaccination with BCG Moreau (left) or Russian BCG-I (right). For negative control, media and cells only were used (green). The box plot represents median with first and third quartiles, the whiskers represent minimum and maximum values of the data. In addition, the data are also represented as scatter plots with each circle representing a single infant.

3.3 BCG scar evolution

The evolution of scar formation after vaccination with BCG Moreau RDJ or BCG Russian-I is illustrated in Figure 3. Overall, both vaccines induced initial papules and nodules, followed by pustules and ulcers, which were later covered by a crust and evolved to a small fibrotic scar. The evolution from small papule to scar is characteristic of BCG vaccinations and is a result of intradermal administration of the vaccine. Markedly, the papule observed in the RN07 (Figure 3A) was less defined than in the other two infants vaccinated with BCG Moreau. Conversely, RN31 did not present a papule, only a small point of bleeding, after vaccination with BCG Russian-I (Figure 3B). In addition, RN17, RN20 and RN31 presented smaller scars, that were gone after 24 weeks of follow-up. Due the poor quality of the images, no in-depth analysis was performed. Although this represents a major limitation, it is observed that the healing process of BCG vaccination occurred in all neonates, independent of the BCG strain.



Figure 3. Evolution of BCG vaccine lesion. A: infants vaccinated with BCG Moreau RDJ; B: infants vaccinated with Russian BCG-I.

4. Discussion

The efficacy of BCG has been discussed for many years and several factors may influence the protective immune response [7]. One of the hypothesis posits the genetic differences between vaccine strains, which affect their metabolism and immunogenicity, reducing the vaccine's capacity to induce protection [5,11]. However, to test this hypothesis and compare the immune response induced by BCG strains is a complex task due to the different methodologies used to assess efficacy, location and study population, variation in levels of exposure to environmental mycobacteria, as well as the use of different BCG strains worldwide. We had the opportunity to follow infants vaccinated with BCG Moreau RDJ and BCG Russian-I, and evaluate whether different strains induce different immune responses when vaccine is administrated very early in life.

Although we must consider the important and avoidable limitations regarding randomization and reduced sample size in this immunological evaluation, further assessment of vaccine effectiveness and TB incidence will be performed within a larger population from where this small sample was taken (data not published). To provide information about the impact in BCG efficacy caused by the enforced change of BCG strain in Brazil, we compared the immune response of infants vaccinated with BCG Moreau RDJ and BCG Russian-I in different experimental conditions.

The background immune response, represented here as non-stimulated cultures, showed an increase in a cytokine profile production associated with a regulatory effect following BCG Moreau RDJ vaccination. The impact that aging, among other factors, might have on cytokine production has well described previously [12,13]. In a study published by Raes et. al (2010), no difference was found in the cytokine quantification in cryopreserved serum samples at two and six months. In contrast, similarly with what was found here, IL-10 was higher in infants when compared with children with higher environmental exposure early in life [15] and in

adults, although we did not find the same for TNF [16]. In addition, one important factor to consider is that comparison between samples and studies is not always reliable as study design, time between blood collection and in vitro cultures, age and overall methods are usually different among the studies.

To investigate the immune response induced by both BCG Moreau RDJ and BCG Russian-I, we quantified the cytokines production stimulated by each strain in the cultures supernatant before and after vaccination. High levels of IL-2 and IFN- γ were shown in both groups at similar levels after vaccination, suggesting that both strains share some similarities and that genetic differences between the two strains may not influence the classic Th1 response induced by BCG vaccination [7]. Nonetheless, many studies have described BCG Russia as less immunogenic than other strains [11,17]. Although it is fundamental in the immunopathology of TB, the classical IFN- γ production in response to BCG is not sufficient to protect against the disease [18,19]. Despite close phylogeny similarities between BCG Moreau and BCG Russia, we found here a more prominent pro-inflammatory cytokine profile induced after BCG Russia, which included IL-6 and TNF, in accordance to the innate immune response maturation shown over the first nine months of life, reported by Shey et. al (2014).

Among the demographic variables, most characteristics were similar between groups, except for previous maternal contact with TB in the BCG Moreau RDJ group. It has been reported an association between latent tuberculosis infection (LTBI) in mothers and a diminished response of IFN- γ -expressing CD4⁺ T cells and decreased levels of purified protein derived (PPD)-specific antibodies [21]. Further assessment identified a down-regulation in IFN- γ and inflammatory pathways at one week in infants from LTBI mothers and an unexpected up-regulation at six weeks when compared to infants from non-exposed mothers [22]. Increase in non-stimulated IL-4 may be also affecting the Th1 response against BCG in the group

vaccinated with strain Moreau [23]. Regardless, it is also appropriate to evaluate the BCG-induced responses to *M. tuberculosis* rather than only BCG [6,20].

Despite the efforts to understand the immune response specific to *M. tuberculosis*, we found no difference over time in BCG Moreau RDJ and BCG Russian-I vaccinated groups. Similar results were described by Ritz et. al (2012), where in vitro stimulation with *M. tuberculosis* failed in inducing any change in cytokine production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells and also secreted cytokine levels. The fact that the mycobacteria was inactivated by heat may have influenced the amount of cytokines quantified as the live bacilli is capable to induce higher cytokines levels than dead ones [24].

According to Santiago et al. (2003), it is possible to use BCG scar as a sensitive measure to determine vaccination in the first month of life and up to three years after vaccination [25]. However, the scar absence has been related to an increased risk of *M. tuberculosis* infection in children living in endemic regions - and therefore more likely to be infected [26]. Here, although no statistical evaluation was performed related to the size of the lesions caused by vaccination with the BCG Moreau RDJ and Russian-I strains, it was possible to observe a milder resolution in the group vaccinated with the Russian-I strain.

In a study carried out in Uganda, the proportion of children who developed the vaccine scar was different among groups vaccinated with different strains of BCG: vaccination with BCG Russia was related to 52.2% of vaccine scar formation, while BCG Bulgaria and BCG Denmark were associated with 64.1% and 92.6%, respectively. In another study, BCG Russia vaccination also induced a significantly less extensive local reaction (median 2 mm; IQR, 1–4 mm) ($p = 0.001$) than children vaccinated with BCG Denmark (median 5 mm; IQR 4–7 mm) and BCG Japan (median 5 mm; IQR, 3–7 mm) [17]. Although we were unable to uphold the association between vaccine strain and scar formation, these findings together endorse the development of the vaccine scar as dependent on the strain administered.

5. Conclusions

Despite minor genetic variations among early strains, cytokine profiles induced after vaccination with BCG Moreau RDJ and BCG Russian-I were complex but still share some similarities. Both strains stimulated the classic Th1 pattern, although BCG Russian-I was a stronger inducer of inflammatory cytokines *in vitro*. In contrast, BCG scarring was more evident after vaccination with BCG Moreau RDJ, with BCG Russian-I resulting in a milder skin vaccine lesion. Thus, the replacement of BCG Moreau for BCG Russian-I would be a practical solution to overcome a shortage in the local manufacturing of BCG Moreau.

Acknowledgments

The authors would like to thank our technical team who did an amazing job supporting this project, specially Juliane Amorim. To all families and babies, our special thanks. To the others involved but not mentioned, you were all essential to this project.

Funding

This work was supported by the Ministry of Health of Brazil.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PEM, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials.

- Clin Infect Dis 2014;58:470–80. <https://doi.org/10.1093/cid/cit790>.
- [2] Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto ML. BCG vaccine against tuberculosis: Its protective effect and vaccination policies. *Rev Saude Publica* 2007;41:59–66. <https://doi.org/S0034-89102007000800009> [pii].
- [3] Barreto ML, Pereira SM, Pilger D, Cruz AA, Cunha SS, Sant’Anna C, et al. Evidence of an effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: Second report of the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Vaccine* 2011;29:4875–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.023>.
- [4] Kagina BMN, Abel B, Scriba TJ, Hughes EJ, Keyser A, Soares A, et al. Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1073–9. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0334OC>.
- [5] Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assunção JA, Gao G, et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep* 2015;5:1–15. <https://doi.org/10.1038/srep15443>.
- [6] Ponte C, Hacker M, Moraes M, Castello-Branco L, Silva F, Antas P. The patterns of in vitro cell-death and inflammatory cytokines induced by distinct BCG vaccine strains are differentially induced in human mononuclear cells. *Hum Vaccines Immunother* 2017;14:1–8. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1382788>.
- [7] Dockrell HM, Smith SG. What have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years? *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01134>.
- [8] Ritz N, Curtis N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. *Tuberculosis* 2009;89:248–51. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.03.002>.
- [9] Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assunção JA, Gao G, et

- al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep* 2015;5:1–15. <https://doi.org/10.1038/srep15443>.
- [10] Smith SG, Kleinnijenhuis J, Netea MG, Dockrell HM. Whole Blood Profiling of *Bacillus Calmette–Guérin*-Induced Trained Innate Immunity in Infants Identifies Epidermal Growth Factor, IL-6, Platelet-Derived Growth Factor-AB/BB, and Natural Killer Cell Activation. *Front Immunol* 2017;8:1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00644>.
- [11] Ritz N, Dutta B, Donath S, Casalaz D, Connell TG, Tebruegge M, et al. The influence of bacille Calmette-Guérin vaccine strain on the immune response against tuberculosis: A randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:213–22. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0714OC>.
- [12] Decker M-L, Grobusch MP, Ritz N. Influence of Age and Other Factors on Cytokine Expression Profiles in Healthy Children—A Systematic Review. *Front Pediatr* 2017;5. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00255>.
- [13] Figueiredo CA, Alcântara-Neves NM, Veiga R, Amorim LD, Dattoli V, Mendonça LR, et al. Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. *Environ Health Perspect* 2009;117:845–9. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800366>.
- [14] Raes M, Scholtens PAMJ, Alliet P, Hensen K, Jongen H, Boehm G, et al. Exploration of basal immune parameters in healthy infants receiving an infant milk formula supplemented with prebiotics. *Pediatr Allergy Immunol* 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2009.00957.x>.
- [15] Decker ML, Gotta V, Wellmann S, Ritz N. Cytokine profiling in healthy children shows association of age with cytokine concentrations. *Sci Rep* 2017;7.

- <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17865-2>.
- [16] Yerkovich ST, Wikström ME, Suriyaarachchi D, Prescott SL, Upham JW, Holt PG. Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. *Pediatr Res* 2007. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181568105>.
- [17] Anderson EJ, Webb EL, Mawa PA, Kizza M, Lyadda N, Nampijja M, et al. The influence of BCG vaccine strain on mycobacteria-specific and non-specific immune responses in a prospective cohort of infants in Uganda. *Vaccine* 2012;30:2083–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.053>.
- [18] Abebe F. Is interferon-gamma the right marker for bacille Calmette-Guérin-induced immune protection? The missing link in our understanding of tuberculosis immunology. *Clin Exp Immunol* 2012;169:213–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04614.x>.
- [19] Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: A randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 2013;381:1021–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60177-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60177-4).
- [20] Shey MS, Nemes E, Whatney W, de Kock M, Africa H, Barnard C, et al. Maturation of Innate Responses to Mycobacteria over the First Nine Months of Life. *J Immunol* 2014;192:4833–43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400062>.
- [21] Mawa PA, Nkurunungi G, Egesa M, Webb EL, Smith SG, Kizindo R, et al. The impact of maternal infection with *Mycobacterium tuberculosis* on the infant response to bacille Calmette–Guérin immunization. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2015;370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0137>.
- [22] Mawa PA, Webb EL, Filali-Mouhim A, Nkurunungi G, Sekaly RP, Lule SA, et al. Maternal BCG scar is associated with increased infant proinflammatory immune

- responses. *Vaccine* 2017;35:273–82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.079>.
- [23] Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:821–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00118.x>.
- [24] Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Fujita Y, Yano I, Yamamoto S, et al. Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009;56:116–28. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00559.x>.
- [25] Santiago EM, Lawson E, Gillenwater K, Kalangi S, Lescano AG, Du Quella G, et al. A prospective study of bacillus Calmette-Guérin scar formation and tuberculin skin test reactivity in infants in Lima, Peru. *Pediatrics* 2003;112. <https://doi.org/10.1542/peds.112.4.e298>.
- [26] Dhanawade S, Kumbhar S, Gore A, Patil V. Scar formation and tuberculin conversion following BCG vaccination in infants: A prospective cohort study. *J Fam Med Prim Care* 2015;4:384. <https://doi.org/10.4103/2249-4863.161327>.