

**Avaliação de Métodos Alternativos para Controle de
Potência do Componente Pertussis da Vacina DTP
(Vacina contra Difteria, Tétano e Pertussis)**

Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Cláudio de Moraes Andrade

Rio de Janeiro

2003

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação de Métodos Alternativos para Controle de Potência do Componente Pertussis da Vacina DTP (Vacina contra Difteria, Tétano e Pertussis)

Nome do Autor: Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. _____ (Doutor)

Cláudio de Moraes Andrade

Prof. _____ (Doutor)

Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Prof. _____ (Doutor)

Raphael Hirata Júnior

Orientador: Dr. Cláudio de Moraes Andrade

Rio de Janeiro

2003

FICHA CATALOGRÁFICA:

Dias, Alexandre Alves de Souza de Oliveira

Avaliação de Métodos Alternativos para Controle de Potência do Componente Pertussis da Vacina DTP (Vacina contra Difteria, Tétano e Pertussis)./ Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2003.

121 p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2003. Orientador: Cláudio de Moraes Andrade.

1. Componente Pertussis. 2. Métodos alternativos. 3. Vacina DTP. 4. Desafio Intracerebral. 5. Desafio Intranasal. 6. ELISA

2. Título.

AGRADECIMENTOS

A Maria Aparecida Affonso Boller pela sua preciosa ajuda em todos os aspectos deste trabalho.

A Dra. Ana Luíza Mattos Guaraldi pelas incontáveis horas de trabalho dispensadas nesta dissertação.

Aos amigos João e Eugenio pela “força” em todos os sentidos.

Ao Dr. Marcio Labastier pela paciência e apoio estatístico tão útil na consolidação dos resultados obtidos.

Ao amigo Nelson por sua fundamental ajuda durante toda a experimentação animal.

A Dra. Rugimar, Fátima e Andréa pela enorme colaboração para realização dos ensaios de ELISA.

Ao Dr. Cláudio pela confiança depositada e pelo incentivo constante.

Ao Departamento de Imunologia e toda a sua força de trabalho pela enorme cooperação conferida a este estudo.

Ao GT-VAC pelo apoio em vários momentos e principalmente por tornar disponível os lotes de vacinas testados neste projeto.

A Coordenação de Pós-Graduação pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional oferecida.

Ao INCQS pelo suporte dado à realização deste estudo.

RESUMO

De acordo com reunião entre produtores e comitê de expertos da OMS, realizada em novembro de 1998, ficou estabelecida a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias alternativas que atestem a atividade imunogênica de novas formulações de vacinas pertussis acelulares e de outras preparações sem a participação de estudos clínicos complementares. O aumento do número de notificações ocorrido nos últimos vinte anos, reforça a busca de modelos experimentais que assegurem a qualidade das vacinas disponíveis no mercado. No presente trabalho lotes de vacina pertussis celular e acelular foram testados pelos métodos de desafio intranasal (DIN) e ELISA. Os resultados alcançados foram comparados aos resultados obtidos pelo ensaio de desafio intracerebral (DIC).

Em nossos estudos percebemos a existência variações intra e interlaboratoriais quanto aos resultados obtidos pelo método clássico de DIC. Análises estatísticas demonstraram que os métodos DIN e ELISA apresentaram repetibilidade e capacidade em discriminar os produtos testados. Somado a isto, foi possível uma acentuada redução no número de animais utilizados bem como no nível de estresse proporcionado aos mesmos. A reprodutibilidade dos ensaios sugere que os métodos podem ser utilizados como alternativa, também sob nossas condições, na verificação de consistência de produção lote a lote, análise prévia, além de auxiliar nos estudos visando melhor entendimento dos componentes envolvidos nos mecanismos de infecção e de resposta imune à infecção por *Bordetella pertussis*.

ABSTRACT:

According to the agreement achieved between producers and the WHO Expertise Committee, which took place in November 1998, it was established the need for the development of new alternative methods in order to certify the immunogenic activity of new acellular pertussis vaccine formulations and other substances without complementary clinical trials. The increasing number of case notifications in the last twenty years, reinforce the seeking of experimental models for the quality assurance of commercially available vaccines. In the following study, batches of cellular and acellular pertussis vaccine were analyzed by the intranasal challenge method (DIN) and ELISA. The results achieved were compared to the results reached by means of the intracerebral challenge assay (DIC). We observed different intra and inter-laboratory variations, concerning the results obtained by the classic DIC method. Statistical analysis showed that both DIN and ELISA tests were reproducible, revealing a considerable power of discrimination. In addition, it was possible to perform a remarkable reduction of the number of animals and also to diminish the stress caused to them. The reproducibility of the assays observed, suggest that these methods could be used as an alternative, even by our quality control system, to check the consistency of the (batch to batch) production and previous analysis, also contributing to the studies aiming a better understanding of the pathology and immune response pathways of the *Bordetella pertussis* infection.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACT – Toxina Adenilato Ciclase

Ad libitum – à vontade

Adp – Di-fosfato de Adenosina

Amp-c – Mono-fosfato Adenosina Cíclico

ATCC – American Type Culture Collection

Bp – *Bordetella pertussis*

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CENEPI – Centro Nacional de Epidemiologia

DE50 – Dose Efetiva 50%

DIC– Desafio Intracerebral

DIN – Desafio Intranasal

DL50 – Dose Letal 50%

DO – Densidade Ótica

DTP – Vacina Pertussis Celular

DTP_A – Vacina Pertussis Acelular

DTP_A3 – Vacina Pertussis Acelular de 3 Componentes

DTP_A4 – Vacina Pertussis Acelular de 4 Componentes

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FDA – Food and Drugs Administration

FHA – Filamentos de Hemaglutinina

Funasa – Fundação Nacional de Saúde

Ig – Imunoglobulina

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LPS – Lipopolissacarídeo

Nava – North American Vaccine Inc.

NIH – National Institute of Health

OMS – Organização Mundial de Saúde

PNI – Programa Nacional de Imunizações

PRN – Pertactina

PT – Toxina Pertussis

SAL – Serviço de Animais de Laboratório

SW – Swiss Webster

TCT – Toxina Cito-Traqueal

TNTC – Too Numerous to Count

UI – Unidade Internacional
UOp – Unidade Opacimétrica
WHO – World Health Organization

| LISTA DE FIGURAS | Página |
|--|---------------|
| FIGURA 1. Casos de coqueluche nos Estados Unidos (CDC, 2003). | 4 |
| FIGURA 2. Casos de coqueluche no Brasil (FUNASA, 2003). | 8 |
| FIGURA 3. Óbitos por coqueluche no Brasil (FUNASA, 2003). | 8 |
| FIGURA 4. Quadro de complicações por idade nos Estados Unidos (CDC, 2003). | 17 |
| FIGURA 5. Diagramação dos eventos durante infecção por <i>Bordetella pertussis</i> (Wardlaw & Parton, 1988). | 21 |
| FIGURA 6. Esquema simplificado de produção e controle da vacina pertussis celular (Portaria MS nº 175, 1996). | 29 |
| FIGURA 7. Resultados dos testes de desafio intracerebral. | 49 |
| FIGURA 8. Números de bactérias viáveis em camundongos controle inoculados com solução salina. | 55 |
| FIGURA 9. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com a vacina de referência. | 57 |
| FIGURA 10. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com vacina pertussis celular. | 60 |
| FIGURA 11. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com vacina pertussis acelular. | 63 |
| FIGURA 12. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com vacina pertussis acelular de três componentes. | 67 |
| FIGURA 13. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com vacina pertussis acelular de quatro componentes. | 69 |
| FIGURA 14. Comparação das médias dos números de bactérias viáveis em grupos de camundongos inoculados com solução salina, vacina de referência, vacina pertussis celular e vacina pertussis acelular. | 72 |
| FIGURA 15. Comparação das médias dos números de bactérias viáveis em grupos de camundongos inoculados com solução salina, vacina de referência, vacina pertussis celular, vacina pertussis acelular de três componentes e vacina | 75 |

pertussis acelular de quatro componentes.

FIGURA 16. Valores de densidade ótica obtidos pelo ensaio de ELISA utilizando duas linhagens de camundongos suíços albinos: Swiss-Webster e NIH. 78

FIGURA 17. Potência média de cada lote de vacina pertussis celular submetido ao ensaio de ELISA. 81

FIGURA 18. Comparação das médias dos resultados de imunoproteção de lotes de vacina pertussis celular pelos ensaios de ELISA e de desafio intracerebral. 85

FIGURA 19. Comparação das médias dos resultados de potência pelo ensaio de ELISA realizados em vacina pertussis celular, vacina pertussis acelular de três componentes e vacina pertussis acelular de quatro componentes frente a uma vacina de referência. 91

| LISTA DE TABELAS | Página |
|--|---------------|
| TABELA 1. Casos e óbitos por coqueluche notificados no Brasil (FUNASA, 2003). | 7 |
| TABELA 2. Composição, por dose, das vacinas pertussis acelulares de três e de quatro componentes. | 38 |
| TABELA 3. Resultados dos testes de desafio intracerebral. | 48 |
| TABELA 4. Resultados do teste de desafio intracerebral de seis lotes de vacina pertussis celular utilizados também nos ensaios de ELISA. | 50 |
| TABELA 5. Análise estatística (ANOVA, $p>0,05$) dos resultados de desafio intracerebral. | 51 |
| TABELA 6. Números de bactérias viáveis em camundongos controle inoculados com solução salina. | 54 |
| TABELA 7. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com a vacina de referência. | 56 |
| TABELA 8. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com vacina pertussis celular. | 59 |
| TABELA 9. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com vacina pertussis acelular. | 62 |
| TABELA 10. Correlação dos resultados obtidos por produto utilizado no ensaio de desafio intranasal. | 64 |
| TABELA 11. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com vacina pertussis acelular de três componentes. | 66 |
| TABELA 12. Números de bactérias viáveis em camundongos imunizados com vacina pertussis acelular de quatro componentes. | 68 |
| TABELA 13. Médias dos números de bactérias viáveis em grupos de camundongos inoculados com solução salina, vacina de referência, vacina pertussis celular e vacina pertussis acelular. | 71 |
| TABELA 14. Comparação das médias dos números de bactérias viáveis em grupos de camundongos inoculados com solução salina, vacina de referência, vacina pertussis celular, | 74 |

| | |
|---|----|
| vacina pertussis acelular de três componentes e vacina pertussis acelular de quatro componentes. | |
| TABELA 15. Análise estatística (ANOVA, $p>0,05$) dos resultados de desafio intranasal. | 76 |
| TABELA 16. Valores de densidade ótica obtidos pelo ensaio de ELISA utilizando duas linhagens de camundongos suíços albinos: Swiss-webster e NIH. | 79 |
| TABELA 17. Potência de cada lote de vacina pertussis celular submetido a três ensaios de ELISA frente a uma vacina de referência. | 82 |
| TABELA 18. Médias dos resultados de imunoproteção de lotes de vacina pertussis celular pelos ensaios de ELISA. | 83 |
| TABELA 19. Análise estatística (ANOVA, $p>0,05$) dos resultados de ELISA e DIC obtidos por lotes de vacina pertussis celular. | 86 |
| TABELA 20. Potência obtida em cada ensaio de ELISA utilizando vacina pertussis acelular de três e de quatro componentes. | 88 |
| TABELA 21. Comparação das médias dos resultados de potência pelo ensaio de ELISA realizados em vacina pertussis acelular de três componentes e vacina pertussis acelular de quatro componentes frente a uma vacina de referência. | 89 |
| TABELA 22 Comparação das médias dos resultados de potência pelo ensaio de ELISA realizados em vacinas pertussis celular, vacina pertussis acelular de três componentes e vacina pertussis acelular de quatro componentes frente a uma vacina de referência. | 92 |
| TABELA 23. Análise estatística (ANOVA, $p>0,05$) dos resultados de ELISA. | 93 |

| SUMÁRIO | Página |
|--|---------------|
| Resumo | v |
| Abstract | vi |
| Lista de abreviaturas | vii |
| Lista de figuras | ix |
| Lista de tabelas | xi |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Histórico | 1 |
| 1.2 Aspectos epidemiológicos | 2 |
| 1.3 Agente etiológico | 9 |
| 1.4 Principais antígenos | 10 |
| 1.5 Patogenia | 13 |
| 1.6 Aspectos clínicos | 18 |
| 1.7 Relação parasita-hospedeiro | 18 |
| 1.8 Imunização ativa | 22 |
| 1.9 Situação atual | 25 |
| 1.10 Relevância do estudo | 30 |
| 2 Objetivos | 34 |
| 3 Material e Métodos | 35 |
| 3.1 Animais | 35 |
| 3.2 Microrganismo e cultivo | 35 |
| 3.3 Vacinas | 36 |
| 3.4 Comissão de ética no uso de animais de laboratório | 37 |
| 3.5 Desafio Intracerebral (DIC) | 39 |
| 3.6 Desafio Intranasal (DIN) | 42 |
| 3.7 Elisa | 44 |
| 4 Resultados | 47 |
| 4.1 Ensaio de DIC | 47 |
| 4.2 Ensaio controle de DIN | 52 |
| 4.3 Ensaio de DIN com vacina pertussis celular | 58 |
| 4.4 Ensaio de DIN com vacina pertussis acelular | 61 |
| 4.5 Comparação dos resultados dos ensaios de DIN | 70 |
| 4.6 Comparação de Ensaio de ELISA entre linhagens de camundongos | 77 |

| | |
|---|-----|
| 4.7 Ensaio de ELISA com a vacina celular (DPT) | 80 |
| 4.8 Comparação entre os resultados de ELISA e DIC | 84 |
| 4.9 Ensaio de ELISA com a vacina acelular (DPT _A) | 87 |
| 4.10 Análise estatística dos resultados do ensaio de ELISA | 90 |
| 5 Discussão | 94 |
| 5.1 Desafio Intracerebral | 94 |
| 5.2 Desafio Intranasal | 95 |
| 5.3 ELISA | 96 |
| 6 Conclusões | 98 |
| 7 Referências bibliográficas | 100 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A coqueluche, tosse comprida ou tosse quintosa, também denominada pertussis na literatura internacional, é doença humana reconhecida há vários séculos, tendo sido relatada com precisão, pela primeira vez em 1578. O agente etiológico - *Bordetella pertussis* - foi descrito em 1900 e cultivado pela primeira vez em 1906 por Bordet e Gengou, conforme revisado por Atkinson, 2000.

A primeira avaliação de eficácia da vacina contra a coqueluche constituída por bactérias mortas foi efetuada por Madsen (1933). Em 1942, Kendrick e colaboradores publicaram os resultados de estudos de campo realizados com a associação da vacina antipertussis e do toxóide diftérico precipitado pelo alume. Com seu aperfeiçoamento e a possibilidade de avaliação de sua potência, a vacina antipertussis passou a ser usada em alta escala, ainda na década de 1940, tendo-se obtido acentuada diminuição da morbimortalidade da coqueluche nos anos subseqüentes (Atkinson *et al.*, 2000).

A controvérsia sobre o risco/benefício da vacina antipertussis, atingiu o clímax no início da década de 1980, devido à suspensão da vacinação na Inglaterra, Japão e Suécia. Com conseqüente surgimento de epidemias e aumento no número de óbitos, (Romanus *et al.*, 1987) fundamentalmente relacionados com (a) a drástica redução de morbimortalidade da coqueluche nos países desenvolvidos, da qual resultou o desconhecimento da doença pela população que passou a menosprezar sua importância e gravidade; (b) ao fato da vacina induzir efeitos adversos locais e sistêmicos de pequena gravidade, porém com frequência relativamente alta, e de terem sido atribuídas a ela complicações graves, embora consideradas raras, como febre persistente acima dos 38,5 °C, síndrome hipotônica hiporresponsiva, encefalopatias e morte súbita em crianças; (c) além das vacinas disponíveis no mercado conferirem imunidade por curto espaço de tempo, inclusive após múltiplas doses, conforme indicado no calendário atual.

A despeito de todos os esforços empreendidos pela comunidade científica alguns mecanismos da patogenia e da resposta imune desencadeada após infecção pela *B. pertussis* permanecem desconhecidos.

1.2 Aspectos Epidemiológicos

O homem é o único reservatório natural da *Bordetella pertussis*, e recentemente foi demonstrada a existência de portadores assintomáticos crônicos. O período de incubação da coqueluche é de 7 a 14 dias e a transmissão dá-se por contato direto, por intermédio de secreções nasofaríngeas. A transmissibilidade inicia-se no fim do período de incubação, estendendo-se até a primeira semana da fase catarral - quando alcança intensidade máxima - diminuindo durante o período paroxístico. A coqueluche é uma das doenças mais contagiosas, sendo de 90% a taxa de ataque secundário que indica o número de indivíduos suscetíveis que se infectam em uma mesma família, a partir do caso-índice (CDC, 2003).

Estima-se que, em regiões do mundo com maior promiscuidade habitacional e baixa cobertura de vacinação, 80% das crianças com menos de cinco anos de idade tenham sido imunizadas por intermédio da infecção natural (Muller *et al.*, 1987).

Nos países desenvolvidos, o número de casos relatados, em todas as épocas, não deve corresponder a 15-25% da prevalência real da coqueluche pela dificuldade de diagnóstico. No período, que corresponde às primeiras três décadas deste século, a doença ocorria de forma endêmica, com surtos epidêmicos observados com intervalos de dois a cinco anos - média de 3,3 anos nos Estados Unidos, onde houve 36.013 óbitos por coqueluche entre 1926 e 1930.

Em 1940, nos EUA, a coqueluche causava mais óbitos no primeiro ano de vida do que difteria, meningite, poliomielite e sarampo juntos (Feigin & Cherry, 1987).

Na década de 1970 a Organização Mundial de Saúde fez uma estimativa mundial de que nos anos de 1980/1990 teríamos 60 milhões de casos de coqueluche notificados por ano com aproximadamente 1% de óbitos de crianças até cinco anos (Keja *et al.*, 1976).

Embora tenha ocorrido redução do índice de mortalidade por coqueluche em associação com a melhoria das condições socioeconômicas e sanitárias nos países do Primeiro Mundo desde o início do século XX, essa diminuição não se compara à que se verificou após a introdução do emprego da vacina antipertussis, a partir da década de 1940. De 1979 a 1981, foram relatados nos

EUA apenas sete óbitos, todos em crianças não vacinadas menores de um ano de idade (Feigin & Cherry, 1987).

No passado, alguns especialistas entendiam que a manutenção da periodicidade epidêmica, mesmo com altas coberturas vacinais, seria sugestiva de que a imunidade obtida com a vacinação antipertussis não seria suficiente para impedir a infecção, embora fosse muito eficaz em prevenir a doença, especialmente as formas mais severas. A circulação da *B. pertussis* seria mantida, não se alterando os intervalos interepidêmicos, mas apenas a extensão dos surtos, por estar limitada a expressão clínica da doença. Porém dados mais recentes, indicam que a dinâmica de atuação da bactéria sofreu alteração, sincronizando as epidemias e expandindo os intervalos interepidêmicos, dando assim, suporte à conclusão de que a vacinação em massa diminuiu a circulação da bactéria (Préziosi & Halloran, 2003).

Desde 1991, quase 50 anos após a introdução de vacinação em massa, tem-se observado aumento do número de casos de infecção por pertussis, e alguns fatores foram propostos como causadores destas epidemias - incluindo queda da imunidade conferida por mudanças na fabricação de vacinas, falha na cobertura vacinal, variação antigênica entre cepa circulante e a cepa vacinal - enfatizando, então, a tendência de buscar um modelo para teste de eficácia e segurança que se aproxime de modelo humano (**FIGURA 1**). Outro fator que parece contribuir com o aumento das taxas seria uma menor eficácia das vacinas acelulares contra coqueluche (Guiso *et al.*, 1999b).

Em populações sem cobertura vacinal, a coqueluche apresenta-se como um dos maiores problemas de saúde em crianças com idade até cinco anos. Sendo a causa mais comum de óbito a pneumonia secundária. Dados de 1990/1996 mostram que 10% dos casos derivam para uma pneumonia secundária, sendo 17% dos casos em crianças abaixo dos seis meses de idade. O microrganismo pode ser isolado em 25% dos casos em adultos com 7 ou mais dias de tosse. Apesar destes pacientes apresentarem uma forma branda da doença, eles transmitem o patógeno para pessoas susceptíveis, incluindo crianças sem o esquema completo de vacinação. É comum um adulto ser o primeiro caso de coqueluche em uma casa com vários casos da doença notificados (Atkinson *et al.*, 2000).

Pertussis – United States, 1940-2001*

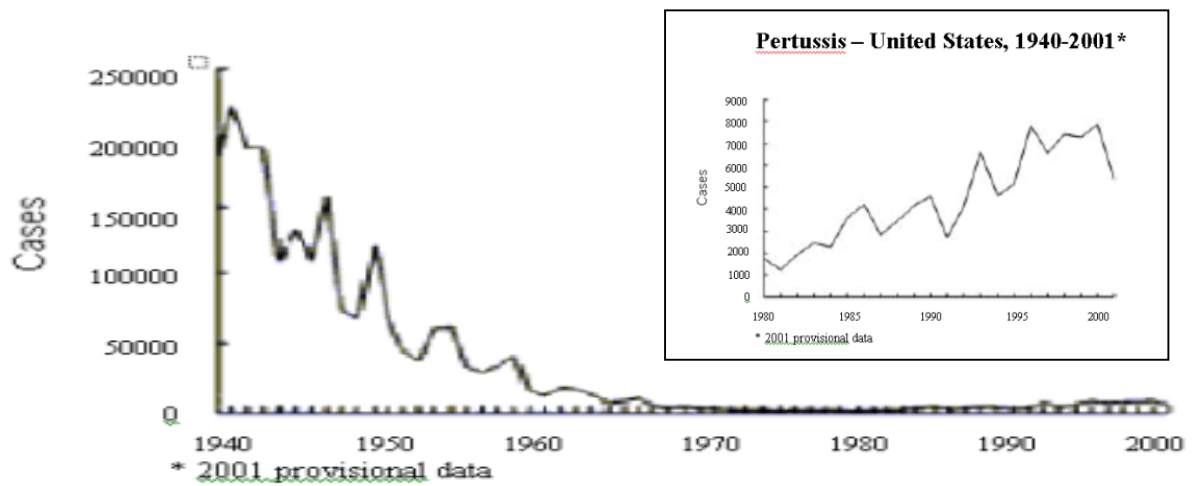


FIGURA 1. Casos de coqueluche nos Estados Unidos (CDC, 2003).

Devido a dificuldade de diagnóstico, a coqueluche é usualmente subnotificada e estima-se que entre 1977 e 1982, o número correto de casos tenha sido dez vezes maior que o oficial e que o número de mortos por complicações secundárias à coqueluche nos EUA entre 1980 e 1990, tenha sido três vezes maior que o divulgado. Esta subnotificação ocorre principalmente pelo sistema de notificação passiva, definição de caso clínico, alto índice de casos considerados moderados ou brandos e que a imunização proteja mais contra os sintomas mais severos do que quanto à infecção propriamente dita. Outra dificuldade identificada foi que de acordo com o desenho do estudo clínico e a definição de caso clínico, estudos de eficácia variaram entre zero e 96% nos últimos 15 anos (Grant & Cherry, 2002). Duclos & Olivé em 2002 ressaltaram, ainda, o fato de que não há uma vigilância epidemiológica consistente em 75% do mundo endossando, assim, a ocorrência de subnotificação dos casos de coqueluche mundialmente.

Nos Estados Unidos, de 1990 até 1996, 32% dos casos de coqueluche requereram tratamento hospitalar (72% em crianças abaixo de seis meses de idade). Neste mesmo período, 84% das mortes registradas por coqueluche ocorreram em crianças abaixo dos seis meses.

Pelo fato de ocorrerem reações adversas severas após o uso de vacina tríplice DTP foram desenvolvidas vacinas pertussis acelulares com composições antigênicas diversas na tentativa de diminuir/eliminar a ocorrência destas reações. Vacinas pertussis acelulares foram licenciadas nos EUA em 1991 para doses de reforço e em 1996 para vacinações primárias. Temos hoje nos EUA quatro vacinas acelulares licenciadas e todas conjugadas com difteria e tétano (CDC, 2003).

Na França, não têm ocorrido relatos de epidemias e não há evidências de que ocorreram alterações na cepa vacinal e/ou na cepa circulante desde que a vacina foi licenciada em 1957. Em 1966, a vacina DTP foi associada à vacina contra *Haemophilus influenza* e, desde 1995, à vacina contra pólio inativada. Até 1967, em solo francês, foi registrada uma média de 5.000 casos de coqueluche anualmente com um declínio para 1000 casos/ano na década de 1970 e de 86 casos/ano na década de 1980. De 1990 até os dias atuais há um aumento do número de casos apesar da cobertura vacinal ser considerada satisfatória, na ordem de 85%. A principal causa deste fenômeno seria a queda

da imunidade devido a ausência de doses reforço (naturais ou não) após os dezoito meses de idade devido a baixa circulação de *Bordetella pertussis* na França. Na tentativa de dirimir estas ocorrências, o Ministério da Saúde francês coloca a disposição uma vacina acelular a título de doses reforço para a população na faixa etária de 11 a 13 anos levando-se em conta a alta reatogenicidade da vacina de célula completa para idades superiores aos sete anos (Njamkepo *et al.*, 2001).

Desde 1991 estudos sobre a eficácia das vacinas acelulares (Locht *et al.*, 1998; Guiso *et al.*, 1999b; Hauser *et al.*, 1999; Canthaboo *et al.*, 2000a; Guiso, 2001) variam quanto ao tipo e número de componentes de vacinas acelulares, além do método de diagnóstico e população alvo, por isso a comparação entre estes estudos é bastante difícil incluindo aí a questão ética de se manter um grupo sem qualquer imunização para servir de controle. Estes estudos indicam que a taxa de cobertura das vacinas acelulares oscila entre 71 a 84% enquanto as vacinas celulares variam entre 70 a 90% com uma taxa de reações adversas na ordem de 50% dos vacinados. Para as vacinas acelulares não há informações confiáveis disponíveis, mas que sugerem a ocorrência de taxas substancialmente menores (CDC, 2003).

No Brasil a estratégia para coqueluche consiste na manutenção da situação de controle atual, por reforço à detecção precoce e bloqueio imediato de qualquer surto detectado, evitando-se a propagação, além da obtenção da cobertura adequada (90% das crianças abaixo de 1 ano) em todos os municípios com o uso da vacina de célula completa. O Ministério da Saúde somente disponibiliza a vacina pertussis acelular para situações especiais tais como crianças que apresentaram reações frente a imunização prévia com a vacina celular. Com estes procedimentos têm sido obtidas quedas acentuadas nos índices de casos notificados de 16.898 em 1987 para 445 em 2001 e de óbitos na ordem de 133 em 1987 para 13 em 2001 (**TABELA 1 e FIGURAS 2 e 3**).

TABELA 1. Casos de Coqueluche e Óbitos no Brasil, FUNASA,2003.

| | 1987 | 1988 | 1989 | 1990 | 1991 | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 |
|--------|-------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Óbitos | 133 | 43 | 97 | 105 | 37 | 41 | 35 | 48 | 42 | 18 | 18 | 23 | 24 | 39 | 13 |
| Casos | 16898 | 8868 | 13810 | 15329 | 7252 | 5155 | 5388 | 4098 | 3798 | 1245 | 1789 | 2040 | 1369 | 1177 | 445 |

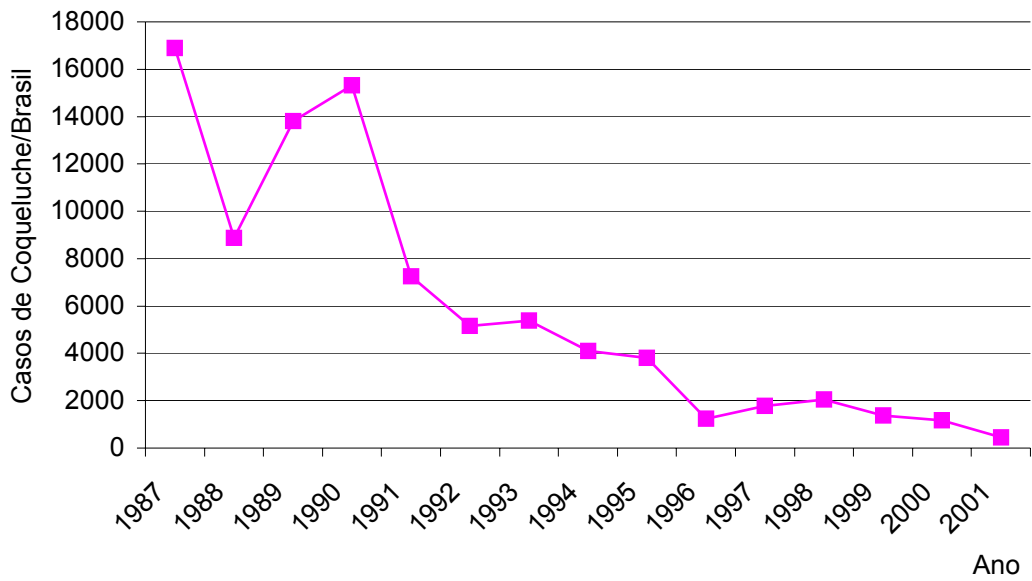


FIGURA 2. Casos de Coqueluche no Brasil, FUNASA, 2003.

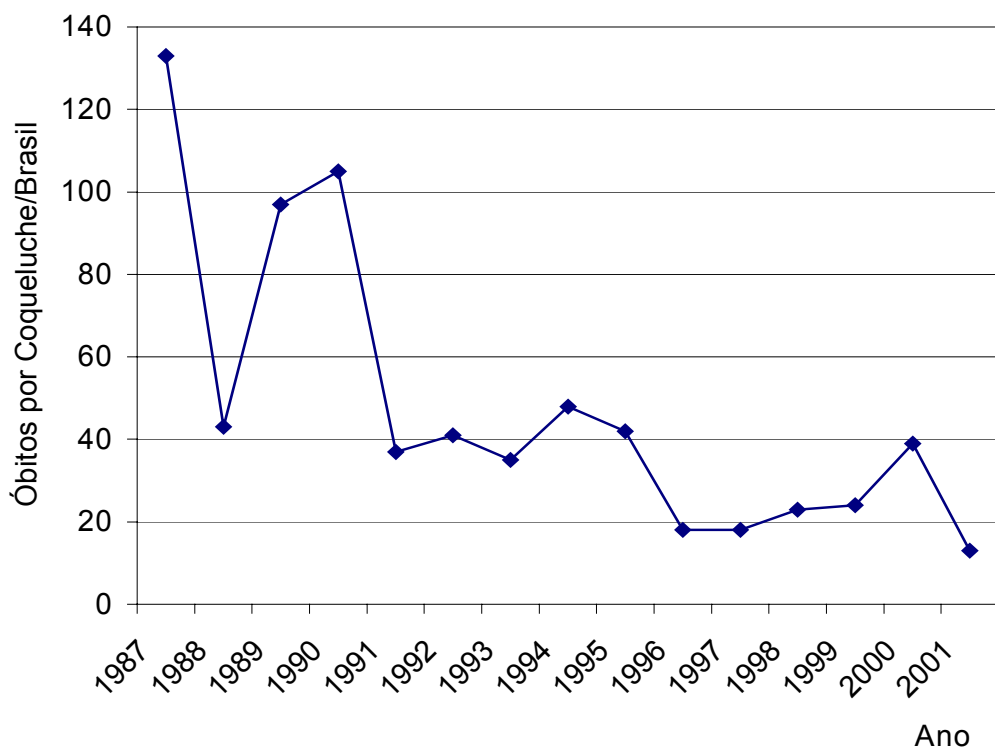


FIGURA 3. Óbitos por coqueluche no Brasil, FUNASA, 2003

1.3 Agente Etiológico

Bordetella pertussis é o principal agente etiológico da coqueluche, é um patógeno humano altamente infeccioso com grande capacidade de colonizar o trato respiratório humano. *B. pertussis*, bacilo Gram negativo, aeróbio, não esporulado, imóvel, no qual durante a cultura, podem ser identificadas quatro fases evolutivas com diferentes expressões antigênicas (modulação). A fase I associada com a virulência da bactéria, sendo essencial sua presença na produção de vacinas eficazes (Amato & Baldy, 1991). Quando cultivada aerobicamente em meio Bordet-Gengou acrescido de sangue, a 36 °C, *Bordetella pertussis* produz colônias puntiformes, convexas, brilhantes e com halo de hemólise (Stainer & Scholte, 1971; Manclark & Cowell, 1984; Stainer, 1988).

A infecção por *B. pertussis* induz forte resposta imune humoral e celular por longo prazo em humanos, em contraste com as vacinas comerciais que proporcionam respostas imunes de curta duração inclusive após múltiplas doses (Locht *et al.*, 1998).

De acordo com a taxonomia corrente há três espécies dentro do gênero *Bordetella*, *B. pertussis* responsável pela síndrome conhecida e suas epidemias, *B. parapertussis* relacionada a uma forma branda da doença e *B. bronchiseptica* ligada a infecções em cães e suínos (Manclark & Cowell, 1984). *B. parapertussis* está intimamente relacionada a *B. pertussis* em termos de fatores de virulência e de adesão tais como filamentos de hemaglutininas, fímbrias, toxina adenilato ciclase, toxina dermonecrótica e pertactina. Em contrapartida, diversos estudos relatam pouca ou nenhuma capacidade da vacina pertussis em proteger contra *B. parapertussis* (Watanabe *et al.*, 2001a). Embora a coqueluche seja modernamente considerada uma síndrome (síndrome pertussis), podendo ser causada por vários agentes (*B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e adenovírus (1, 2, 3 e 5)), apenas a *B. pertussis* está associada com a coqueluche endêmica e epidêmica e com seu conjunto de complicações e de mortes. Este microrganismo possui a capacidade reversível de passar de uma forma virulenta para avirulenta em resposta fenotípica a estímulos ambientais, sendo esta característica favorável à manutenção da bactéria visto que esta, na fase de convalescença perde

vários fatores de virulência, tornando-se de difícil identificação misturando-se à flora do trato respiratório do hospedeiro (Preston, 1988 e Parton, 1999).

1.4 Principais Antígenos

1.4.1 Filamentos De Hemaglutinina (FHA)

Desempenha importante papel na aderência favorecendo colonização do trato respiratório e conseqüentemente a infecção. Anticorpos anti-FHA conferem proteção contra a infecção experimental por via respiratória sem desempenhar qualquer papel quando o desafio é por via intracerebral. Embora não seja um imunógeno tão importante quanto a Toxina Pertussis sua presença potencializa a ação desta em cerca de 50%. Anticorpos anti-FHA são encontrados em quantidades dez vezes maiores em indivíduos convalescentes do que em pós-vacinados (Tuomanen *et al.*, 1988).

A North American Vaccine inc. (NAVA) cita que embora pouco imunogênico para crianças, os filamentos de hemaglutinina funcionam bem como “booster” para adolescentes e adultos jovens (Heront *et al.*, 1999).

Está indicado que a liberação de FHA é importante para a colonização, facilitando a dispersão das bactérias das microcolonias e na ligação aos novos sítios de ação, porém para que isto ocorra de modo eficaz é necessária a maturação de FHA sendo importante a sua presença tanto na superfície celular quanto a sua liberação no meio externo (Coutte *et al.*, 2003).

1.4.2 Toxina Pertussis (PT)

Somente a toxina pertussis é específica da *B. pertussis* enquanto os outros antígenos são expressos, também, por outras espécies do gênero *Bordetella* (König *et al.*, 2002).

É uma exotoxina altamente imunogênica com capacidade de promover hipoglicemia por aumentar a secreção de insulina por parte do hospedeiro. A toxina pertussis está altamente relacionada com a ocorrência de seqüelas neurológicas. Após a infecção experimental por via intranasal promove a hipoglicemia entre 20 e 35 dias. É o mais importante imunógeno tanto em

vacinas celulares quanto acelulares desempenhando também importante papel no desafio intracerebral e no desafio intranasal (Furman *et al.*, 1988).

No início da década de 1970, com as primeiras técnicas de biologia molecular, pensou-se que a coqueluche seria uma doença limitada a toxina pertussis e que por isso bastaria destoxificá-la para obter uma vacina eficaz. Estudos posteriores demonstraram que o toxóide pertussis sozinho seria pobre imunogênicamente mesmo após três doses aos 3, 5 e 12 meses de idade (Cherry & Olin, 1999).

A toxina pertussis funciona tanto como adesina de ação local bem como é a principal responsável por efeitos sistêmicos. Seus efeitos biológicos persistem em humanos um ou dois meses após uma única injeção endovenosa, levando a especulação se a prolongada tosse paroxística estaria relacionada à ação da PT em um ou mais sítios. Sua capacidade de promover linfocitose e hipoglicemia demonstra claramente sua disseminação sistêmica pelo organismo hospedeiro (Hewlett, 1997).

1.4.3 Toxina Adenilato Ciclase (ACT)

Sua localização é extracitoplasmática e possui capacidade de penetrar em células de mamíferos onde causa danos por catalisar a produção de AMPc inibindo as atividades de quimiotaxia e fagocitose de células fagocíticas como macrófagos, monócitos e neutrófilos, diminuindo reação febril e a inflamação, favorecendo a real instalação da infecção. Sua ativação depende da presença da calmodulina que é uma proteína reguladora eucariótica sendo esta relação entre a toxina, célula alvo e a dependência da calmodulina para ativação, uma forte marca da relação parasita e hospedeiro em nível molecular (Manclark & Cowell, 1984).

A toxina adenilato ciclase é uma toxina protéica que é liberada no interior das células do hospedeiro através do contato direto, pode estar presente na superfície da bactéria penetrando nas células fagocíticas do hospedeiro no momento da fagocitose inibindo sua eficiência tanto contra pertussis quanto outras bactérias presentes no trato respiratório. A ACT é imunogênica e anticorpos contra ela são detectáveis em soros de convalescentes e pós-imunizados. Esta toxina tem se mostrado um antígeno protetor em experimentos com animais, mas não há material purificado em quantidades suficientes para ser testado como componente de vacinas acelulares. Esta

limitação está em vias de terminar visto a possibilidade de se desenvolver uma ACT recombinante (Hewlett, 1997; Mobberley-Schuman *et al.*, 2003).

1.4.4 Toxina Termo-Lábil Ou Dermonecrótica

Desnatura-se a 56 °C e sua localização é intracelular sendo liberada ao meio após a lise da bactéria. Possui ação dermonecrótica, letal e capacidade de causar atrofia de baço em camundongos. É a principal responsável por alterações inflamatórias locais durante a infecção sendo característica de fase I de *B. pertussis* e embora seja fraca antigênicamente, após tratamento com formaldeído e calor perde sua toxicidade adquirindo algum poder imunogênico.

Por promover ação sobre a musculatura lisa vascular desencadeia vaso constrição levando a isquemia e necrose de tecidos (Manclark & Cowell, 1984).

1.4.5 Toxina Citotraqueal (TCT)

Esta toxina é a principal envolvida no desenvolvimento inicial da infecção.

Após a colonização, a toxina citotraqueal, promove a destruição das células ciliadas do trato respiratório o que vai impedir a eliminação de muco, bactérias e debris passando, então, ser a tosse a única forma de limpar o trato (Goldman, 1988).

Infelizmente TCT não é imunogênica e de difícil purificação pelos procedimentos de cromatografia líquida, não sendo, portanto, candidata a inclusão como componente de futuras vacinas. As informações disponíveis sobre seu mecanismo de ação podem ser utilizadas no desenvolvimento de agentes terapêuticos para os estágios iniciais da patogenia (Hewlett, 1997).

Em cultura de células de epitélio traqueal de hamster esta toxina demonstra inibir a síntese de DNA, causar efeito citopático e paralisação dos cílios (Manclark & Cowell, 1984; Luker *et al.*, 1995; Hewlett, 1997).

1.4.6 Lipopolissacarídeos

A atividade biológica dos lipopolissacarídeos de *Bordetella pertussis* não difere do composto de outras bactérias gram negativas. Este lipopolissacarídeo se

mostra ser fraco imunógeno tanto em animais de laboratório quanto no homem após vacinação com a vacina celular (Manclark & Cowell, 1984).

Na vacina celular temos lipopolissacarídeos ligados à membrana da célula e sob forma solúvel no meio - e embora não esteja associado a sintomas pós-vacinais severos - é certa a sua participação em pequenas reações adversas consideradas comuns. Sua presença em vacinas acelulares é 10 vezes menor do que em vacinas celulares visto seu relativo baixo poder imunogênico. Deve ser pontuado porém, que certas quantidades de LPS são necessárias por contribuir como adjuvante, colaborando assim, na eficácia da vacina celular e acelular (Chabby & Caroff, 1988).

1.4.7 Pertactina (PRN) ou 69 KDa

Anticorpos anti-PRN são detectáveis no soro de pessoas imunizadas e convalescentes e estes mesmos anticorpos em camundongos defendem os mesmos contra o desafio intranasal. Através do modelo respiratório foi demonstrado que a inclusão de PRN em vacinas acelulares potencializa o "clearance" pulmonar elevando a potencia da vacina (Jefferson *et al.*, 2003 e Capiau *et al.*, 2003).

Embora estudos clínicos tenham falhado em demonstrar correlação direta entre os níveis de anticorpos e a proteção em crianças, há alguns estudos que sugerem que altos níveis de anticorpos contra PRN, fimbrias e PT (nesta ordem) estão associados à proteção contra a doença (Guiso *et al.*, 1999a).

1.5 Patogenia

Na forma clássica da doença, após 7 a 14 dias de incubação inicia-se a fase catarral acompanhada de tosse que é indistinguível de outras patogenias respiratórias, podendo haver febre e convulsões febris. Este relativamente longo período de incubação reflete o tempo necessário para a bactéria se proliferar e produzir toxinas em quantidades suficientes para lesar e causar disfunções no epitélio do hospedeiro. O diagnóstico nesta fase é dado pelo histórico do paciente, possível epidemia, contatos e acessos de tosse seguidos de episódios de vômitos. Esta é a única fase onde a antibioticoterapia mostra-se eficaz na diminuição da duração da infecção. A próxima fase é a paroxística

com o aumento da frequência e severidade dos acessos de tosse com duração média de 3 a 6 semanas entrando então na fase de convalescença que pode durar de 1 a 2 meses. A marca característica da coqueluche é a inspiração ruidosa do ar (“*whoop*”) pela glote parcialmente fechada após tosse paroxística sendo esta ocorrência mais comum em crianças. As complicações estão correlacionadas a fase paroxística onde pode ocorrer anoxia, cianose, ataques apneicos com perda da consciência e convulsões que podem ser tratadas com a entubação endotraqueal e ventilação no sentido de evitar danos cerebrais. Pode acontecer também nesta fase a ocorrência de pneumonias secundárias devido a aspiração de secreções após os acessos de tosse. A congestão venosa durante a tosse paroxística pode levar a uma hemorragia subconjuntival ou/e petéquias na face. O aumento da pressão intratorácica e intrabdominal durante a crise pode levar ao surgimento de hérnias, principalmente nos mais novos, onde o peritônio não se encontra completamente formado. Há relatos de surdez e cegueiras correlacionadas a infecção por pertussis devido, provavelmente, a hemorragias localizadas. Doenças pré-existentes como cardiopatias congênitas, má nutrição e tuberculose continuam fazendo da coqueluche uma doença severa com até 15% de mortalidade entre pacientes internados e a sua longa duração favorece o surgimento de infecções secundárias como enterites e pneumonias (Walker, 1988).

Não é rara a ocorrência de recaídas à fase paroxística durante a convalescença, e a recuperação total pode levar meses refletindo o nome dado a coqueluche na China e no Japão de "Tosse dos 100 dias" (Manclark & Cowell, 1984). A coqueluche é uma doença mediada por toxinas, a bactéria adere aos cílios respiratórios produzindo toxinas que paralisam as células ciliadas dificultando a eliminação do muco favorecendo inflamação do trato respiratório. Este processo interfere na eliminação de secreções pulmonares favorecendo, assim, a pneumonia. Os antígenos da *B. pertussis* parecem permitir que a bactéria escape do sistema de defesa do hospedeiro, a linfocitose é implementada, porém a quimiotaxia é prejudicada. Até pouco tempo acreditava-se que a bactéria não invadiria os tecidos, porém recentes estudos demonstraram sua presença no interior de macrófagos alveolares (Atkinson *et al.*, 2000).

Estudos sugerem que a adesão ao trato respiratório é crítica na susceptibilidade do hospedeiro a doença, conseqüentemente anticorpos antiaderentes presentes nas secreções do trato respiratório agindo contra os antígenos de superfície bacteriana têm um papel relevante no combate a infecção. North (1946) demonstrou que instilando gotas de soro antipertussis de camundongos por via intranasal antes da dose infectante era possível conter a infecção (Manclark & Cowell, 1984).

Um elemento adicional na biologia da *Bordetella pertussis* e ainda não compreendido sob ponto de vista da patogenia é a observação destes microrganismos, bem como de outros representantes do gênero *Bordetella*, dentro de células eucarióticas fagocíticas ou não. A duração e as conseqüências desta sobrevivência intracelular ainda são desconhecidas, bem como se há multiplicação bacteriana nestas condições. Estas descobertas podem ter fundamental importância no desenvolvimento de futuras vacinas e na elucidação dos mecanismos de imunidade natural (Hewlett, 1997).

A fagocitose é influenciada pela interação entre os anticorpos do hospedeiro e a bactéria, onde a toxina adenilato ciclase prejudicaria a fagocitose por parte dos neutrófilos e os filamentos de hemaglutinina a favoreceria. Isto ficou demonstrado através da incubação da *Bordetella pertussis* junto a soro rico em anticorpos específicos anti-adenilato ciclase que neutralizariam sua ação, favorecendo a fagocitose por parte dos neutrófilos sendo que o inverso ocorre quando incubamos a bactéria frente a um soro com anticorpos anti-filamentos de hemaglutinina e notamos uma diminuição da eficiência dos neutrófilos em fagocitar a bactéria. Outro experimento que demonstra este fato é que em cepas mutantes desprovidas de adenilato ciclase são facilmente fagocitadas se comparadas às cepas selvagens sem qualquer modificação em sua estrutura (Mobberley-Schuman *et al.*, 2003).

Cepas de *B. pertussis* mutantes, sem toxina pertussis ou filamentos de hemaglutinina, mantém sua capacidade de colonizar o trato respiratório de camundongos próxima a de cepas sem qualquer modificação. Contudo cepas que demonstrem a ausência de ambos os antígenos perdem muito de sua capacidade de colonizar o trato respiratório em animais. Neste modelo ficou demonstrado que em ausência de FHA, a colonização não ocorre devido à propriedade de adesina da toxina pertussis e sim por sua atividade sobre o difosfato de adenosina (ADP) que causa forte inflamação no trato afetado. Em

cepas deficientes de toxina pertussis ocorre branda inflamação e a colonização se dá basicamente pela ação dos filamentos de hemaglutinina (Coutte *et al.*, 2003).

Em populações com altas taxas de cobertura vacinal, a *B. pertussis* alterou sua epidemiologia acometendo recém nascidos antes das primeiras doses e jovens e adultos quando a imunidade induzida pela vacina declina (**FIGURA 4**) (Capiou *et al.*, 2003).

Pertussis – United States, 1985-2000 **Age Distribution of Reported Cases**

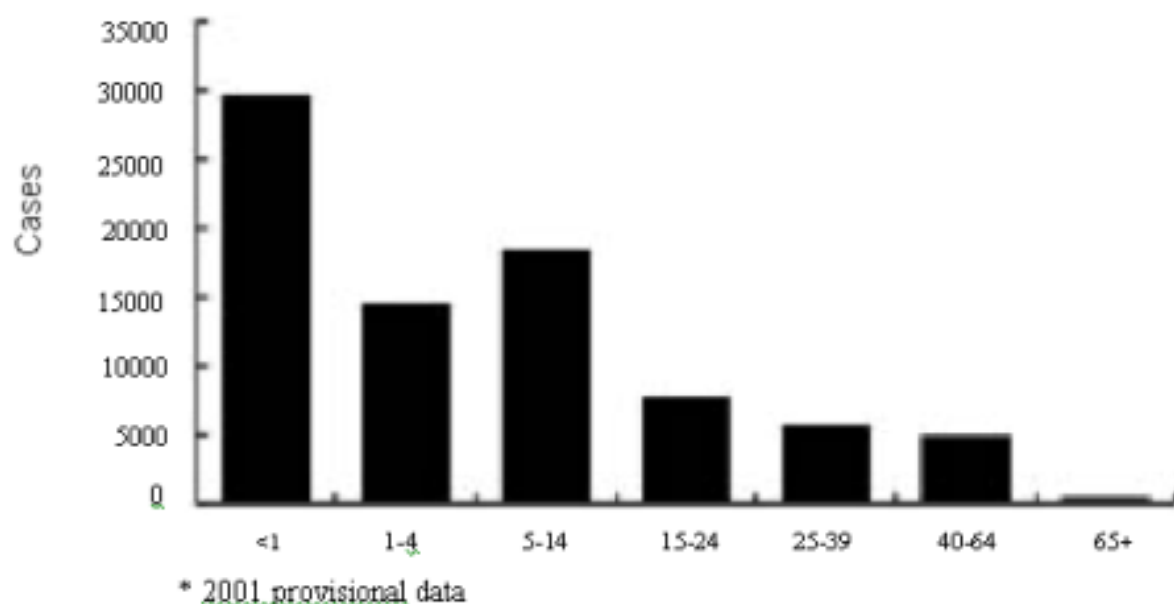


FIGURA 4. Complicações por idade nos EUA, CDC, 2003.

1.6 Aspectos Clínicos

O contágio se dá pessoa a pessoa através da inalação de aerossóis ou contato com superfícies contaminadas das mãos conduzindo até a entrada do trato respiratório seja o nariz ou a boca. Embora sejam infectados experimentalmente, animais não possuem a capacidade de infectar o homem. A doença é distribuída mundialmente e sua intensidade de transmissão é afetada pela intimidade e frequência à exposição bem como a deficiências na imunidade. A tosse paroxística é ótima para transmissão e é estimado que habitantes não imunizados de uma mesma residência onde haja um caso confirmado têm entre 50 e 100% de possibilidade de contraí-la e em casos de um mesmo colégio esta possibilidade cai para 50%. Crianças eliminam mais microrganismos levando, portanto a uma maior disseminação da doença, enquanto adolescentes e adultos, mesmo em forma branda, também são agentes de propagação. Adultos que foram vacinados apresentam um declínio da imunidade ficando, assim, susceptíveis a novas infecções tornando-se fontes de infecção para crianças que o cercam. Neonatos além de não possuírem anticorpos placentários ainda não estão com a imunização ativa completa ficando, assim, expostos à infecção por *Bordetella pertussis*. Tanto a vacinação quanto a infecção geram imunidade por tempo limitado e esta queda na imunidade por ser gradual explica os diferentes graus de severidade dos sintomas apresentados pelos pacientes (Cherry, 1986; Walker, 1988; König *et al.*, 2002).

1.7 Relação Parasita-Hospedeiro

A persistência mundial de *B. pertussis*, apesar de programas de vacinação intensivos em vários países evidencia sua condição de parasita humano. Apesar dos sintomas persistirem por meses, o microrganismo é eliminado em poucas semanas e carreadores crônicos são raros. Epidemias necessitam de novos indivíduos susceptíveis por nascimento ou perda de imunidade vacinal dentro da população - visto o agente etiológico da coqueluche não sobreviver mais do que poucas horas fora do trato respiratório por não possuir cápsula ou forma esporulada - além de não possuir nenhum animal como reservatório ou utilizar insetos como vetores (Wardlaw & Parton, 1988).

A infecção por pertussis afeta as defesas do hospedeiro facilitando a ocorrência de infecções secundárias que são as maiores causas de mortalidade em coqueluche e com isto podemos traçar paralelos ao que ocorre em crianças vacinadas com a vacina pertussis celular visto que esta também promove queda de imunidade. Camundongos pós-vacinados também demonstram uma diminuição em sua imunidade contra infecções bacterianas (Manclark & Cowell, 1984).

Uma vez introduzida no trato respiratório, a pertussis interage com as células ciliadas principalmente através das adesinas – filamentos de hemaglutinina, pertactina, fimbrias e talvez toxina pertussis. No desenho de uma vacina eficaz parece que a resposta imune a uma ou mais moléculas de aderência preveniriam uma potencial infecção ou permitiriam uma eliminação mais contundente das bactérias por parte dos pulmões do hospedeiro. Esta consideração e a capacidade de se obter quantidades consideráveis destes antígenos purificados são os objetivos principais a serem alcançados na busca de uma vacina pertussis acelular segura e eficaz (Hewlett, 1997). Na **FIGURA 5** estão representados os eventos decorrentes de uma infecção por *B. pertussis*.

As células do epitélio respiratório têm importante papel na resposta inflamatória que defenderá as vias aéreas tanto pela indução de quimiocinas quanto pela expressão de moléculas de adesão à superfície que são glicoproteínas de superfície celular envolvidas no trânsito de leucócitos e na acumulação de sítios de infecção, participando ainda, na ativação de leucócitos que irão promover o “clearance” bacteriano (Ishibashi & Nishikawa, 2002).

Contra a infecção por *Bordetella pertussis*, os anticorpos agem de diferentes maneiras: bloqueando a adesão às células do epitélio, neutralizando e depurando as toxinas, ativando o sistema complemento favorecendo a lise bacteriana bem como sua fagocitose (Mobberley-Schuman *et al.*, 2003).

Mills *et al.* em 1999 observaram que a infecção por *B. pertussis* confere imunidade mais potente e mais longa que a induzida por vacinas e que as vacinas celulares e acelulares ativam populações distintas de linfócitos T em crianças, sugerindo assim mecanismos de ativação e sítios de atividades diferentes para cada vacina.

Não está muito claro o porque dos sintomas durarem por meses enquanto a bactéria só é detectada por poucas semanas. Para avaliar o papel das

adesinas, fimbria e FHA, foram utilizadas cepas mutantes com ausência destes fatores de virulência e demonstrou-se que a cepa sem fimbria era depurada dos pulmões muito antes da cepa sem FHA que persistia de modo similar à cepa normal (Vandebriel *et al.*, 2003).

DIAGRAMAÇÃO DOS EVENTOS EM UMA INFECÇÃO POR *Bordetella pertussis*

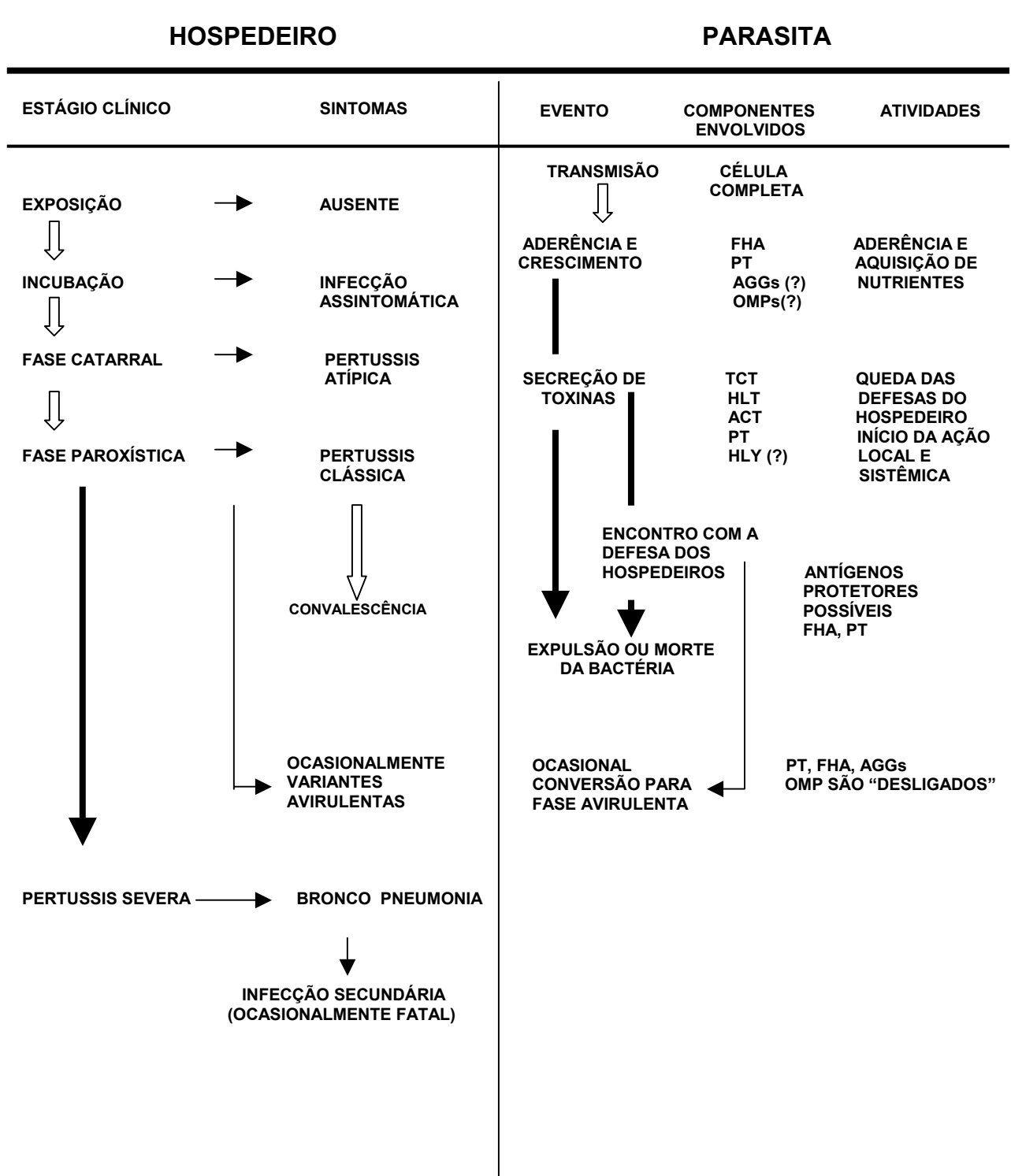


FIGURA 5. Relação parasita-hospedeiro em uma infecção por *B. pertussis* (Wardlaw & Parton, 1988)

1.8 Imunização Ativa

No Brasil, a vacina tríplice DTP, usada pelo Ministério da Saúde, é indicada para imunização ativa contra Difteria, Tétano e Coqueluche e possui como componentes os toxóides tetânico e diftérico e organismos mortos de *B. pertussis* adsorvidos em alumínio e tendo como preservativo o timerosal. O Programa Nacional de Imunizações Brasileiro (PNI), iniciado em 1983, utiliza, em média, 30 milhões de doses de Vacina Tríplice DTP anualmente oriundos de aproximadamente 330 lotes provenientes de laboratórios produtores nacionais e internacionais. O esquema de vacinação vigente no país indica a utilização de 4 doses de vacina Tríplice DTP: aos 2 meses, aos 4 meses e aos 6 meses de idade com reforço aplicado aos 18 meses de vida (FUNASA, 2003).

Segundo o Ministério da Saúde brasileiro a vacina tríplice acelular é indicada para crianças de até 6 anos completos, que após o recebimento de qualquer uma das doses da vacina tríplice bacteriana de células inteiras apresentem os seguintes eventos adversos:

- (a) Convulsões nas primeiras 72 horas
- (b) Episódio hipotônico hiporresponsivo nas primeiras 48 horas

Podemos dividir a história do desenvolvimento da vacina antipertussis em três fases. A primeira, de 1920 até a II Guerra Mundial, caracteristicamente empírica, com grande número de preparações experimentadas - na base de tentativa e erro, usando-se muitas vezes produtos sem nenhuma padronização. Na segunda fase, que tem início nos primeiros anos da década de 1940, houve progressiva introdução de padrões de qualidade e de potência para vacina antipertussis celular (preparada com bactérias inativadas), que passou a ser amplamente utilizada. A terceira fase começa na década de 1980, com o emprego de vacinas acelulares, constituídas por diferentes componentes imunogênicos da *B. pertussis* (Amato & Baldy *et al.*, 1991).

Em 1932, Kendrick preparou a vacina que até hoje é amplamente utilizada, constituída por cepas de *B. pertussis* na fase 1 de cultivo, inativadas pelo formol (Horton *et al.*, 1989).

Depois da II Guerra Mundial, foi desenvolvido o teste de proteção do camundongo, o único até agora conhecido que se relaciona com a imunidade obtida em seres humanos. Esse teste manteve-se como padrão nos últimos 40

anos, possibilitando definir o grau de potência das preparações vacinais. Em 1948, passou a ser exigida uma potência mínima para a vacina antipertussis nos EUA, seguida em 1953 pela criação de uma unidade-padrão internacional (UI). Em 1962, foi adotada uma preparação de referência internacional de opacidade, para padronizar o número de bacilos presentes na vacina (10 unidades internacionais (UI) de opacidade correspondem a 10 bilhões de bacilos por mL). Finalmente, em 1964, estabeleceu-se que cada dose da vacina antipertussis deveria conter 4 UI de potência por dose, conforme determinado pelo teste de proteção do camundongo (Cherry, 1986).

Até a década de 1970, a vacina pertussis celular era a única disponível em todo o mundo para imunização ativa contra coqueluche. Durante o inverno de 1974/75, dois lactentes morreram nas primeiras 24 horas após a administração da vacina tríplice no Japão. Em consequência a este acidente a vacinação foi suspensa pelo Ministério da Saúde japonês, sendo reintroduzida dois meses após apenas para crianças acima de dois anos de idade. Devido à falta de confiança da população houve queda na taxa de cobertura vacinal acarretando no reaparecimento de surtos da doença na segunda metade da década de 1970. Foram, então, empreendidos esforços no sentido do desenvolvimento de uma vacina antipertussis menos tóxica culminando com a vacina de antígenos purificados, chamada de vacina acelular que foi introduzida para uso rotineiro em 1981, no Japão, para vacinação de reforço em crianças acima de dois anos de idade. Atualmente, temos no Japão seis laboratórios produzindo vacina pertussis acelular - com pequenas diferenças em suas composições - divididas em dois tipos básicos podendo ser intercambiáveis e utilizadas indistintamente:

B- Biken: com partes iguais de filamentos de hemaglutinina e toxina pertussis.

T-Takeda: com maior proporção de filamentos de hemaglutinina que toxina pertussis e com pequenas quantidades de pertactina e fimbrias (Jadhav & Gairola, 1999; Watanabe *et al.*, 2001a e b).

Esforços adicionais têm sido realizados no sentido de se estabelecer a composição ideal das vacinas acelulares, assim como a fração de toxina presente, a potencialização por vários tipos de adjuvantes e a detoxificação das vacinas com diversas substâncias, tendo suscitado, nos últimos anos, grande número de publicações na literatura; essas contribuições têm desencadeado importantes mudanças na imunização ativa contra a coqueluche (Miller *et al.*, 1991 e Corbel, *et al.*, 1999a).

Corbel em 1999 destaca, ainda, que a demonstração de consistência na produção lote a lote e a comparação destes frente a lotes utilizados em estudos clínicos na época do licenciamento, seria de grande valia na utilização de vacinas seguras e eficazes.

A imunidade conferida pela doença é mais duradoura que a dada pela vacina e a imunidade induzida pela vacinação é de relativa curta duração (2 a 5 anos), entretanto, esta pode ser prolongada por “*boosters*” naturais em populações onde a *B. pertussis* é prevalente seja na forma de portadores assintomáticos ou formas atípicas da doença em pessoas parcialmente vacinadas (Guiso, 2001).

Reações locais pós-vacinais são comuns como inchaço, vermelhidão e dor assim como febre até 38.5 °C chegando até a 50% do número de vacinados. Reações sistêmicas mais severas como convulsões e episódios hipotônico hiporresponsivo ocorrem na proporção de 1 caso a cada 1750 vacinados. Encefalopatias agudas ocorrem com ainda maior raridade na ordem de 0 a 10 casos a cada um milhão de doses aplicadas em menores (CDC, 2003).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de novas vacinas, estudos clínicos não foram capazes de providenciar informações relevantes sobre o mecanismo de proteção contra coqueluche. Métodos clássicos baseados na mensuração de anticorpos em resposta a antígenos individuais falharam em correlacionar com proteção efetiva. Um modelo animal confiável iria facilitar a elucidação do mecanismo de proteção contra pertussis e ajudaria o controle e a regulamentação no desenvolvimento de futuras vacinas. Mills *et al.* em 1993 demonstram que a taxa de eliminação de pertussis pelos pulmões (*clearance*) possui alta relação com a eficácia da vacina em crianças.

Miller em 1999 destaca que estudos clínicos realizados na etapa de pré-licenciamento de vacinas acelulares demonstram grande variação quanto a reatogenicidade e que o ideal seria uma vacina acelular com o menor número possível de antígenos que garantisse uma ótima proteção. No momento parece que a opção mais segura seja a vacina de três componentes (PT, FHA e PRN) com os resultados mais próximos da vacina de célula completa muito embora ainda sejam necessários estudos clínicos e de vigilância ativa sobre sua segurança e de duração de sua imunidade conferida. Pelos diferentes métodos torna-se muito difícil comparar a eficácia de vacinas por estudos clínicos distintos e realizados em momentos diferentes, sendo necessário estabelecer

um protocolo único sobre este assunto e que permita uniformizar as informações geradas nestes estudos (Mastrantonio *et al.*, 1999; Miller, 1999).

Tornou-se clara a preferência das autoridades da área de saúde no uso de vacinas combinadas que apesar de serem de custo maior, geram maior dificuldade de suprimento e com isso limitam a flexibilidade dos programas de imunizações, e têm como fatores altamente positivos a diminuição do número de injeções, uma menor exposição a adjuvantes e preservativos e a possibilidade de introdução de novos antígenos. No caso de vacinas combinadas, como a vacina tríplex DTP, surge a preocupação de se testar cada componente em separado e aferir o grau de interferência entre estes diversos componentes (Jadhav & Gairola, 1999; Milstien *et al.*, 2003).

Apesar das dificuldades de se comparar diversos estudos clínicos, em todos estes estudos as vacinas celulares e acelulares demonstraram eficácia maior que as vacinas duplas uso infantil – DT, utilizadas a título de placebo. Nesta revisão de diversos estudos clínicos promovida por Jefferson *et al.* em 2003, a vacina pertussis celular está ligada a uma maior incidência de reações adversas locais tais como inchaço, vermelhidão e também de reações sistêmicas como por exemplo a febre acima dos 38,5 °C. Nestes estudos não ficou demonstrada correlação entre reações mais severas (episódios hipotônico-hiporresponsivo, convulsões febris ou afebris) e o uso de vacina pertussis celular ou acelular, mas de um modo geral a vacina acelular possui eficácia equivalente a da vacina celular e um grau de tolerância mais elevado que esta restando somente a questão financeira para sua aplicação já que a vacina acelular tem um custo, em média, de dez vezes que o custo da celular.

1.9 Situação Atual

Tem sido verificado que o processo de infecção respiratória por *B. pertussis* em camundongos tem muitas características em comum com o processo que ocorre em crianças tais como colonização do epitélio respiratório causando alterações locais e induzindo efeitos sistêmicos como leucocitose, hiperinsulinemia e sensibilização à histamina (Guiso *et al.*, 1999a).

Além disso, a eliminação de bactérias dos pulmões de camundongos imunizados com vacinas celulares ou acelulares tem sido correlacionada com a

eficácia da vacina em crianças (Mills *et al.*, 1998; Van den berg, 1999; Watanabe *et al.*, 2002a).

O teste de Kendrick (Challenge test ou desafio intracerebral), preconizado atualmente pelos órgãos normativos tais como OMS e FDA (Food and Drugs Administration) somente para vacina pertussis celular, é caracterizado pela inoculação (desafio) intracerebral de 30 µL de uma suspensão contendo bactérias viáveis (aproximadamente $3,3 \times 10^6$ bactérias/mL) que vão se replicar no tecido epitelial encontrado na base do cérebro de camundongos previamente imunizados. A cepa de *B. pertussis* utilizada neste ensaio é ATCC 18323, preconizada pela OMS em seus requerimentos mínimos (Kendrick *et al.*, 1947 e WHO, 1990). Na **FIGURA 6** temos um esquema simplificado de produção e controle da vacina tríplice bacteriana (DTP).

É neste crescimento microbiano que está baseado o ensaio visto que 14 dias após o desafio intracerebral realizar-se-á uma contagem dos animais sobreviventes com posterior utilização de programa estatístico (Probitos, WHO, 1997). Sempre frente a uma vacina de referência, o programa estatístico nos fornece a potência da vacina em Unidades Internacionais por mililitro (Requisito mínimo é de 8,0 UI/mL) (OMS, 1990).

A proposta de um modelo respiratório vem ao encontro de uma tendência mundial visando reduzir o uso de animais em experimentos laboratoriais, além deste modelo seguir a etiopatogenia da coqueluche em humanos já que ele mede a capacidade da vacina de minimizar a colonização ou posteriormente livrar o trato respiratório dos hospedeiros da infecção por *B. pertussis*. A OMS já publicou documentos propondo o uso de ensaios alternativos para o controle de potência do componente pertussis de vacina tríplice DTP (WHO, 1998).

Estudos recentes indicam que a vacina pertussis celular induz a níveis menores de anticorpos contra toxina pertussis e filamentos de hemaglutinina do que a vacina acelular, porém quanto a capacidade de promover a limpeza dos pulmões, eliminando as bactérias (“clearance”) a situação se inverte com clara vantagem para a vacina de célula completa com ação marcadamente mais rápida e eficaz (Xing *et al.*, 1999; Canthaboo *et al.*, 2000b).

Ainda não foi possível demonstrar correlação entre o nível de anticorpos contra os componentes da vacina contra coqueluche e a proteção eficaz conferida pela vacina desde que seus mecanismos de imunidade não são completamente conhecidos (Guiso *et al.*, 1999a; Mills *et al.*, 1999).

Tendo em vista a dificuldade ética e prática de se desenvolver estudos clínicos sobre a eficácia da vacina contra coqueluche, a inoculação intranasal surge como um fator essencial para desenvolvimento de futuras vacinas. A falta de correlação entre a sorologia pós-vacinal e a real proteção contra a infecção nos leva a implementar a idéia do modelo respiratório e seus efeitos no organismo incluindo a eliminação de bactérias dos pulmões como uma alternativa viável na busca de vacinas eficazes e seguras (Mills *et al.*, 1993 e 1998).

Entre os componentes comumente utilizados na composição de vacinas acelulares somente a toxina pertussis possui toxicidade intrínseca na dosagem utilizada na formulação. Os outros componentes (FHA, PRN, FIM e etc) não são fisiologicamente inertes, mas não demonstram efeitos tóxicos em doses substancialmente mais altas que as utilizadas na vacina pertussis acelular. A toxina pertussis é muito tóxica necessitando passar por um processo de destoxificação que pode ser químico ou genético. Por sua alta toxicidade, se tornam necessários ensaios que garantam a sua destoxificação e outros que minimizem a possibilidade de ocorrer uma reversão desta toxicidade (Corbel *et al.*, 1999a).

Estudos clínicos realizados na Itália e na Suécia demonstraram clara correlação entre a eficácia da vacina e o “clearance” pulmonar e onde vacinas com taxas baixas de eficácia (36/48%) promoveram um fraco “clearance” sendo possível detectar bactérias após algumas semanas. Estes estudos permitiram estabelecer algumas diferenças entre vacina pertussis celular e acelular onde a vacina acelular promoveu forte “clearance” em três dias, porém se mostrou incapaz de eliminar totalmente as bactérias ao contrário da vacina celular que de modo geral demora mais a promover o “clearance” porém alcança a eliminação das bactérias em sua totalidade (Mills *et al.*, 1998).

Neste estudo, os autores afirmam que as falhas descobertas na correlação entre níveis de anticorpos e proteção efetiva falharam porque focaram exclusivamente imunidade humoral quanto aos anticorpos monoespecíficos. Aqui eles demonstram que a *B. pertussis* desencadeia múltipla proteção celular e humoral contra os vários antígenos da bactéria. Os anticorpos são importantes, limitando a infecção e conseqüentemente a doença, prevenindo a adesão inicial às células epiteliais através da neutralização de toxinas bem como na remoção bacteriana pela opsonização de macrófagos. Os mecanismos que previnem a replicação e a disseminação bacteriana

culminando com a eliminação da mesma por parte do organismo hospedeiro, refletem tanto intra quanto extracelular nas defesas requerendo coordenadas funções da imunidade humoral e celular no sentido de obter máxima proteção.

(PORTARIA MS 175 DE 11 DE NOVEMBRO DE 1996)

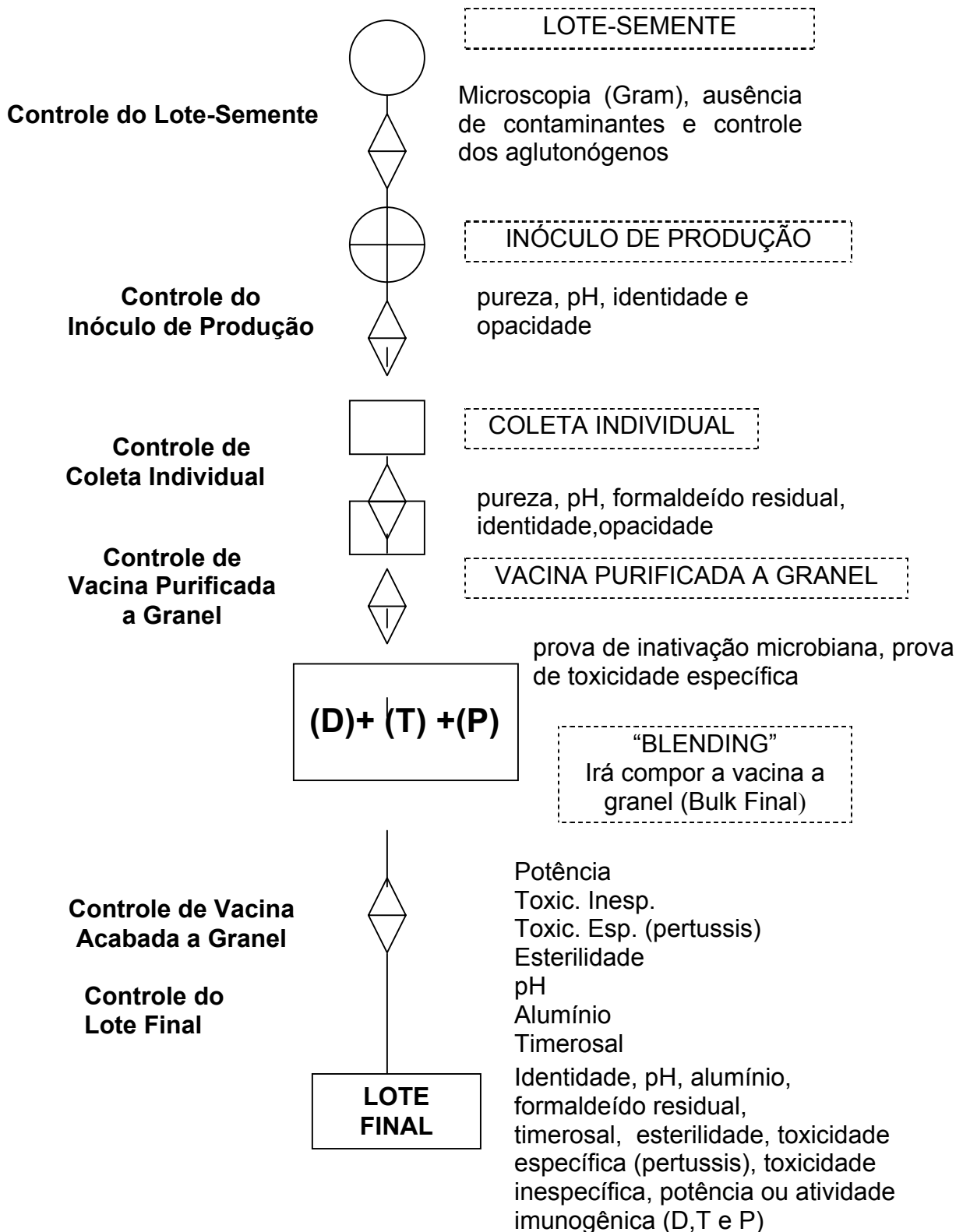


FIGURA 6. Fluxograma simplificado de produção de vacina pertussis

1.10 Relevância Do Estudo

O aumento do número de casos verificado nos últimos vinte anos, o alto índice de reações adversas que em alguns países já levou a suspensão da vacinação, a baixa correlação entre os níveis séricos de anticorpos e a imunidade efetiva e a busca por um modelo experimental que se aproxime do modo como a infecção realmente ocorre em humanos têm levado a vários e relevantes estudos quanto ao modelo respiratório em animais de laboratório. Estudos revelam que macacos *Rhesus* jovens apresentam, quando infectados experimentalmente por via respiratória, vários sintomas semelhantes aos humanos como paroxismo, linfocitose, “*whoop*” tosse e capacidade de infectar outros macacos. Entre homens e camundongos as semelhanças pós-infecção mais marcantes são a presença de hipoglicemia, leucocitose, sensibilização a histamina, a hiperinsulinemia, predisponência quanto à idade e imunidade quanto à re-infecção (Sato & Sato, 1988 e Xing *et al.*, 1999).

Standfast em 1958 descreveu que por utilizarem antígenos distintos em seus processos de colonização os modelos respiratórios e intracerebral não devem ser comparados um com outro e sim buscar com base em curvas da relação dose-resposta à acuidade de cada modelo em determinar a potência das vacinas testadas.

Segundo Watanabe *et al.* (2002a) uma outra diferença entre o modelo respiratório e o desafio intracerebral seria o principal componente envolvido. Enquanto no desafio intracerebral a toxina pertussis desempenha papel fundamental, no modelo respiratório os filamentos de hemaglutinina são os principais antígenos envolvidos.

O modelo respiratório tem sido utilizado em vários estudos com vacinas acelulares demonstrando que vacinas acelulares de 3 e 5 componentes são mais eficazes que as de apenas dois componentes. Ainda pelo modelo respiratório foi possível comparar que a adsorção influi drasticamente na eficácia da vacina, já que vacinas acelulares adsorvidas pelo hidróxido de alumínio promoveram um clearance pulmonar mais concreto que as adsorvidas pelo fosfato de alumínio. Foi verificado também que por mecanismos ainda não totalmente elucidados a pertactina mostra rápida e progressiva “desabsorção” quando agregada ao fosfato de alumínio (Denoël *et al.*, 2002).

Modelos animais para doenças infecciosas em humanos têm realizado significantes contribuições na compreensão dos mecanismos imunológicos, na resolução da infecção ou na progressão da doença, além de providenciar uma real possibilidade de definir o mecanismo de proteção imune contra coqueluche. Embora o modelo intracerebral esteja sendo usado para acessar a potência de vacinas celulares, este teste falhou na detecção da eficácia das vacinas acelulares no homem. Em outro sentido a infecção respiratória, seja por aerossol seja por instilação nasal, em camundongos conta com vários fatores comuns às características presentes na infecção em crianças e por isto vem sendo utilizada em vários laboratórios na intenção de desvendar os mecanismos de imunidade contra *B. pertussis* (Mills *et al.*, 1998).

O maior problema para o controle de qualidade é o teste de potencia visto que nas vacinas acelulares os componentes variam tanto em quantidade quanto em qualidade. O teste de proteção em camundongos -desafio intracerebral-mostrou-se incapaz de estabelecer o nível de eficácia de vacinas acelulares que demonstraram eficácia em estudos de campo e não é preconizado pela Organização Mundial de Saúde ou qualquer outro órgão normativo para o controle de vacinas acelulares. Ainda segundo André *et al.*, 2000, o teste ideal deveria ser simples e acurado ao demonstrar a eficácia em humanos e que os testes disponíveis hoje são mais capazes de demonstrar que os lotes não diferem significativamente dos que foram efetivos clinicamente. Devido às diversas formulações, os critérios de validação deveriam ser estabelecidos em conjunto pelo controle de qualidade nacional e laboratório produtor devido a ausência de referências mundiais.

Por ser o desafio intracerebral um procedimento severo, com significativa variação inter e intralaboratorial e não reproduzir a doença em humanos, o modelo respiratório, seja por aerossol ou instilação nasal torna-se viável por possuir uma inoculação mais consistente, menos agressiva, permitindo o uso de um menor número de animais além de assemelhar-se a infecção no homem tanto na via de infecção, quanto nos efeitos sistêmicos (hipoglicemia e leucocitose) e na prevalência por idade (Canthaboo *et al.*, 2000b).

Ainda sobre a prevalência por idade, Roduit *et al.* (2002) atesta que através da verificação do "clearance" pulmonar que camundongos de 7 dias de idade apresentam patamares mais elevados de colônias viáveis que camundongos de três semanas de idade. Roduit *et al.* verificou, ainda que a vacinação com

vacina acelular em camundongos neo-natos é bem tolerada e não afeta o ganho de peso.

Segundo Granoff (1999), a proteção proporcionada pela vacina pertussis não é necessariamente refletida pelos níveis de anticorpos complicando assim a busca de uma correlação sorológica pelo teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Esta correlação mesmo se alcançada deverá ser considerada produto a produto devido à alta diversidade e diferentes concentrações dos componentes envolvidos na produção das vacinas pertussis acelulares.

Mahon *et al.* (2000) demonstrou que além de apresentar correlação com estudos clínicos no campo o “clearance” pulmonar demonstra, ainda, que mesmo após a queda dos níveis de anticorpos a níveis circulantes indetectáveis, os animais manteriam alguma imunidade sugerindo que crianças após imunização apresentariam prováveis graus de proteção. Neste mesmo estudo foi verificado que o nível sérico imunoglobulinas contra toxina pertussis, filamentos de hemaglutinina e pertactina declinam rapidamente após três meses tornando-se indetectáveis após nove meses e que mesmo assim animais desafiados por via respiratória 44 semanas após imunização ainda apresentam proteção demonstrando uma menor contagem de bactérias viáveis que o grupo controle.

Em estudos recentes foi observado que 2 horas após a infecção a maioria das bactérias encontram-se livres no espaço alveolar, com pequena porção ligada ao epitélio alveolar e fagocitada por polimorfonucleares (PMN). Após três dias a maior parte está associada e fagocitada pelos macrófagos e polimorfonucleares. Cepas de *B. pertussis* mutantes sem a expressão de fimbrias induzem a severas reações inflamatórias e facilitam a promoção do “clearance” por parte do hospedeiro (Vandebriel *et al.*, 2003).

Foi observado que ocorre um afluxo de PMN imediatamente após a infecção por *B. pertussis* seguido por um significativo aumento no número de macrófagos. No terceiro dia, quando o número de bactérias pouco difere do número determinado nas duas primeiras horas após desafio intranasal, o número de PMN atinge seu nível mais alto e o número de macrófagos está em franca elevação. Após o terceiro dia o número de bactérias decai constantemente concomitantemente ao decréscimo do número de PMN e a elevação de macrófagos. Isto sugere que os macrófagos desempenham papel

destacado no “clearance” pulmonar. Cepas mutantes com ausência de fímbrias e FHA respectivamente demonstraram menor capacidade de colonizar a traquéia, mas mantiveram praticamente a mesma condição de infectar os pulmões (Vandebriel *et al.*, 2003).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação de métodos alternativos para aferição da potência do componente pertussis de vacinas celulares e acelulares.

Neste sentido foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação do método de desafio intranasal;
- Avaliação do ensaio de ELISA;
- Aplicabilidade destes métodos para vacina pertussis acelular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos NIH, machos e fêmeas, com peso entre 12 e 16 gramas, originários do CECAL/FIOCRUZ. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com tampa de aço inoxidável (30 cm x 19 cm x 12 cm) e cama de maravalha de pinus e aclimatados por 24 horas antes do início do experimento.

Todos os animais receberam água e ração comercial para ratos (Nuvilab-Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos no SAL/INCQS com os seguintes controles ambientais: temperatura (20 +/- 2 °C), umidade relativa do ar em aproximadamente 70% e ciclo claro-escuro constante de 7 às 19 horas. As trocas de cama e água foram realizadas três vezes por semana e a ração substituída semanalmente.

Todos os procedimentos envolvendo animais de laboratório seguiram o Procedimento Operacional Padronizado “Boas Práticas de Experimentação Animal” nº 65.3340.022- INCQS.

3.2 Microrganismo E Cultivo

Neste estudo foi utilizada uma cepa de *Bordetella pertussis* ATCC 18323, proveniente do Laboratório de Materiais de Referências/INCQS sob o número de lote 1002041.

O meio utilizado para cultivo e posterior plaqueamento para contagem das unidades formadoras de colônias (CFU) foi Bordet-Gengou (DIFCO) acrescido de 20% de sangue estéril, desfibrinado de ovinos proveniente do CECAL/FIOCRUZ.

Na tentativa de reduzir ou eliminar contaminação que impossibilite a contagem de unidades formadoras de colônias da suspensão proveniente do homogeneizado pulmonar dos camundongos foi acrescido ao meio o agente antimicrobiano Cycloheximide (SIGMA) que atua principalmente sobre fungos inibindo a síntese protéica. Foi utilizada uma concentração de 400 mg por litro de meio Bordet-Gengou.

3.3 Vacinas

3.3.1 Vacina De Referência

O lote de vacina de referência utilizado neste estudo foi o Lote 10 proveniente do Federal and Drugs Administration (FDA/USA) que teve sua potência estabelecida em 33,24 UI/ampola através de um estudo colaborativo organizado pelo SIREVA (Sistema Regional de Vacinas) com a participação de Brasil, Venezuela, Cuba, Chile e México.

3.3.2 Vacinas Celulares

Foram utilizados lotes de vacina Tríplice Bacteriana – DTP provenientes dos três produtores nacionais (Instituto Butantan, Instituto de Tecnologia do Paraná-TECPAR e Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Biomanguinhos/FIOCRUZ). Aqui cabe uma consideração relevante que é o fato de o Instituto Butantan ser o único a produzir Vacina Pertussis produto acabado a granel que posteriormente à liberação pelo controle de qualidade interno é encaminhado aos demais institutos para formulação final junto aos demais componentes e envase sob forma de produto final.

Todos os lotes utilizados neste estudo foram aprovados pelo controle da qualidade do produtor e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ, sendo então, utilizados pelo Programa Nacional de Imunização - PNI.

No caso de vacina tetravalente, combinada a *Haemophilus influenza B* (HIB), onde a vacina DTP serve como diluente para o líófilo HIB, este líófilo foi descartado, sendo utilizada nos testes somente a vacina DTP.

3.3.3 Vacinas Acelulares

Neste estudo foram utilizados dois lotes de vacinas acelulares de composição e produtores diferentes que foram codificados sob as siglas DTP_{A3} e DTP_{A4} (**TABELA 2**).

3.4 Comissão De Ética No Uso De Animais De Laboratório - CEUA/ FIOCRUZ.

A solicitação de licença de projeto foi obtida junto a CEUA/FIOCRUZ sob o número de protocolo P0133-02.

TABELA 2. Composição (por dose de 0,5 mL) das vacinas acelulares utilizadas neste estudo.

| Vacina acelular DTP _A 3: | | Vacina acelular DTP _A 4: | |
|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| Toxina Pertussis | 25 µg | Toxina Pertussis | 10 µg |
| FHA | 25 µg | FHA | 5 µg |
| Pertactina | 8 µg | Pertactina | 3 µg |
| Toxóide Tetânico | 40 UI | Fimbrias (AGG 2 e 3) | 5 µg |
| Toxóide Diftérico | 30 UI | Toxóide Tetânico | 40 UI |
| | | Toxóide Diftérico | 30 UI |

3.5 Desafio Intracerebral Ou Kendrick Test (Portaria MS 175/1996)

A Atividade Imunogênica da Vacina Pertussis é determinada pela avaliação comparativa frente a uma Vacina Pertussis de Referência.

3.5.1 Imunização

Camundongos NIH com peso entre 12 e 16 gramas, provenientes do CECAL/FIOCRUZ foram vacinados, via intraperitoneal (6 grupos de 20 camundongos) e 4 grupos de 10 camundongos NIH foram utilizados para controle da Dose Desafio.

Foram feitas três diluições seriadas da amostra a ser testada e da Vacina Pertussis de Referência, com fator de diluição 5, em solução fisiológica tamponada à concentração de uma Dose Individual Humana (0,5 mL), de modo que as diluições assegurassem uma proteção de 70 a 80%, 40 a 50% e 10 a 20%, respectivamente.

Os animais do grupo controle foram mantidos sem imunização.

3.5.2 Preparação Da Suspensão De *Bordetella pertussis*

A cultura de *Bordetella pertussis* foi iniciada quatro dias antes da data do desafio.

Foi aberta e ressuspendida com o diluente salina tamponada uma ampola de *Bordetella pertussis* ATCC 18323. Placas com Agar Bordet - Gengou foram semeadas e incubadas a 35 °C por 48 horas. Após este período foi feito o primeiro repique do crescimento obtido, em placas com Ágar Bordet - Gengou e incubado a 35 °C por 24 horas. Após as 24 horas, foi feito um segundo repique do crescimento obtido em placas com Ágar Bordet-Gengou e incubado a 35 °C por 18 horas. Foi preparada uma suspensão de *Bordetella pertussis* com o cultivo obtido nas placas incubadas a 35 °C por 18 horas contendo 10 UOp/mL por comparação visual com 5º Padrão Internacional de Opacidade. Em todas as etapas foi realizado o Controle de Pureza.

3.5.3 Esquema De Preparação Da Dose De Desafio

| N ^o tubo | Suspensão bacteriana (mL) | Diluyente (mL) | Diluição |
|---------------------|--------------------------------|----------------|--------------|
| 1 | 1,0 mL suspensão com 10 UOp/mL | 2,0 | 1/3 |
| 2 | 0,5 mL do tubo 1 | 4,5 | 1/30 |
| 3 | 0,5 mL do tubo 2 | 4,5 | 1/300 |
| 4 | 2,0 mL do tubo 3 | 18,0 | 1/3.000 (DF) |

DF = Dose de Desafio

Controle Dose de Desafio

| N ^o tubo | Suspensão bacteriana (mL) | Diluyente (mL) | Diluição |
|---------------------|---------------------------|----------------|----------|
| 5 | 0,5 mL do tubo 4 | 4,5 | 1/10 |
| 6 | 1,0 mL do tubo 5 | 4,0 | 1/50 |
| 7 | 1,0 mL do tubo 6 | 4,0 | 1/250 |
| 8 | 1,0 mL do tubo 7 | 4,0 | 1/1.250 |

3.5.4 Desafio

O intervalo de tempo entre a coleta do cultivo, a preparação da Dose de Desafio e a inoculação do último camundongo da prova, não ultrapassou a 2 horas e 30 minutos. A Dose de Desafio foi mantida à temperatura de 4 a 8 °C. Os camundongos NIH vacinados foram desafiados via intracerebral, 14 dias após a vacinação, com 0,03 mL da Dose de Desafio de *Bordetella pertussis*.

Como controle da DL50 da Dose de Desafio de *Bordetella pertussis*, foram inoculados 3 grupos com 10 camundongos NIH, via intracerebral, com 0,03 mL das diluições 1/50, 1/250 e 1/1.250. Os animais foram observados diariamente por 14 dias. Os camundongos NIH que morreram até 72 horas após o desafio, foram excluídos da prova e os animais que apresentaram paralisia no 14º dia foram considerados mortos. Toda a sintomatologia e morte dos animais foram registradas em protocolo.

3.5.4.1 Controle Da Viabilidade Da Dose Desafio

Três placas de Petri com Ágar Bordet-Gengou foram semeadas com 0,1 mL/placa da diluição 1/1250 e incubadas a 35 °C por 96 horas, para controle do número de Unidades Formadoras de Colônias.

O somatório das colônias das três placas, foi dividido por 10, para se ter o número de colônias correspondente a 0,03 mL.

3.5.5 Cálculo Da Dose Efetiva 50% (DE50)

O valor da DE50 da amostra testada foi determinada mediante um método de análise estatística que compreende a transformação dos dados obtidos em regressão linear. Foi utilizado o programa PROBITOS (RIVM, 1997) fornecido pela WHO.

3.5.6 Cálculo Da Atividade Imunogênica (Potência)

Atividade imunogênica (UI/mL) = $\frac{A}{B} \times C$, onde:

A = DE50 Vacina Pertussis de Referência

B = DE50 Vacina a Testar

C = UI/mL da Vacina Pertussis de Referência

3.5.7 Validade Da Prova:

A prova é válida se:

A DE50 da vacina estiver compreendida entre a maior e a menor dose imunizante.

O Desvio Padrão da DE50 estiver entre 64% e 156%.

No controle da dose desafio a diluição 1/1.250 tiver no mínimo 10 e no máximo 50 Unidades Formadoras de Colônias em 0,03 mL.

A Dose de Desafio estiver entre 100 e 1000 DL50.

A DL50 contiver no máximo 300 Unidades Formadoras de Colônias.

As curvas de resposta às doses do produto a testar e da Vacina Pertussis de Referência, não diferirem significativamente quanto ao paralelismo e linearidade ($p=0,05$).

3.5.8 Atividade Da Vacina

A Vacina deve conter no mínimo 4 UI no máximo 18 UI/Dose Individual Humana.

Se o valor encontrado for inferior a 4 UI/Dose Individual Humana, poderá ser repetido o teste, e neste caso, só será considerado que o produto cumpre os requisitos de potência, se a média geométrica de duas, três ou quatro provas válidas for igual ou superior a 4 UI/Dose Individual Humana.

3.6 Desafio Intranasal (Segundo Guiso *et al.*, 1999a e b & Guiso, 2001)

Camundongos suíços albinos susceptíveis com peso entre 12 e 16 gramas, provenientes do CECAL/FIOCRUZ foram vacinados (12 animais por diluição), via intraperitoneal, com diluições da vacina a testar e da vacina padrão além de um grupo controle inoculado com solução fisiológica.

Duas semanas após a vacinação os animais são anestesiados pelo éter e desafiados através da instilação intranasal de 25 μ L de uma suspensão contendo 10^8 bactérias por mililitro (ATCC 18323) com o uso de uma pipeta automática. Caso o animal não tenha sido satisfatoriamente inoculado, este deverá receber marcação que o identifique posteriormente. Vale destacar que o preparo da suspensão bacteriana utilizada neste desafio é igual ao descrito anteriormente para o Desafio Intracerebral à exceção da concentração bacteriana ($3,3 \times 10^6$ /mL no Teste Intracerebral) e que neste modelo respiratório é indispensável o cultivo da *Bordetella* à fresco visto que o

congelamento da suspensão desafio inviabiliza a colonização do trato respiratório dos camundongos.

Após este desafio os animais foram sacrificados (deslocamento cervical) em períodos distintos (2 horas, 7 dias e 15 dias) e realizou-se a coleta do pulmão direito na tentativa de homogeneizar a coleta.

Os pulmões foram suspensos individualmente em tubos 13x100 mm em 1 mL de solução de casaminoácido. Após a coleta, ainda individualmente, cada pulmão é homogeneizado e são realizadas diluições seriadas até 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} (dependendo do tempo da coleta e da concentração de vacina recebida pelo animal) para posterior plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônias (CFU). Este procedimento foi realizado individualmente para cada camundongo através da inoculação em placas de Petri de 0,1 mL das respectivas diluições, todo este procedimento de coleta, homogeneização e plaqueamento não deve exceder o período de 90 minutos. Estas placas foram, então, incubadas a 36 °C por 96 horas quando foi possível fazer uma contagem do número de colônias de *Bordetella pertussis* viáveis. Todo este procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. A cada mudança de grupo de camundongos, o material (pinças e tesouras) deverá passar por um processo de higienização com o uso de álcool a 70%.

Obteve-se, então uma média do número de colônias por diluição de vacina utilizada que foi multiplicado pelo inverso da diluição do homogeneizado pulmonar. Calculou-se o Log10 para cada grupo de animais a cada intervalo de coleta (2 horas, 7 dias e 15 dias). Foi realizada, então a comparação através de gráficos entre os dados obtidos com os camundongos vacinados com a vacina teste, a vacina padrão e grupo controle na tentativa de discriminar a capacidade das vacinas em eliminar as bactérias do hospedeiro.

Exemplo: Para um pulmão homogeneizado de um camundongo, diluído a:

10^{-2} : 250 colônias

10^{-3} : 47 colônias

10^{-4} : 6 colônias

$$M = \frac{250 + 47 + 6}{0,01 + 0,001 + 0,0001} \times 10 = 3,03 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$$

Log10= 5,48

A curva é traçada usando Log₁₀ *versus* período de coleta.

Obs: A média de CFU por camundongo é multiplicada por 10 de modo a ajustar o volume inoculado por placa (0,1 mL).

3.6.1 Critérios De Validade Utilizados Nos Ensaios:

Nenhuma mortalidade deverá ser observada durante a prova.

O número de bactérias utilizado no desafio intranasal não deverá ser inferior a 10³ CFU/camundongo.

Todos os animais do grupo controle deverão estar infectados duas horas após o desafio.

A média dos Log₁₀ do número de bactérias presentes nos pulmões dos camundongos do grupo controle no período de 2 horas após o desafio deverá ser superior a 3,8.

A média dos Log₁₀ do número de bactérias presentes nos pulmões dos camundongos do grupo controle no período de 7 dias após o desafio deverá ser superior a 3.

3.7 ELISA (segundo Van den Berg, 2001; Ark *et al.*, 2000)

3.7.1 Materiais:

Suspensão de *B. pertussis* formalizada 1,0 UOp/mL

Placas de 96 poços de fundo chato

Placas de 96 poços de fundo redondo

Tampão carbonato pH 9,6

Meio de cultivo (199 completo)

Leite molico desnatado

PBS

Tampão tween 80

Conjugado antimouse IgG marcado à peroxidase (Lote: 010MP007Z /

Biomanguinhos)

Tampão acetato de sódio 0,11 M pH 5,5

3.7.2 Preparo Do Soros Controles

3.7.2.1 Positivo

Um grupo de 40 camundongos NIH de 14 a 18 gramas foram imunizados no dia zero com 0,5 mL via intraperitoneal com a Vacina de Referência – Lote 10/FDA – e receberam nova dose desta vacina no dia 14 à título de “booster”. Estes animais sofreram sangria total quatorze dias após a segunda imunização e os soros obtido foram acondicionados a – 20 °C.

3.7.2.2 Negativo

Um grupo de 40 camundongos NIH de 14 a 18 gramas foram imunizados no dia zero com 0,5 mL via intraperitoneal de uma Vacina Dupla DT infantil. Estes animais sofreram sangria total quatorze dias após a imunização e os soros obtidos foram acondicionados a – 20 °C. Foi utilizada uma vacina DT infantil por esta conter todos os elementos (Toxóides Tetânico e Diftérico, Hidróxido de alumínio, Timerosal etc) nas mesmas quantidades que uma vacina Tríplice DTP a exceção do componente pertussis conferindo assim a especificidade do método em só reagir frente a este componente pertussis presente nas amostras utilizadas.

Procedimento:

Revestir a placa de fundo chato com 100 µL da suspensão da *B. pertussis* formalizada contendo 1,0 UOp/mL em tampão carbonato pH 9,6.

Incubar a 37 °C e deixar overnight sem tampa para evaporar o tampão.

Bloquear todos os orifícios da placa com 200 µL de leite desnatado a 1% em PBS durante 60 minutos a 37 °C.

Lavar 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% tween 80)

Em outra placa de fundo redondo, diluir as amostras de soro de camundongos imunizados, utilizando solução diluente (PBS com 0,5% de leite desnatado e 0,05% de tween 80). Colocar 120 µL da solução diluente em todos os orifícios.

Na coluna 1, colocar 120 µL do soro a ser testado, o soro controle positivo e fazer uma diluição seriada (começando com 1:50).

Após as diluições, transferir 100 µL da placa de fundo redondo para os respectivos orifícios da placa de ELISA.

Incubar a placa de ELISA por 60 minutos a 37 °C.

Lavar 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% tween 80).

Colocar 100 µL do conjugado anti-mouse IgG diluído 1:2000 em tampão (PBS com 0,5% de leite desnatado e 0,05% de tween 80). Incubar a placa por 60 minutos a 37 °C.

Lavar 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% tween 80).

Colocar 100 µL do substrato (100mL de tampão acetato de sódio 0,11 M pH 5,5; 20 µL de H₂O₂ 35%; 1,67 de 6mg/mL de tetrametilbenzeno em etanol 96%) em todos os orifícios.

Incubar por 15 minutos ao abrigo da luz.

Bloquear a reação com 100 µL de H₂SO₄ a 2 M.

Fazer a leitura em leitor de ELISA na absorvância de 450 nm.

Os resultados de Densidade Óptica (DO) obtidos são submetidos ao programa estatístico de Linhas Paralelas (RIVM, 1997) fornecido pela WHO.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios De Desafio Intracerebral (DIC; Padrão-Ouro) Em Camundongos Imunizados Com Vacina Pertussis Celular (DTP).

Os resultados da avaliação da eficácia de diferentes lotes de DTP através de ensaios de DIC estão representados na **TABELA 3** e **FIGURA 7**. Foram observadas variações interlaboratoriais nos resultados obtidos com as diferentes preparações (lotes) de DTP analisadas. Variações interlaboratoriais foram predominantemente observadas nos lotes de vacina B, G, O, Q, R e V. Também foram observadas variações intralaboratoriais nos resultados obtidos com as diferentes preparações (lotes) de DTP, conforme exemplificado na **TABELA 4**. Variações intralaboratoriais ocorreram para todos os lotes avaliados tanto nos ensaios DIC-Teste quanto nos ensaios DIC-Produtor.

A capacidade de imunoproteção (≥ 8 UI/mL) foi observada em todos os lotes de DTP, variando entre 8,03 a 21,99 UI e 8,42 UI a 23,60 UI/mL nos ensaios DIC-Teste e DIC-Produtor respectivamente.

Conforme **TABELA 5** a análise estatística demonstrou semelhanças entre os dados obtidos nos ensaios realizados por nós (DIC-Teste) e pelo Laboratório Produtor da vacina DTP (DIC-Produtor).

(ANOVA, $p=0,84$)

TABELA 3. Potência de cada lote de DTP capaz de conferir proteção em camundongos submetidos ao teste de desafio intracerebral.

| Lotes DTP ¹ | Imunoproteção ² | |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | DIC–Teste | DIC– Produtor ³ |
| A | 14,18 | 15,80 |
| B | 13,35 | 8,42 |
| C | 11,60 | 9,60 |
| D | 11,52 | 10,14 |
| E | 11,39 | 16,40 |
| F | 12,71 | 12,68 |
| G | 21,99 | 11,72 |
| H | 17,28 | 20,60 |
| I | 16,08 | 15,20 |
| J | 21,58 | 20,60 |
| K | 17,77 | 11,20 |
| L | 13,93 | 21,20 |
| M | 15,51 | 23,60 |
| N | 8,66 | 13,02 |
| O | 8,83 | 14,20 |
| P | 9,35 | 12,40 |
| Q | 15,42 | 20,80 |
| R | 16,25 | 9,60 |
| S | 8,27 | 11,10 |
| T | 8,90 | 11,21 |
| U | 12,27 | 11,40 |
| V | 8,03 | 22,60 |
| W | 12,03 | 8,93 |
| X | 11,89 | 12,80 |
| Y | 13,07 | 12,16 |

DTP, vacina pertussis celular; DIC, desafio intracerebral em camundongos.

¹Ensaio DIC tanto teste quanto produtor realizados em 60 camundongos imunizados com cada lote de DTP.

²Eficácia de DTP expressos em Unidades Internacionais (UI) definidas a partir da Vacina de Referência – Lote 10/FDA (10 UI).

³Resultados fornecidos pelo Setor de Controle de Qualidade do Instituto Butantan, SP.

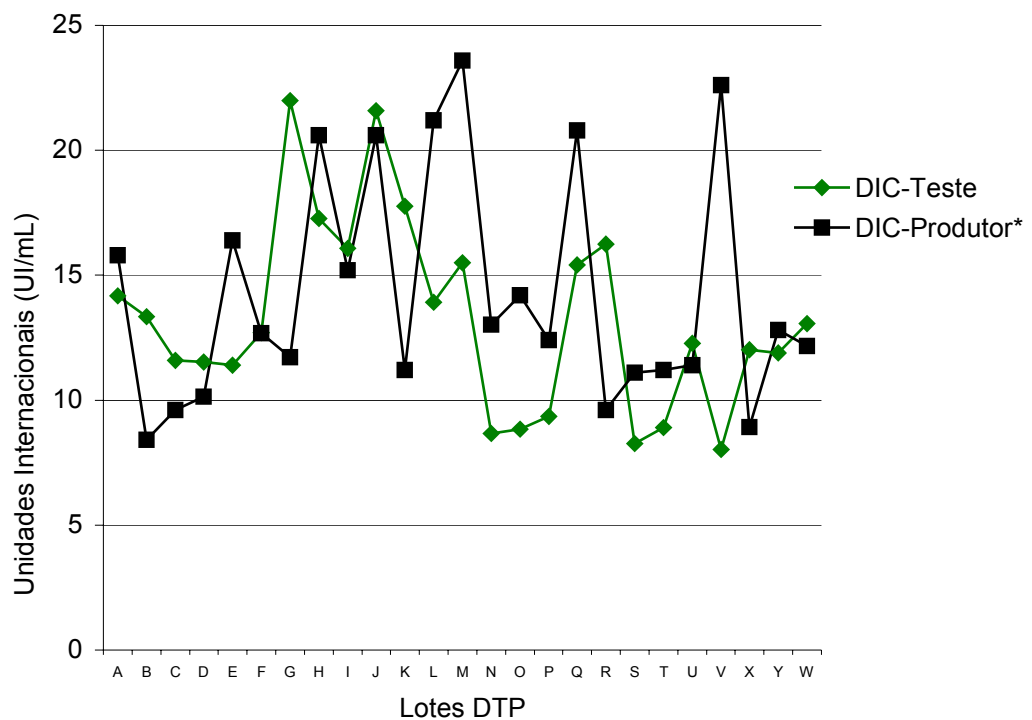


FIGURA 7. Gráfico representativo das variações interlaboratoriais dos resultados dos testes de desafio intracerebral (DIC). Cada ponto representa o valor das potências de cada lote de vacina pertussis celular DTP (UI/mL) capaz de conferir proteção aos camundongos submetidos aos testes DIC. Eficácia de DTP expressos em Unidades Internacionais (UI) definidas a partir da Vacina de Referência – Lote 10/FDA (10UI). Ensaios DIC realizados em grupos (A a W) de 60 camundongos cada, imunizados com lotes de DTP. (*) Resultados fornecidos pelo Setor de Controle de Qualidade do Instituto Butantan, SP.

TABELA 4. Potência¹ média (M), máxima (LS) e mínima (LI) de cada lote de DTP capaz de conferir proteção em camundongos submetidos aos ensaios DIC-Teste e DIC-Produtor².

| Lotes DTP ³ | DIC-Teste | | | DIC-Produtor | | |
|------------------------|-----------|--------|------|--------------|-------|------|
| | M | LS | LI | M | LS | LI |
| A | 14,18 | 33,08 | 6,18 | 15,80 | 78,17 | 4,73 |
| B | 13,35 | 71,34 | 2,75 | 8,42 | 32,73 | 2,32 |
| C | 11,60 | 32,94 | 4,03 | 9,60 | 28,63 | 3,45 |
| D | 11,52 | 118,94 | 1,30 | 10,14 | 43,60 | 1,50 |
| E | 11,39 | 125,10 | 1,07 | 16,40 | 92,02 | 4,99 |
| F | 12,71 | 144,01 | 1,55 | 12,68 | 56,84 | 4,04 |

DTP, vacina pertussis celular; DIC, desafio intracerebral em camundongos.

¹Eficácia de DTP expressos em Unidades Internacionais (UI/mL) definidas a partir da Vacina de Referência – Lote 10/FDA (10 UI).

²Resultados fornecidos pelo Setor de Controle de Qualidade do Instituto Butantan, SP.

³Ensaio DIC realizados em 60 camundongos imunizados com cada lote de DTP.

TABELA 5. Análise estatística pelo teste ANOVA¹ dos resultados dos ensaios DIC-Teste e DIC-Produtor em camundongos imunizados com DTP.

| DIC | Potência de DTP (UI/mL) | |
|-----------------------|-------------------------|------|
| | Média ± SD (n = 24) | p |
| Produtor ² | 14,29 ± 4,63 | 0,84 |
| Teste | 13,27 ± 3,82 | |

DTP, vacina pertussis celular; DIC, desafio intracerebral em camundongos; SD, desvio padrão.

¹ANOVA, p>0,05; calculado através do Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

²Resultados fornecidos pelo Setor de Controle de Qualidade do Instituto Butantan, SP.

4.2 Ensaios-Controle De Desafio Intranasal (DIN) Em Camundongos Não Imunizados

O número de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtido a partir dos pulmões de camundongos não imunizados, inoculados apenas com solução salina (camundongos-controle) estão apresentados na **TABELA 6** e **FIGURA 8**. O número de bactérias viáveis obtido dos pulmões dos diversos grupos de camundongos controle testados (C1 A C10) após a realização dos desafios intranasais foram considerados estatisticamente semelhantes entre si quando avaliados pelo teste ANCOVA, $p=0,1919$.

Um menor número de células viáveis no pulmão de camundongos controle (inoculados com solução salina) foi observado no décimo quinto dia após o DIN.

(ANOVA, $p=0,006868$)

Ensaios de desafio intranasal (DIN) em camundongos imunizados com vacina pertussis celular de referência – Lote 10/FDA.

O número de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtido a partir dos pulmões de camundongos imunizados com a vacina de referência LOTE 10/FDA (1,0 UI/dose) estão apresentados na **TABELA 7** e **FIGURA 9**.

Os números de bactérias viáveis obtidos dos pulmões dos camundongos nos dias 1, 7 e 15 após a realização dos desafios intranasais corresponderam a $4,03\text{Log}_{10}$ CFU > $2,95\text{Log}_{10}$ CFU > $0,12\text{Log}_{10}$ CFU, respectivamente, sendo considerados estatisticamente diferentes.

(ANOVA, $p=0,000000$)

Resultados estatisticamente semelhantes (ANCOVA, $p>0,05$) também foram demonstrados quando comparados os oito ensaios (R1 a R8) entre si demonstrando a repetibilidade do ensaio de DIN.

Conforme demonstrado nas **TABELAS 6** e **7**, a média da contagem de bactérias viáveis dos camundongos-controle ($4,48\text{Log}_{10}$ CFU) foi semelhante as dos camundongos imunizados com a vacina de referência ($4,03\text{Log}_{10}$ CFU) no dia 1 após o DIN. Diferenças ocorreram na contagem de viáveis realizadas 7 e 15 dias após o DIN. No sétimo dia, ocorreu uma redução no número de bactérias viáveis observados nos camundongos vacinados ($2,95\text{Log}_{10}$ CFU) em relação ao grupo de camundongos-controle ($4,46\text{Log}_{10}$ CFU). Quinze dias após o DIN, foi obtido um número de bactérias viáveis dos pulmões dos

camundongos vacinados ($0,12\text{Log}_{10}$ CFU) em relação ao grupo de camundongos-controle ($3,83\text{Log}_{10}$ CFU) - conforme demonstrado nas **TABELAS 6** e **7**. Os resultados demonstraram a capacidade do ensaio de DIN em atestar a eficácia da vacina pertussis celular de referência, que promove o “clearance” pulmonar em camundongos.

TABELA 6. Números de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtidas de pulmões de camundongos-controle¹ 1, 7 e 15 dias após a realização do desafio intranasal.

| Grupos ² de Camundongos-Controle | Número de Bactérias Log ₁₀ CFU | | |
|---|---|-----------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 7 | Dia 15 |
| C1 | 3,92 | 4,34 | 2,33 |
| C2 | 4,24 | 4,75 | 4,44 |
| C3 | 5,50 | 4,30 | 4,12 |
| C4 | 4,33 | 4,11 | 4,21 |
| C5 | 4,32 | 4,26 | 4,21 |
| C6 | 4,13 | 4,21 | 3,80 |
| C7 | 4,19 | 4,78 | 3,79 |
| C8 | 4,81 | 4,56 | 3,63 |
| C9 | 5,22 | 4,60 | 4,13 |
| C10 | 4,19 | 4,77 | 3,70 |
| C Médio | 4,48±0,51 | 4,46±0,23 | 3,83±0,59 |

¹Camundongos não imunizados e inoculados com salina.

²Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo). ANCOVA, p=0,1919.

ANOVA entre os grupos dos dias 1 x 7 x 15, p=0,006868; entre os dias 1 x 7 p=0,9246; entre os dias 7 x 15 p=0,0060.

Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

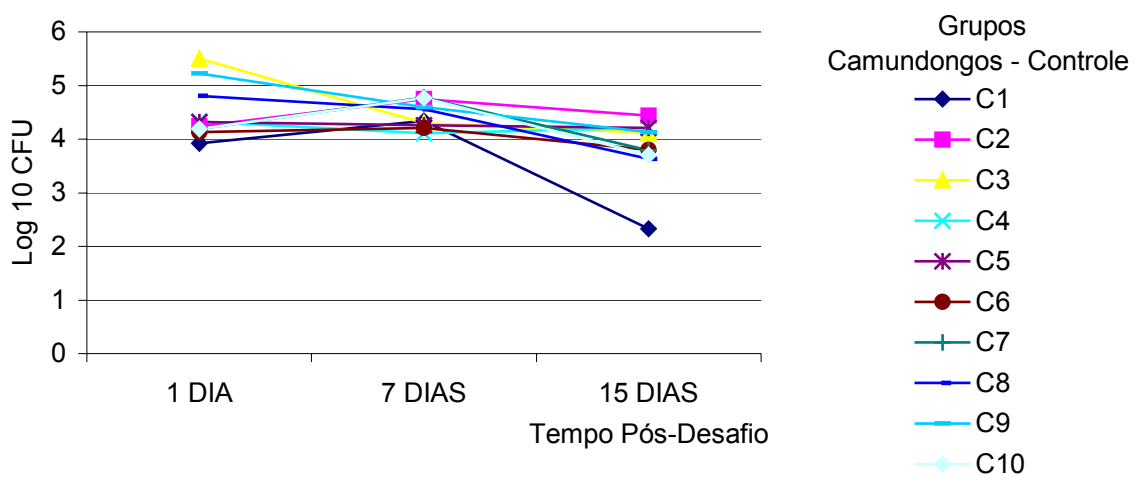


FIGURA 8. Gráfico representativo das variações nos números de bactérias viáveis (CFU) obtidas de pulmões de camundongos-controle (não imunizados e inoculados previamente com salina) 1, 7 e 15 dias após a realização do desafio intranasal. Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

TABELA 7. Números de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtidas de pulmões de camundongos imunizados com a vacina de referência - Lote 10/FDA, 1, 7 e 15 dias após a realização do desafio intranasal.

| Grupos ¹ Camundongos-Vacina referência | Número de Bactérias Log ₁₀ CFU | | |
|---|---|-----------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 7 | Dia 15 |
| R1 | 3,67 | 2,80 | 0,00 |
| R2 | 4,18 | 3,0 | 0,00 |
| R3 | 3,25 | 3,48 | 0,00 |
| R4 | 3,84 | 3,49 | 0,00 |
| R5 | 4,70 | 2,34 | 0,00 |
| R6 | 4,23 | 2,64 | 0,00 |
| R7 | 4,77 | 3,45 | 1,00 |
| R8 | 3,60 | 2,47 | 0,00 |
| R Médio | 4,03±0,53 | 2,95±0,46 | 0,12±0,35 |

A Vacina de Referência lote 10/FDA foi estabelecida em 10 Unidades Internacionais.

¹Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

ANCOVA, p=0,5424.

ANOVA, dias 1 x 7 x 15, p=0,000000.

Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

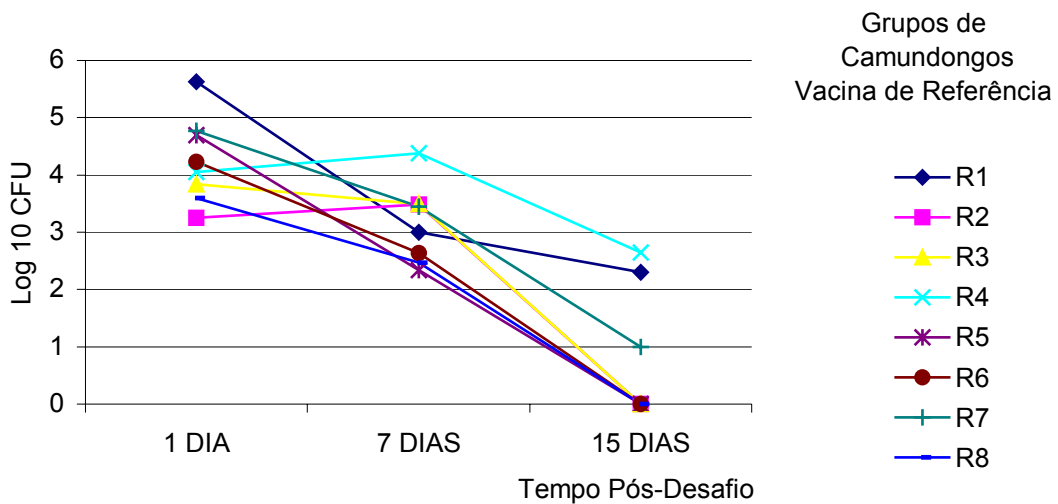


FIGURA 9. Gráfico representativo das variações nos números de bactérias viáveis (CFU) obtidas de pulmões de camundongos previamente imunizados com a vacina de referência - Lote 10/FDA, 1, 7 e 15 dias após a realização do desafio intranasal. Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

4.3 Ensaios De Desafio Intranasal (DIN) Em Grupos De Camundongos Imunizados Com A Vacina Pertussis Celular (DTP).

Na **TABELA 8** e na **FIGURA 10** observamos que a média de bactérias viáveis nos grupos de camundongos (DTP1 a DTP9) vacinados com a vacina pertussis celular (DTP) no primeiro dia após o DIN foi de $4,30\text{Log}_{10}$ CFU, resultado semelhante aos obtidos pelos grupos de camundongos inoculados com solução salina ($4,48\text{Log}_{10}$ CFU) e imunizados com a vacina de referência ($4,03\text{Log}_{10}$ CFU). No sétimo dia pós-desafio ocorreu uma redução no número de colônias ($3,23\text{Log}_{10}$ CFU) e ($1,56\text{Log}_{10}$ CFU) no décimo quinto dia após o DIN.

Os ensaios realizados com vacina DTP foram estatisticamente semelhantes entre si, demonstrando repetibilidade dos resultados obtidos (ANCOVA, $p=0,2342$).

Os resultados também permitiram demonstrar significativas diferenças nos números de bactérias viáveis obtidos entre os dias 1, 7 e 15 após o DIN, ressaltando a capacidade do método em verificar a eficácia da vacina DTP em promover o “clearance” bacteriano em pulmões de camundongos NIH.

(ANOVA, $p=0,00000879$)

Estes resultados pelo método de DIN vão ao encontro dos resultados obtidos pela vacina DTP no método de DIC (TABELA 3 e FIGURA 7) quanto à demonstração da capacidade da vacina DTP em conferir imunoproteção em um modelo experimental “in vivo”.

TABELA 8. Números de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtidas de pulmões de camundongos imunizados com a vacina pertussis celular (DTP) 1, 7 e 15 dias após realização do desafio intranasal.

| Grupos ¹ Camundongos-Vacina pertussis celular | Número de Bactérias Log ₁₀ CFU | | |
|--|---|-----------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 7 | Dia 15 |
| DTP1 | 3,62 | 1,67 | 1,80 |
| DTP2 | 4,79 | 3,78 | 2,77 |
| DTP3 | 4,20 | 3,84 | 0,00 |
| DTP4 | 4,76 | 3,88 | 0,00 |
| DTP5 | 4,20 | 3,84 | 3,77 |
| DTP6 | 4,30 | 2,91 | 2,47 |
| DTP7 | 3,95 | 2,85 | 0,00 |
| DTP8 | 4,25 | 2,91 | 1,00 |
| DTP9 | 4,65 | 3,40 | 2,30 |
| DTP Médio | 4,30±0,38 | 3,23±0,73 | 1,56±1,38 |

¹Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

ANCOVA, p=0,2342.

ANOVA, dias 1 X 7 X 15, p=0,0000087.

Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

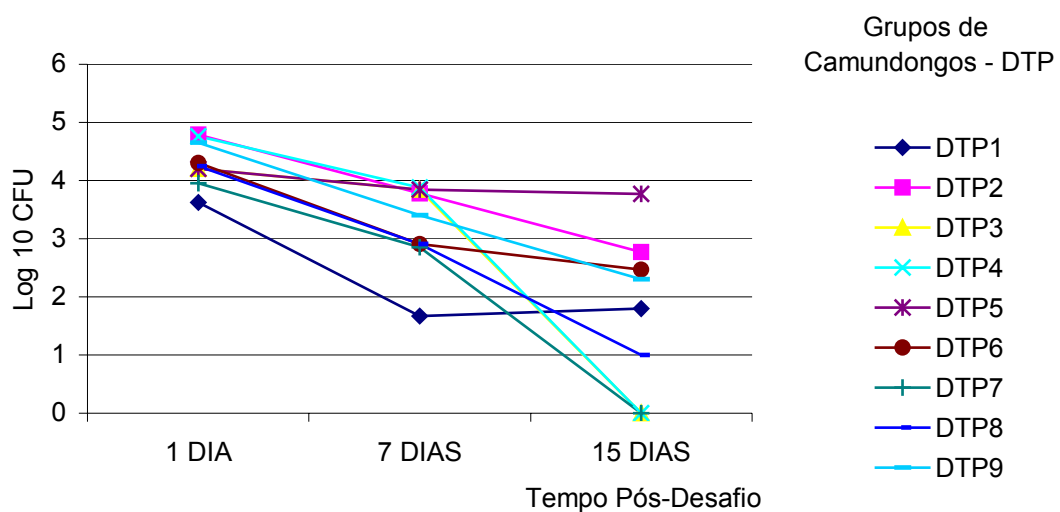


FIGURA 10. Gráfico representativo das variações nos números de bactérias viáveis (CFU) obtidas de pulmões de camundongos previamente imunizados com a vacina pertussis celular, 1, 7 e 15 dias após a realização do desafio intranasal. Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

4.4 Ensaios De Desafio Intranasal (DIN) Em Grupos De Camundongos Imunizados Com A Vacina Pertussis Acelular (DTP_A).

Na **TABELA 9** e **FIGURA 11** estão demonstrados os números de células viáveis de *Bordetella pertussis* em grupos de camundongos vacinados com vacina pertussis acelular (DTP_{A3} e DTP_{A4}) independente da formulação. A média de bactérias viáveis no primeiro dia após o DIN foi de 4,29Log₁₀ CFU, assemelhando-se aos números obtidos pelos grupos de camundongos controle inoculados com solução salina (4,48Log₁₀ CFU), vacina de referência (4,03Log₁₀ CFU) e vacina pertussis celular (DTP) (4,30Log₁₀ CFU). Independente da formulação da vacina, no sétimo dia após o DIN a média de bactérias viáveis sofreu uma redução de 3,96Log₁₀ CFU e no décimo quinto dia de 2,44Log₁₀ CFU.

(ANOVA, p=0,000349)

As correlações dos resultados obtidos entre os diversos ensaios realizados com os diferentes produtos estão presentes na **TABELA 10**. Observa-se que dentro de cada grupo (controle salina, vacina referência, DTP e DTP_{A3}) os resultados dos diversos ensaios foram significativamente semelhantes pela Análise de Covariância (ANCOVA, p>0,05) demonstrando, assim, a consistência do modelo utilizado. A análise estatística (**TABELA 10**) demonstrou semelhança entre os resultados obtidos pelos grupos de camundongos (DTP_A 1 a DTP_A 9), ressaltando a capacidade deste método experimental em verificar a eficácia da vacina pertussis acelular em promover o “clearance” bacteriano.

(ANCOVA, p=0,063)

TABELA 9. Números de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtidos de pulmões de camundongos previamente imunizados com a vacina pertussis acelular (DTP_A) 1, 7 e 15 dias após realização do desafio intranasal.

| Grupos ¹ Camundongos-Vacina pertussis acelular | Número de bactérias Log ₁₀ CFU | | |
|---|---|-----------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 7 | Dia 15 |
| DTP _A 1 | 3,49 | 3,66 | 0,00 |
| DTP _A 2 | 4,09 | 3,61 | 3,05 |
| DTP _A 3 | 5,14 | 3,38 | 2,00 |
| DTP _A 4 | 4,16 | 4,72 | 2,15 |
| DTP _A 5 | 4,14 | 4,49 | 3,00 |
| DTP _A 6 | 3,62 | 3,69 | 2,82 |
| DTP _A 7 | 5,08 | 4,79 | 4,08 |
| DTP _A 8 | 4,42 | 3,19 | 1,15 |
| DTP _A 9 | 4,54 | 4,18 | 3,78 |
| DTP _A Médio | 4,29±0,56 | 3,96±0,59 | 2,44±1,28 |

¹Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

ANCOVA, p=0,063.

ANOVA, dias 1 X 7 X 15, p=0,000349.

Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

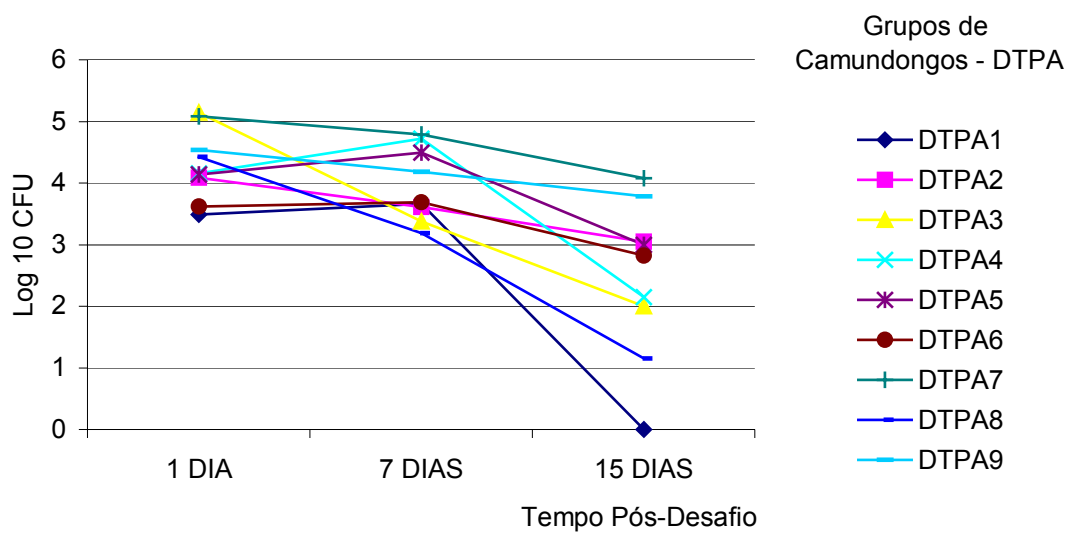


FIGURA 11. Gráfico representativo das variações nos números de bactérias viáveis (CFU) obtidas de pulmões de camundongos previamente imunizados com a vacina pertussis acelular, 1, 7 e 15 dias após realização do desafio intranasal. Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

TABELA 10. Correlação dos resultados obtidos por produto utilizado nos ensaios de DIN.

| Produto | Valor de p |
|----------------------|------------|
| Controle Salina | 0,1919 |
| Vacina de Referência | 0,5424 |
| DTP | 0,2342 |
| DTP _A | 0,06362 |
| DTP _{A3} | 0,2779 |

DTP, vacina pertussis celular; DTP_A, vacina pertussis acelular; DTP_{A3}, vacina pertussis acelular de 3 componentes.

ANCOVA, $p > 0,05$.

Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

Na **TABELA 11** observamos os resultados médios de células de *Bordetella pertussis* viáveis em grupos de camundongos imunizados com a vacina pertussis acelular de três componentes (DTP_{A3}). A contagem no dia 1 pós-desafio intranasal foi de 4,27Log₁₀ CFU com conseqüente redução para 3,71Log₁₀ CFU no sétimo dia e para 1,67Log₁₀ CFU no décimo quinto dia após o DIN. A **FIGURA 12** ilustra a eficácia da vacina pertussis acelular (DTP_{A3}) na promoção do “clearance” pulmonar em camundongos e a capacidade do método de DIN em verificar esta eficácia (Vide **TABELA 10**).

(ANCOVA, p=0,2779)

Na **TABELA 12** temos os resultados de células viáveis obtidas após o DIN em grupos de camundongos imunizados com a vacina pertussis acelular de quatro componentes (DTP_{A4}) onde entre os dias 1 e 7 após o DIN foi observada uma redução no número de CFU de 4,34Log₁₀ CFU para 4,28Log₁₀ CFU e entre os dias 7 e 15 a redução foi de 4,34Log₁₀ CFU para 3,42Log₁₀ CFU (Vide **TABELA 10**).

A **FIGURA 13** demonstra a capacidade do método de DIN em verificar a reduzida eficácia da vacina DTP_{A4} em promover o “clearance” bacteriano em pulmões de camundongos.

TABELA 11. Números de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtidas de pulmões de camundongos previamente imunizados com a vacina pertussis acelular 3 componentes (DTP_A3) 1, 7 e 15 dias após realização do desafio intranasal.

| Grupos ¹ Camundongos-Vacina pertussis acelular 3 componentes | Número de bactérias Log ₁₀ CFU | | |
|--|---|-----------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 7 | Dia 15 |
| DTP _A 3-1 | 3,49 | 3,66 | 0,00 |
| DTP _A 3-2 | 4,09 | 3,61 | 3,05 |
| DTP _A 3-3 | 5,14 | 3,38 | 2,00 |
| DTP _A 3-4 | 4,16 | 4,72 | 2,15 |
| DTP _A 3-5 | 4,48 | 3,19 | 1,15 |
| DTP _A 3 Médio | 4,27±0,59 | 3,71±0,21 | 1,67±1,15 |

¹Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo). ANCOVA, p=0,2779.

Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

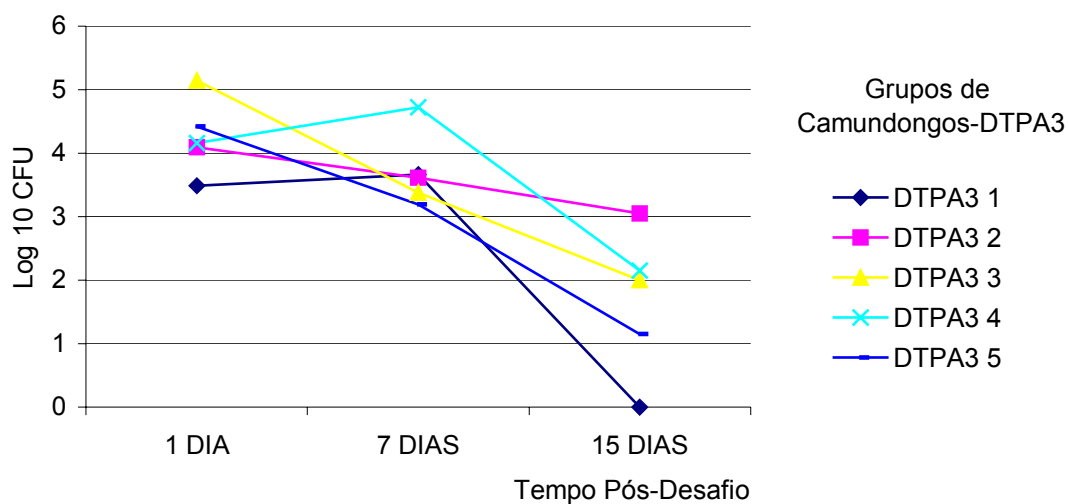


FIGURA 12. Gráfico representativo das variações nos números de bactérias viáveis (CFU) obtidas de pulmões de camundongos previamente imunizados com a vacina pertussis acelular 3 componentes (DTP_A3), 1, 7 e 15 dias após realização do desafio intranasal. Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

TABELA 12. Números de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtidos de pulmões de camundongos imunizados com a vacina pertussis acelular 4 componentes (DTP_{A4}) 1, 7 e 15 dias após realização do desafio intranasal.

| Grupos ¹ Camundongos-Vacina referência | Número de bactérias Log ₁₀ CFU | | |
|---|---|-----------|-----------|
| | DIA 1 | DIA 7 | DIA 15 |
| DTP _{A4} 1 | 4,14 | 4,49 | 3,00 |
| DTP _{A4} 2 | 3,62 | 3,69 | 2,82 |
| DTP _{A4} 3 | 5,08 | 4,79 | 4,08 |
| DTP _{A4} 4 | 4,54 | 4,18 | 3,78 |
| DTP _{A4} Médio | 4,34±0,61 | 4,28±0,48 | 3,42±0,60 |

¹Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 em cada tempo).

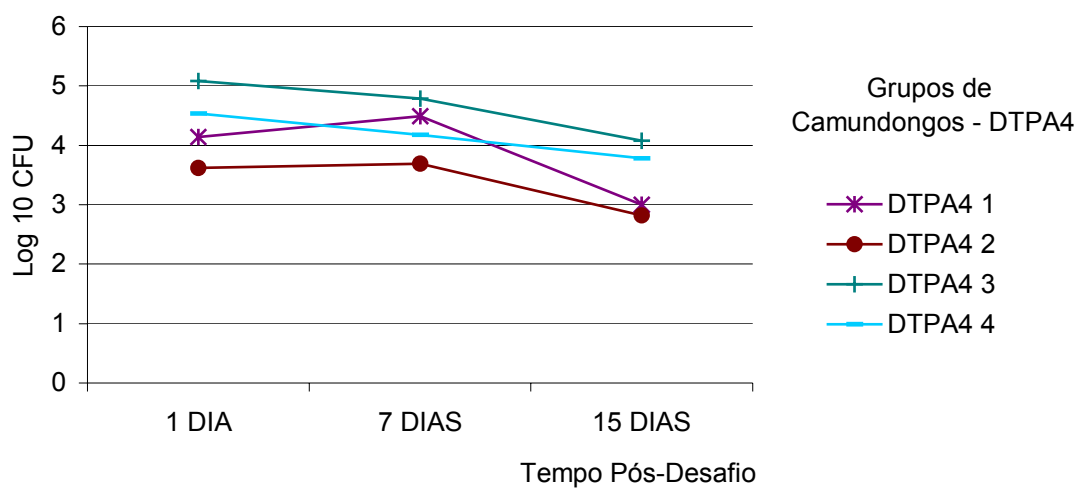


FIGURA 13. Gráfico representativo das variações nos números de bactérias viáveis (CFU) obtidos de pulmões de camundongos previamente imunizados com a vacina pertussis acelular 4 componentes (DTP_A4), 1, 7 e 15 dias após realização do desafio intranasal. Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

4.5 Comparação Dos Resultados Dos Ensaio De DIN Obtidos Em Grupos De Camundongos Controle Salina, Vacina De Referência, DTP E DTP_A.

A comparação da capacidade de eliminação de bactéria dos pulmões pelos grupos de camundongos inoculados com solução salina fisiológica (controle), vacina pertussis de referência, vacina pertussis celular (DTP) e vacina pertussis acelular (DTP_A) está demonstrada na **TABELA 13** e **FIGURA 14**. Foram observados valores semelhantes no primeiro dia após o DIN. Diferentes atividades podem ser detectadas nas aferições realizadas nos dias 7 e 15 após o DIN. Os resultados apresentados pelas vacinas pertussis acelulares (DTP_{A3} e DTP_{A4}) demonstraram diferentes perfis quanto a capacidade promover o “clearance” bacteriano.

Os resultados da análise estatística estão apresentados na **TABELA 15**. Diferenças significativas foram observadas entre os resultados do ensaio de DIN da vacina DTP_{A4} e as demais formulações (Vacina de Referência ($p=0$); DTP ($p=0,02$); DTP_{A3} ($p=0,029$)) pelo teste de ANOVA.

O reduzido desempenho da vacina DTP_{A4} no ensaio de DIN fez com que seus resultados se aproximassem dos resultados obtidos por grupos de camundongos controle (inoculados com solução salina).

(ANOVA, $p=0,26$)

TABELA 13. Resultados médios dos números de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtidos de pulmões de camundongos previamente inoculados com solução salina, vacina pertussis de referência, vacina DTP e vacina DTP_A.

| | 1 Dia | 7 Dias | 15 Dias |
|----------------------|-------|--------|---------|
| Controle Salina | 4,48 | 4,46 | 3,83 |
| Vacina de Referência | 4,03 | 2,95 | 0,12 |
| DTP | 4,30 | 3,23 | 1,57 |
| DTP _A | 4,30 | 3,97 | 2,45 |

DTP, vacina pertussis celular; DTP_A, vacina pertussis acelular.

A Vacina de Referência lote 10/FDA foi estabelecida em 10 Unidades Internacionais.

Valores expressos em Log₁₀ de Unidade Formadora de Colônia (CFU).

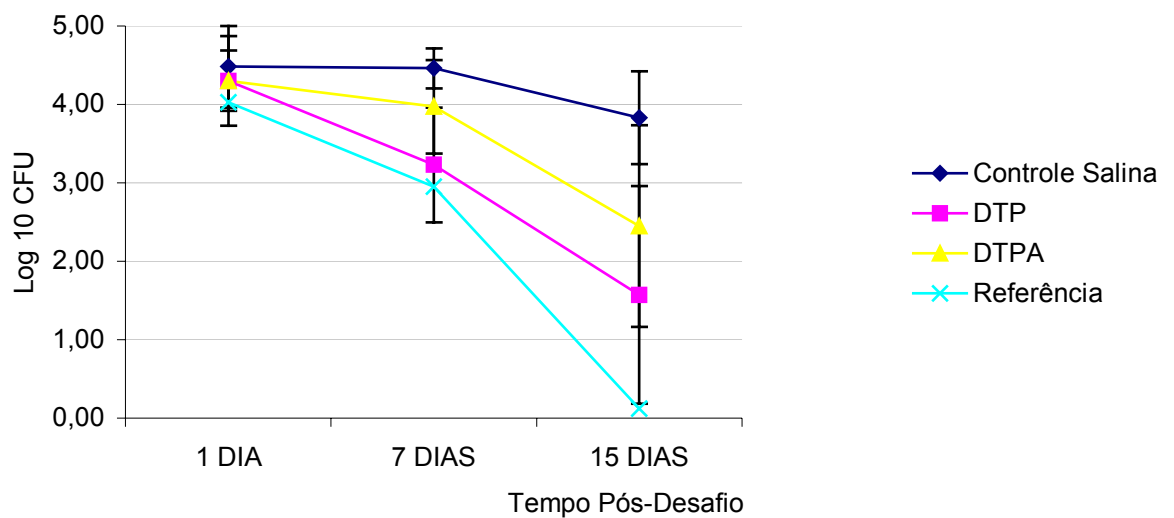


FIGURA 14. Gráfico representativo das médias das variações nos números de bactérias viáveis (CFU) obtidas de pulmões de camundongos previamente inoculados com solução salina, vacina pertussis de referência, vacina DTP e vacina DTP_A, 1, 7 e 15 dias após o DIN. DTP, vacina pertussis celular; DTP_A, vacina pertussis acelular. A Vacina de Referência lote 10/FDA foi estabelecida em 10 Unidades Internacionais. Valores expressos em Log₁₀ de Unidade Formadora de Colônia (CFU). Desafio intranasal realizado com grupos de 12 camundongos (3 por tempo).

Na **TABELA 14** e **FIGURA 15** temos a comparação da capacidade de eliminação de bactéria dos pulmões por parte de grupos de camundongos inoculados com solução salina fisiológica (controle), vacina pertussis de referência, vacina pertussis celular (DTP) e vacina pertussis acelular de três e de quatro componentes (DTP_{A3} e DTP_{A4}) separadamente devido a clara diferença nos resultados apresentados pelas mesmas no modelo de DIN. Destacamos que as diferenças nos valores de bactérias viáveis entre os grupos inoculados com as preparações são evidentes somente a partir do dia 7 após o DIN atingindo níveis mais acentuados no décimo quinto dia após o desafio intranasal.

Na **TABELA 15** temos as correlações entre os resultados obtidos pelos produtos testados pelo ensaio de DIN. Desta forma podemos verificar os diferentes níveis de atividade das vacinas testadas quanto a capacidade de promover o “clearance” pulmonar bem como a habilidade do modelo em discriminar estes produtos analisados.

TABELA 14. Resultados médios dos números de células viáveis (CFU) de *Bordetella pertussis* obtidos de pulmões de camundongos previamente inoculados com solução salina, vacina pertussis de referência, vacina DTP e vacina DTP_{A3} e DTP_{A4}.

| | 1 Dia | 7 Dias | 15 Dias |
|----------------------|-------|--------|---------|
| Controle Salina | 4,48 | 4,46 | 3,83 |
| Vacina de Referência | 4,03 | 2,95 | 0,12 |
| DTP | 4,30 | 3,23 | 1,57 |
| DTP _{A3} | 4,26 | 3,41 | 1,67 |
| DTP _{A4} | 4,34 | 4,13 | 3,42 |

DTP, vacina pertussis celular; DTP_{A3}, vacina pertussis acelular de 3 componentes; DTP_{A4}, vacina pertussis acelular de 4 componentes.

A Vacina de Referência lote 10/FDA foi estabelecida em 10 Unidades Internacionais.

Valores expressos em Log₁₀ de Unidade Formadora de Colônia (CFU).

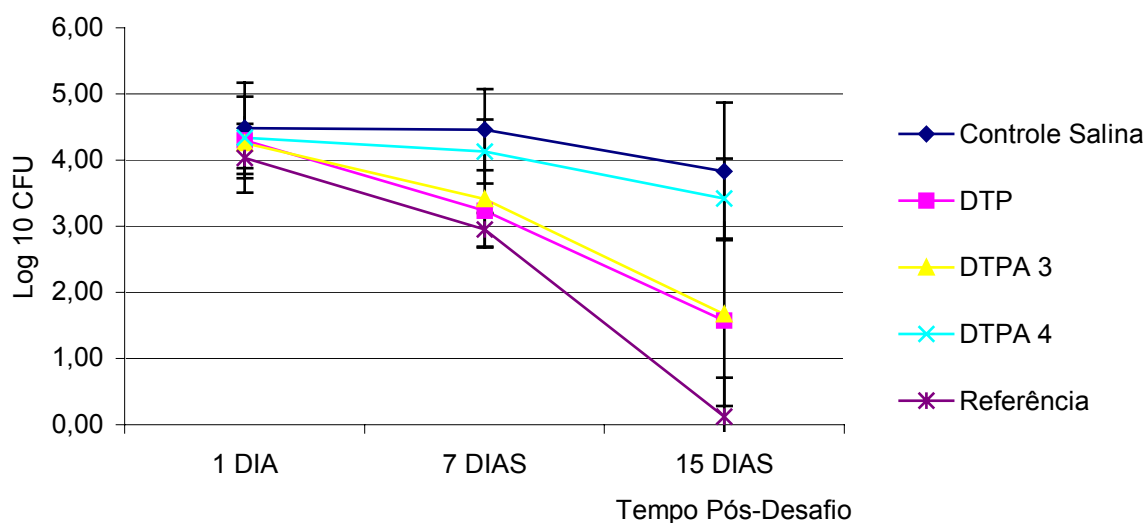


FIGURA 15. Gráfico representativo das variações médias dos números de bactérias viáveis (Log₁₀ CFU) de grupos de camundongos inoculados com solução salina, vacina pertussis de referência, vacina pertussis celular, vacina pertussis acelular de três componentes e vacina acelular de quatro componentes no ensaio de desafio intranasal. DTP, vacina pertussis celular; DTP_{A3}, vacina pertussis acelular de 3 componentes; DTP_{A4}, vacina pertussis acelular de 4 componentes. A Vacina de Referência lote 10/FDA foi estabelecida em 10 Unidades Internacionais. Valores expressos em Log₁₀ de Unidade Formadora de Colônia (CFU).

TABELA 15. Análise estatística pelo teste de ANOVA ($p > 0,05$) dos resultados dos ensaios de DIN entre os grupos de camundongos inoculados com solução salina, vacina pertussis de referência, vacina DTP, vacina DTP_A3 e DTP_A4.

| | Celular | DTP _A | DTP _A 3 | DTP _A 4 | Salina |
|--------------------|----------|------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Controle Salina | 0,000195 | 0,006783 | 0,000287 | 0,260036 | 0,000000 |
| Referência | 0,0999 | 0,000001 | 0,0021 | 0,000000 | 0,000000 |
| Celular | | 0,1817 | 0,791651 | 0,0286 | 0,000195 |
| DTP _A | | | 0,717 | 0,0709 | 0,006783 |
| DTP _A 3 | | | | 0,02945 | 0,000287 |
| DTP _A 4 | | | | | 0,260036 |

DTP, vacina pertussis celular; DTP_A, vacina pertussis acelular; DTP_A3, vacina pertussis acelular de 3 componentes; DTP_A4, vacina pertussis acelular de 4 componentes.

Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

4.6 Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA) Utilizando Soros De Camundongos de Linhagens Diferentes.

Avaliação da produção de anticorpos através do teste de ELISA em soros de camundongos de diferentes linhagens imunizados com vacina pertussis celular de referência – Lote 10/FDA.

Os dados apresentados na **FIGURA 16** demonstram variações dos níveis de anticorpos produzidos por camundongos suíços albinos das linhagens NIH – National Institute of Health e SW – Swiss Webster (CECAL) imunizados com a Vacina de Referência Lote 10/FDA quando analisados através do teste ELISA. A análise estatística dos dados (**TABELA 16**) demonstrou uma maior capacidade de produção de anticorpos contra a vacina de referência nos camundongos da linhagem NHI (76,34%).

(ANOVA, $p < 0,000266$)

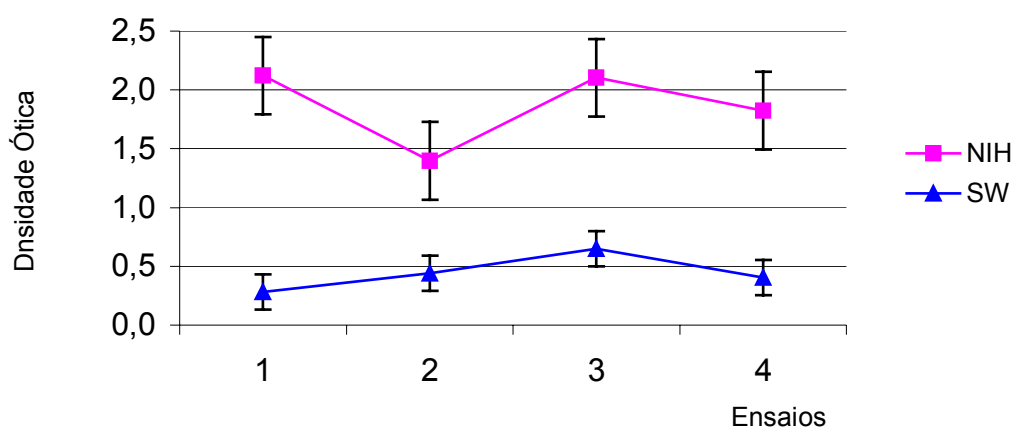


FIGURA 16. Gráfico representativo das variações dos níveis de anticorpos produzidos por camundongos suíços albinos das linhagens NIH – National Institute of Health e SW – Swiss Webster observadas através do teste ELISA. Quatro ensaios realizados em paralelo, utilizando grupos de 15 camundongos imunizados com 1,0 UI/dose da Vacina de Referência Lote 10/FDA. NIH, National Institute of Health; SW, Swiss Webster. Ensaios realizados em paralelo utilizando a Vacina de Referência Lote 10/FDA.

TABELA 16. Diferenças nos níveis de anticorpos produzidos por camundongos suíços albinos das linhagens NIH – National Institute of Health e SW – Swiss Webster detectadas através do teste ELISA.

| Linhagem dos camundongos | Resultados dos testes ELISA (Densidade ótica em $\lambda = 450$ nm) | | | | MÉDIA \pm SD |
|--------------------------|--|-----------|------------|-----------|-----------------|
| | Ensaio I | Ensaio II | Ensaio III | Ensaio IV | |
| NIH | 2,12 | 1,39 | 2,10 | 1,82 | 1,86 \pm 0,33 |
| SW | 0,28 | 0,44 | 0,64 | 0,40 | 0,44 \pm 0,15 |

SD, desvio padrão.

Experimentos realizados em quadruplicata, utilizando grupos de 15 camundongos imunizados com 1,0 UI/dose da Vacina de Referência Lote 10/FDA.

ANOVA, $p=0,000260$; Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

4.7 Ensaios De ELISA Com Soros Em Camundongos NIH Imunizados Com Vacina Pertussis Celular (DTP)

Na **FIGURA 17** e nas **TABELAS 17** e **18** estão apresentados os resultados em UI/mL dos ensaios de ELISA realizados com soros de camundongos imunizados com seis lotes diferentes (A – F) de vacina pertussis celular (DTP). A potência média dos lotes de vacina DTP foi superior a 8,0 UI/mL e variou entre 9,36 UI/mL e 11,36 UI/mL, sem diferenças estatísticas entre estes.

(ANOVA, $p=0,769101$).

Os resultados demonstraram a repetibilidade (ANOVA, $p>0,05$) e a capacidade do ensaio ELISA em atestar níveis de eficácia da vacina pertussis celular DTP frente a vacina de referência Lote 10/FDA.

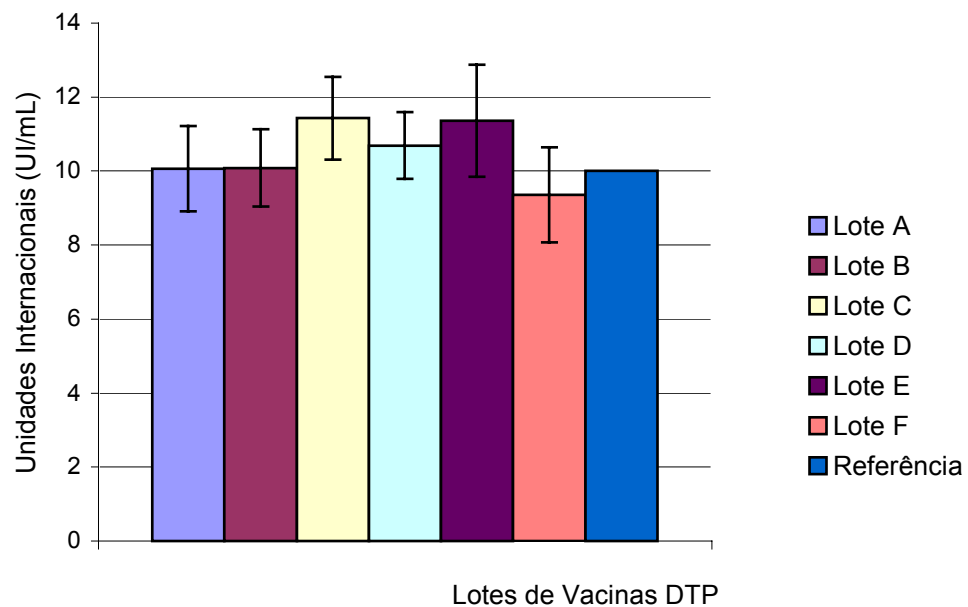


FIGURA 17. Potências médias (UI/mL) de cada lote de vacina pertussis celular (DTP) determinados através do ensaio de ELISA em relação a vacina de referência lote 10/FDA estabelecida em 10 Unidades Internacionais. Ensaio de ELISA realizados em triplicata utilizando soros de 15 camundongos suíços albinos da linhagem NIH imunizados com cada lote de vacina DTP.

TABELA 17. Potência¹ média (M), máxima (LS) e mínima (LI) de cada lote de vacina pertussis celular (DTP) avaliada pelo teste ELISA.

| Lotes DTP | Potência dos lotes de vacina DTP (UI/mL) | | | | | | | | |
|--------------|---|-------|------|-----------|-------|------|------------|-------|------|
| | Ensaio I | | | Ensaio II | | | Ensaio III | | |
| | M | LS | LI | M | LS | LI | M | LS | LI |
| A | 11,10 | 39,66 | 3,18 | 10,37 | 42,00 | 2,54 | 8,79 | 42,40 | 0,90 |
| B | 9,49 | 33,31 | 2,68 | 9,48 | 38,00 | 2,28 | 11,29 | 17,48 | 7,35 |
| C | 10,20 | 25,00 | 4,03 | 11,72 | 49,00 | 2,96 | 12,37 | 58,00 | 2,81 |
| D | 10,21 | 25,00 | 4,08 | 11,73 | 49,00 | 2,97 | 10,13 | 46,00 | 2,23 |
| E | 9,95 | 92,00 | 1,07 | 12,96 | 48,00 | 2,72 | 11,17 | 34,68 | 3,75 |
| F | 10,82 | 27,00 | 4,34 | 8,82 | 35,00 | 1,33 | 8,44 | 26,68 | 2,58 |

¹Eficácia de DTP expressos em Unidades Internacionais definidas a partir da Vacina de Referência – Lote 10/FDA (10 UI).

Ensaio de ELISA realizados em triplicata utilizando soros de 15 camundongos suíços albinos da linhagem NIH imunizados com cada lote de vacina DTP.

ANOVA, p=0,769101. Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

TABELA 18. Potências de diferentes lotes de vacina pertussis celular (DTP) avaliadas pelo teste ELISA.

| Ensaio ELISA | Potência dos lotes de vacina DTP (UI/mL) | | | | | |
|-----------------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | A | B | C | D | E | F |
| I | 11,03 | 11,29 | 10,19 | 10,21 | 9,94 | 10,82 |
| II | 10,37 | 9,47 | 11,72 | 11,73 | 11,17 | 8,82 |
| III | 8,78 | 9,49 | 12,37 | 10,13 | 12,96 | 8,44 |
| MÉDIA \pm SD ¹ | 10,06 \pm 1,15 | 10,08 \pm 1,04 | 11,42 \pm 1,11 | 10,69 \pm 0,90 | 11,36 \pm 1,51 | 9,36 \pm 1,27 |

¹Desvio Padrão

Os resultados expressos em UI/mL foram calculados em relação à Vacina de Referência, estabelecida em 10 UI.

Ensaio de ELISA realizados em triplicata utilizando soros de 15 camundongos suíços albinos (5 por diluição) da linhagem NIH imunizados com cada lote de vacina DTP.

ANOVA, $p=0,769101$. Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

4.8 Análise Comparativa Entre Os Resultados Dos Ensaio ELISA E De Desafio Intracerebral (DIC) Em Camundongos Imunizados Com Vacina Pertussis Celular (DTP).

Foram observadas variações intralaboratoriais nos resultados obtidos com as diferentes preparações (lotes) de DTP (**TABELA 17**) a semelhança do observado nos ensaios DIC (**TABELA 4**).

A capacidade de imunoproteção (≥ 8 UI/mL) de DTP foi observada em todos os lotes testados através de ambos os testes ELISA e DIC (**FIGURA 18**). A capacidade de imunoproteção (≥ 8 UI/mL) dos lotes de DTP, variou entre 8,42 a 16,40 UI e 11,39 UI a 14,18 UI/mL nos ensaios DIC-Produtor e DIC-Teste, respectivamente; entre 8,44 UI/mL e 12,37 UI/mL nos ensaios de ELISA.

Conforme apresentado na **TABELA 19**, a análise estatística demonstrou haver correlação entre os dados obtidos pelos métodos Elisa e DIC de análise de potência de vacina pertussis celular. (ANOVA, $p > 0,247091$)

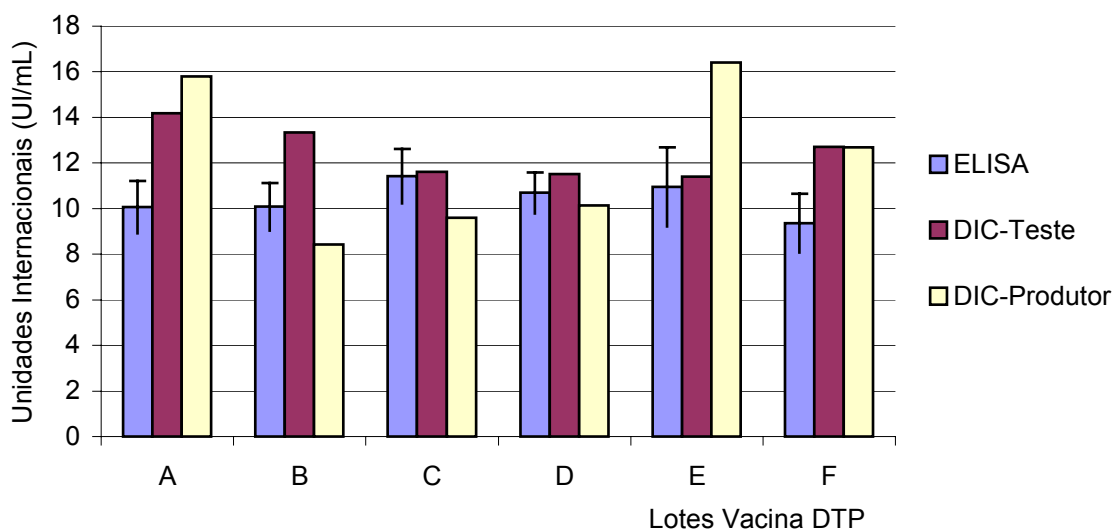


FIGURA 18. Gráfico representativo dos resultados médios dos ensaios de ELISA e de desafio intracerebral (DIC) em camundongos imunizados com vacina pertussis celular (DTP). A Vacina de Referência lote 10/FDA foi estabelecida em 10 Unidades Internacionais. ¹Resultados fornecidos pelo Setor de Controle de Qualidade do Instituto Butantan – SP. ANOVA, $p=0,247091$. Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

TABELA 19. Análise estatística pelo teste de ANOVA¹ dos resultados dos Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA) e de Desafio Intracerebral em camundongos imunizados com vacina pertussis celular (DTP).

| Ensaio comparados | Valores de p |
|---------------------------------|--------------|
| ELISA I, II e III | 0,769101 |
| DIC Teste e Produtor | 0,847667 |
| DIC-Teste, DIC-Produtor e ELISA | 0,247091 |

¹ANOVA, análise de variância $p < 0,05$; Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993

4.9 Ensaio De ELISA Com Soros Em Camundongos NIH Imunizados Com Vacina Pertussis Acelular (DTP_A) Frente A Vacina De Referência – Lote 10/FDA.

Os resultados dos testes de ELISA, realizados em triplicata, com soros de camundongos imunizados com dois lotes de vacina pertussis acelular (DTP_A) estão apresentados nas **TABELA 20** e **TABELA 21**. Ocorreram variações significativas entre os resultados obtidos nos ensaios realizados com a vacina DTP_{A3} e a vacina DTP_{A4}.

TABELA 20. Potência¹ média (M), máxima (LS) e mínima (LI) de cada lote de vacina pertussis acelular (DTP_A) avaliada pelo teste ELISA.

| Lotes DTP _A | Potência dos lotes de vacina DTP _A (UI/mL) | | | | | | | | |
|---------------------------|--|-----|------|-----------|----|------|------------|-----|------|
| | Ensaio I | | | Ensaio II | | | Ensaio III | | |
| | M | LS | LI | M | LS | LI | M | LS | LI |
| DTP _{A3} | 12,23 | 197 | 1,11 | 10,40 | 50 | 2,21 | 9,26 | 123 | 0,59 |
| DTP _{A4} | 6,13 | 38 | 0,75 | 7,0 | 44 | 0,9 | 6,93 | 44 | 0,89 |

DTP_{A3}, vacina pertussis acelular de três componentes; DTP_{A4}, vacina pertussis acelular de quatro componentes.

¹Eficácia de DTP expressos em Unidades Internacionais (UI/mL) definidas a partir da Vacina de Referência – Lote 10/FDA (10 UI).

Ensaio de ELISA realizados em triplicata utilizando soros de 15 camundongos suíços albinos da linhagem NIH imunizados com cada lote de vacina DTP_A.

TABELA 21. Potências de diferentes lotes de vacina pertussis acelular (DTP_A) avaliadas pelo teste ELISA.

| Ensaio ELISA | Potência dos lotes de vacina DTP _A (UI/mL) | |
|------------------------|--|-------------------|
| | DTP _{A3} | DTP _{A4} |
| I | 12,23 | 6,13 |
| II | 10,41 | 7,01 |
| III | 9,26 | 6,93 |
| MÉDIA ±SD ¹ | 10,63±1,33 | 6,69±0,48 |

DTP_{A3}, vacina pertussis acelular de três componentes; DTP_{A4}, vacina pertussis acelular de quatro componentes.

¹Desvio Padrão

Os resultados expressos em UI/mL foram calculados em relação à Vacina de Referência Lote 10/FDA, estabelecida em 10 UI.

Ensaio de ELISA realizado em triplicata utilizando soros de 15 camundongos suíços albinos da linhagem NIH imunizados com cada lote de vacina DTP_A.

ANOVA, p=0,012185.

4.10 Análise Estatística Realizada Pelo Teste De ANOVA Dos Resultados Dos Ensaio ELISA Com Diferentes Produtos

Os resultados apresentados na **FIGURA 19** e na **TABELA 22** demonstraram ineficácia da vacina DTP_{A4} (< 8 UI/mL) quando avaliada pelo ELISA, enquanto a DTP_{A3} apresentou eficácia semelhante as vacinas pertussis celulares DTP frente a vacina de referência Lote 10/FDA.

Na **TABELA 23** estão apresentados os resultados da análise estatística realizada pelo teste de ANOVA dos resultados obtidos pelo ELISA nos diferentes produtos analisados. Os lotes de vacina DTP_{A3} e DTP_{A4}, de composições distintas, apresentaram resultados significativamente diferentes ($p=0,012185$). Quando desconsiderada a origem da vacina acelular, a eficácia foi estatisticamente diferente a observada para a vacina pertussis celular DTP ($p=0,021219$).

Quando analisados os resultados obtidos pela vacina DTP_{A3}, a eficácia foi significativamente semelhante a da vacina DTP ($p=0,90057$). A vacina DTP_{A4} apresentou resultados estatisticamente diferentes aos da vacina DTP ($p=0,00073$) sugerindo, assim, sua ineficácia (6,69 UI/mL) na avaliação através do ensaio de ELISA, à semelhança do observado através do ensaio de DIN (**TABELA 14 e FIGURA 15**).

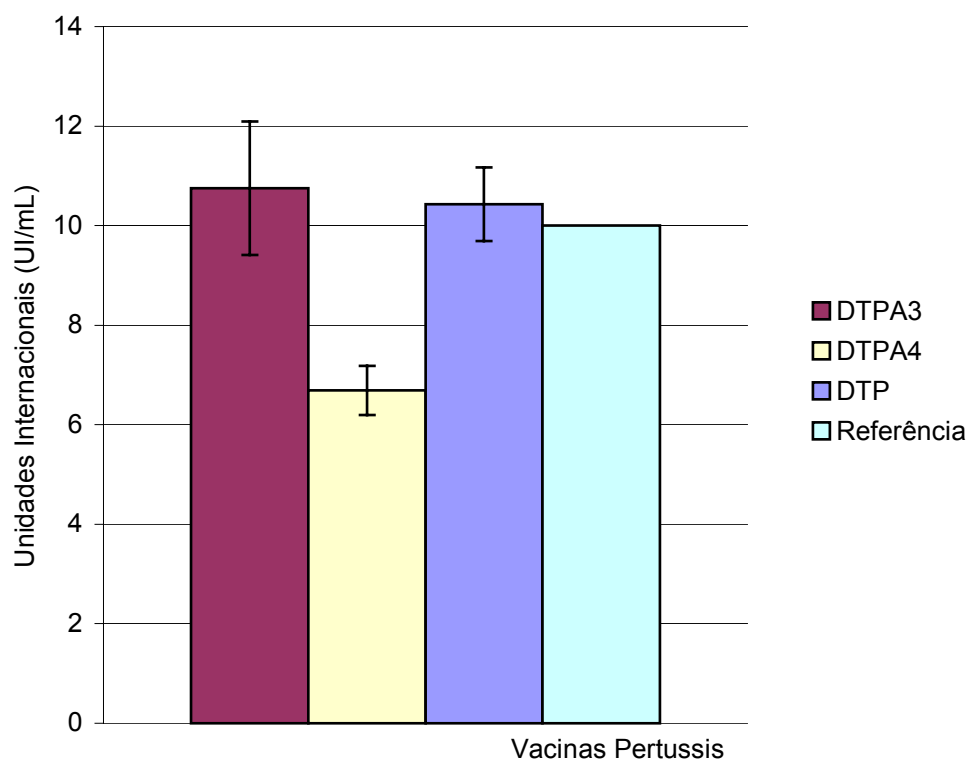


FIGURA 19. Potências médias dos lotes de vacinas pertussis acelulares (DTP_{A3} e DTP_{A4}), Vacinas celulares DTP e de Referência lote 10/FDA avaliadas pelo teste ELISA. Ensaio de ELISA realizado em triplicata utilizando soros de 15 camundongos suíços albinos da linhagem NIH imunizados com cada lote de vacina DTP. DTP_{A3} , vacina pertussis acelular de três componentes; DTP_{A4} , vacina pertussis acelular de quatro componentes.

TABELA 22. Potência da vacina pertussis celular (DTP_A) avaliadas pelo teste ELISA.

| Vacina pertussis | Potência ¹ (UI/mL) |
|-------------------|-------------------------------|
| DTP _{A3} | 10,75 ±1,34 |
| DTP _{A4} | 6,69 ±0,48 |
| DTP | 10,43 ±0,74 |
| Referência | 10,00 ±0,00 |

DTP_{A3}, vacina pertussis acelular de três componentes; DTP_{A4}, vacina pertussis acelular de quatro componentes; DTP, vacina pertussis celular.

¹Média ± Desvio Padrão.

Os resultados expressos em UI/mL foram calculados em relação à Vacina de Referência Lote 10/FDA, estabelecida em 10 UI.

Ensaio de ELISA realizados em triplicata utilizando soros de 15 camundongos suíços albinos da linhagem NIH imunizados com cada lote de vacina DTP_A.

TABELA 23. Análise estatística pelo teste de ANOVA dos resultados dos ensaios ELISA realizados com os diferentes produtos.

| Produtos Comparados | Valores de p |
|---------------------------------------|--------------|
| DTP x DTP _A | 0,021219 |
| DTP x DTP _{A3} | 0,900572 |
| DTP x DTP _{A4} | 0,000073 |
| DTP _{A3} x DTP _{A4} | 0,012185 |

DTP_{A3}, vacina pertussis acelular de três componentes; DTP_{A4}, vacina pertussis acelular de quatro componentes.

ANOVA, análise de variância $p < 0,05$; Programa Statistica for Windows – Release 4.0 - ©Statsoft Inc. 1993.

5 DISCUSSÃO

5.1 Desafio Intracerebral (DIC)

De acordo com reunião entre produtores e comitê de expertos da OMS, realizada em novembro de 1998, está identificada a necessidade de se buscar uma nova metodologia que ateste a atividade imunogênica de novas formulações de vacinas pertussis acelulares e de novas formulações sem a participação de estudos clínicos complementares.

No momento, seria antiético realizar estudos clínicos com as novas formulações propostas a cada ano já que se encontram disponíveis vacinas reconhecidamente eficazes e seguras no mercado. Isto enfatiza a necessidade de se buscar um modelo experimental animal que demonstre correlação com eficácia em campo e traga maiores informações sobre os mecanismos e agentes envolvidos na doença em humanos.

Apesar do sucesso no uso da vacina pertussis celular e de resultados encorajadores em estudos clínicos realizados com vacinas acelulares, os mecanismos de indução de proteção contra a coqueluche permanecem sem o completo entendimento.

Por envolver mecanismos de imunidade humoral e celular durante a infecção por *B. pertussis*, ensaios sorológicos não mostram clara correlação em estudos clínicos realizados.

Em nossos estudos percebemos a existência de variações intra e interlaboratoriais quanto aos resultados obtidos pelo método de DIC e o aumento do número de notificações ocorrido nos últimos vinte anos, principalmente, reforça a busca de modelos experimentais que assegurem a qualidade das vacinas disponíveis no mercado.

Guiso (1999a) cita que lotes de vacina DTP consideradas satisfatórias pelo teste de DIC não confirmaram sua eficácia em estudos clínicos realizados.

O desafio intracerebral continuou a ser o mais confiável método disponível para o controle lote a lote da potencia do componente pertussis em vacinas celulares (Corbel, 1999b).

5.2 Desafio Intranasal (DIN)

Assim como Corbel (1999b) e Guiso (1999a), nossos experimentos realizados com o método de DIN também demonstraram uma eficácia superior da vacina celular frente às acelulares e que diferenças acentuadas foram percebidas quanto à capacidade das diferentes vacinas acelulares em promover o “clearance” bacteriano em camundongos. Nos nossos resultados observamos a acentuada diferença de atividade, no método analisado, entre a vacina pertussis acelular de três componentes e a de quatro componentes.

A repetibilidade dos resultados obtidos entre os ensaios realizados com cada produto (vacina de referência, vacina pertussis celular, vacina pertussis acelular e controle salina) demonstra a capacidade do ensaio em analisar a eficácia destas preparações abordadas neste estudo.

Observamos, ainda, a capacidade do modelo em discriminar os produtos analisados segundo seu grau de efetividade no “clearance” pulmonar denotando sua utilidade na busca de vacinas seguras e eficazes. Outro fator relevante é a capacidade do método de DIN em analisar vacinas pertussis acelulares já que não há, até o momento, método preconizado pelos diversos órgãos normativos tais como OMS, FDA, Farmacopéias etc.

Na discussão entre produtores e comitê de expertos da OMS foi abordada a capacidade do modelo em discriminar as diferentes formulações, bem como sua repetibilidade e aplicabilidade na aferição da eficácia de novas preparações, sejam elas celulares ou acelulares (Corbel, 1999b).

Em nossos experimentos verificamos, inicialmente, dificuldades em expressar o grau de eficácia das preparações analisadas pelo método de DIN mas a representação final sob forma de gráfico deixa claro que o modelo é capaz de diferir os diversos produtos analisados. Esta dificuldade também já foi pontuada pelo comitê da OMS e estão sendo empreendidos esforços no sentido quantificar a potencia de cada vacina frente a uma vacina de referência.

Em concordância com os nossos resultados, Guiso (1999a) atesta que o método de DIN é relativamente simples, acurado, com alta repetibilidade sendo possível seu uso para avaliação de novas formulações além de possíveis alterações em equipamentos, cepa vacinal e metodologias utilizadas. Outro uso descrito para este método seria a verificação da atividade da vacina frente a cepas circulantes na população.

Mills (1998) verificou que o número de bactérias viáveis nos pulmões de camundongos controle (inoculados com solução salina fisiologia) aumenta desde o desafio via intranasal até o sétimo dias, decaindo lentamente, então, até a total eliminação por volta do quadragésimo dia pós-desafio, fato este também verificado em nossos experimentos envolvendo camundongos controle. O autor relata que para diminuir a colonização pelo método de DIN os anticorpos contra toxina pertussis, pertactina e fímbrias são importantes mas para a total eliminação da infecção em camundongos, e necessária a opsonização de macrófagos reafirmando, assim a participação ,em conjunto das imunidades humoral e celular.

Apesar dos resultados obtidos neste modelo permanece a necessidade de vacinas de referências (celular e acelular, de acordo com sua composição) estabelecida por este método e que tenha demonstrado eficácia em estudos de campo.

5.3 ELISA

Na literatura - órgãos normativos nacionais e internacionais - é indicada a necessidade de se utilizar camundongos albino-suíços susceptíveis à coqueluche.

Em nossos experimentos, realizados com o método de ELISA, fica clara a diferença na produção de anticorpos entre as duas linhagens de camundongos utilizadas (Swiss-Webster e NIH) onde a linhagem NIH é utilizada largamente por laboratórios produtores e controladores para testes de eficácia e segurança (toxicidade específica) envolvendo o componente pertussis da vacina tríplice DTP.

Segundo Ark (2000) o ensaio de ELISA possui alta reprodutibilidade, reduz o numero de animais utilizados, diminui o estresse animal durante o ensaio além de seus resultados correlacionarem bem com os resultados obtidos pelo ensaio de DIC. Estas observações vão ao encontro do que foi observado por nós em nossos experimentos realizados com o teste de ELISA.

Outra observação de Ark é que por possuir vários antígenos de superfície, o teste de ELISA realizado separadamente para cada antígeno purificado disponível da *B. pertussis* não seria o ideal e o fato de em nossos testes

termos recoberto as placas, a serem utilizadas nos ensaios, com a bactéria completa reforçaria a metodologia utilizada por nós.

O método de ELISA mostrou repetibilidade tanto em vacinas pertussis celulares quanto acelulares, além de mostrar que possui capacidade de discriminar produtos de origem e composição diferentes. Assim como o ensaio de DIN, o teste de ELISA foi capaz de observar uma reduzida eficácia da vacina pertussis acelular de quatro componentes frente às outras preparações ensaiadas (DTP e DTP_{A3}).

A repetibilidade dos resultados obtidos entre os ensaios realizados com cada produto (vacina de referência, vacina pertussis celular, vacina pertussis acelular e controle salina) demonstra a capacidade do ensaio em analisar a eficácia destas preparações abordadas neste estudo.

Nossos resultados, neste modelo, denotam uma maior eficácia da vacina acelular de três componentes do que a apresentada pela vacina pertussis celular, ao contrário do que ocorreu no modelo de desafio intranasal. Este fato foi anteriormente descrito por Watanabe (2002a) onde a vacina celular demonstrou um “clearance” bacteriano mais efetivo que a vacina acelular porém com indução de produção de anticorpos aferida pelo teste de ELISA inferior ao da vacina acelular.

Apesar dos resultados obtidos neste modelo permanece a necessidade de vacinas de referências (celular e acelular, de acordo com sua composição) estabelecida por este método e que tenha demonstrado eficácia em estudos de campo.

6 CONCLUSÕES

O ensaio de desafio intranasal (DIN) mostrou ser útil para avaliação da eficácia de vacinas acelulares, proporcionando um menor estresse ao animal se comparado ao método de desafio Intracerebral (DIC).

O ensaio de DIN conseguiu diferenciar as duas composições de vacinas pertussis acelulares quanto a efetividade de promoção do “clearance” pulmonar, mostrando que a vacina acelular de três componentes possui eficácia superior à de quatro componentes que pode ser explicado pela concentração dos antígenos ser, em média, três vezes superior na de vacina de três componentes. O método de ELISA também foi capaz de diferenciar a menor eficácia da vacina acelular de quatro componentes frente à de três componentes que como no método de DIN mostrou eficácia semelhante à da vacina pertussis celular.

A seleção e as condições de cultivo da cepa desafio a ser utilizada, de modo a obter o máximo de expressão de suas toxinas e adesinas, são condições primordiais para se obter uma infecção consistente e homogênea dos camundongos pelo método de DIN.

Através do método de DIN é possível avaliar a eficácia de cada componente, bem como sua concentração ideal, das vacinas acelulares disponíveis bem como de futuras formulações.

Através deste método de DIN seria possível verificar a ação das vacinas disponíveis no mercado frente a diferentes cepas de *B. pertussis* que estejam circulando na população.

Através dos dois métodos avaliados neste estudo é possível uma considerável redução do número de animais de laboratórios a serem utilizados na avaliação da eficácia da vacina pertussis, além de sua aplicabilidade ao controle de vacinas pertussis acelulares.

A vacina pertussis celular demonstrou maior eficácia, pelo método de desafio intranasal (DIN), que a vacina pertussis acelular, seja ela de três ou de quatro componentes.

A vacina pertussis acelular de três componentes demonstrou maior eficácia, pelo método de ELISA, que a vacina pertussis celular e a vacina acelular de quatro componentes.

Ambos os ensaios abordados neste estudo mostraram utilidade, podendo ser aproveitados na verificação de consistência de produção lote a lote, ensaios pré-licenciamento, além de trazer contribuições para o melhor entendimento dos componentes envolvidos nos mecanismos de infecção e de resposta imune à infecção por *B. pertussis*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO NETO, V.; BALDY J.L.S. **Imunizações**. 3º Edição-Ed. Sarvier.São Paulo. p 43-54, 1991.

ANDRÉ, M.; POIRIER, B.; BORNSTEIN, N. *et al.* Key points for development of mouse immunogenicity test as potency assay for acellular pertussis vaccines. **Biologicals**, v.28, p. 217-225, 2000.

ARK, A.V.D.; KAPPELLE I.V.S.; ÖLANDER, R.M., HENDRIKSEN, C. The Pertussis serological potency test collaborative study to evaluate replacement of the Mouse protection test, **Biologicals**, v.28, p.105-118, 2000.

ATKINSON W.; WOLF, C.; HUMISTON, S.; NELSON, R. **Epidemiology and prevention of Vaccine-preventable diseases**. 6th Edition -Department of Health e Human Services. CDC-USA, p. 67-83, January 2000.

BOAS Práticas em Experimentação Animal. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. (65.3440.002).

BRASIL. Portaria nº 175, de 11 de novembro de 1996. Estabelece Normas Técnicas de Produção e Controle de Qualidade das Vacinas: Tríplice Bacteriana, Toxóide Tetânico, Dupla Adulto e Dupla Infantil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de nov. 1996. Seção 1, p. 23512.

CANTHABOO, C.; WILLIAM, L.; XING, D.K.L.; CORBEL, M. Investigation of cellular and humoral responses to whole cell and acellular pertussis vaccine. **Vaccine**, v. 19,n. 6, p.637-643, 2000a.

CANTHABOO, C.; XING, D.K.L.; DOUGLAS, A.; CORBEL, M. Investigation of an aerosol challenge model as alternative to the intracerebral mouse protection test for potency assay of whole cell pertussis vaccine. **Biologicals**, v.28, p. 241-246, 2000b.

CAPIAU, C.; POOLMAN, J.; HOET, B.; BOGAERTS, H.; ANDRE, F. Development and clinical testing of multivalent vaccines based on a diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine: difficulties encountered and lessons learned. **Vaccine**, v. 21, p. 2273-87, 2003.

CDC -CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. [ON LINE] 12 de agosto de 2003. Disponível em : <[http:// www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)>

CHABBY, R. & CAROFF, M. Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis*. In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**, 1988 Ed. A. C. Wardlaw and R. Parton, p. 247-266, 1988.

CHERRY, J.D. The controversy about pertussis vaccine. In: **Clinical Topics in Infection Diseases**. V. 7, New York, 1986.

CHERRY, J.D. & OLIN P. Commentaries. **Pediatrics**, v. 104, nº 6, p. 1381-1384, 1999.

CORBEL, M.J.; XING, D.K.L.; BOLGIANO, B.; HOCKLEY, D.J. Approaches to the control of acellular pertussis vaccines. **Biologicals**, v.27, p.133-141, 1999a.

CORBEL, M.J.; XING, D.K.L.; KREEFTENBERG J.G. Informal Consultation with Manufacturers and WHO Ad Hoc Working Group on Mouse Protection Models for Models for Acellular Pertussis Vaccines. **Biologicals**, v.27, p.189-193, 1999b.

COUTTE, L.; ALONSO, S.; REVENEAU, N. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 6, p. 735-42, 2003.

DENOEL, P.; CARLETTI, G.; VEITCH, K. Effects of adsorption of acellular pertussis antigens onto different aluminium salts on the protective activity in an intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. **Vaccine**, v. 20, p. 2551-2555, 2002.

DUCLOS, P. & OLIVÉ, J. M. Invited commentary: Pertussis, a forgotten killer. **American Journal of Epidemiology**, v.155, p. 897-898, 2002.

FEIGIN, R. D.; CHERRY, J. D. Pertussis. In: **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. Vol. I, ed. 2, W. B. Saunders, Philadelphia, 1987.

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE — [ON LINE].12 DE AGOSTO DE 2003. Disponível em: <<http://www.funasa.gov>>

FURMAN, B.L.; SIDEY, F.M.; SMITH, M. Metabolic Disturbances Produced By pertussis toxin. In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**, 1988 Ed. A. C. Wardlaw and R. Parton, p.147-167, 1988.

GOLDMAN, W. E. Tracheal Cytotoxin of *Bordetella pertussis* In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**, 1988 Ed.A. C. Wardlaw and R. Parton, p.231-245, 1988.

GRANOFF, D.M. Correlates of clinical performance of acellular pertussis vaccines: implications for development of DtaP vaccines. **Biologicals**, v. 27, p. 87-88, 1999.

GRANT, C.C. & CHERRY, J.D. Keeping pace with the Elusive *Bordetella Pertussis*. **Journal of Infection**, v.44, p. 7-12, 2002.

GUIISO, N. Whooping cough: agents and natural immunity. **Medicine et Maladies Infectieuses**., v.31, p.29S-38S, Supl., 2001.

GUIISO, N.; CAPIAU, C.; CARLETTI, G.; POOLMAN, J.; HAUSER, P. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. **Vaccine**, v.17, p. 2366-76, 1999a.

GUIISO, N.; EUDE, C. B.; THIBERGE, S.; CARLETTI, G. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II Sequence variation and protection induced by tricomponent acellular vaccine. **Vaccine**, v.7, p. 2651-2660, 1999b.

HAUSER, P.; SIMOEN, E.; CAPIAU, C.; COMBERBACH, M.; DESMONS, P.; VEENSTRA, S.; SLAOUI, M. Evaluation of protection conferred by several acellular vaccines in intranasal model of *B. pertussis* infection. **Biologicals**, v.27, p.163, 1999.

HERONT, I.; CHEN, F. M.; FUSCO, J. DtaP vaccines from north American vaccine (NAVA): composition and critical parameters. **Biologicals**, v.27, p.91-96, 1999.

HEWLETT, E.L. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16(4) supplement 1, p. 78-84, 1997.

HORTON, D.P.Q.; DIAS, W.O.; LIBERMAN, C. Coqueluche: procura-se outra vacina. **Ciência Hoje**, v.9, p.57, 1989.

ISHIBASHI, Y. & NISHIKAWA, A. *Bordetella pertussis* infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin. **Microbiological Pathogenesis**, v.33, p. 115-125, 2002.

JADHAV, S.S. & GAIROLA, S. Composition of acellular pertussis and combination vaccines: a general review. **Biologicals**, v.27, p.105-110, 1999.

JEFFERSON, T.; RUDIM, M.; DIPIETRANTONJ, C. Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. **Vaccine**, v. 21, p.2003-14, 2003.

KEJA, K.; CHAN, C.; BRENNER, E. *et al.* Effectiveness of the Expanded Programme on Immunization. **World Health Statistics**. V. 39, p.161, 1976.

KENDRICK, P.; ELDERING G.; DIXON M.K. Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine: a comparative series using intracerebral route for challenge. **American Journal Public Health**. v.37, p.803-10, 1947.

KÖNIK, C.H.W.; HALPERING, S.; RIFFELMANN, M.; GUIISO, N. Pertussis of adults and infants. **Infectious Diseases**, v.2, p. 744-750, 2002.

LOCHT, C.; MIELCAREK, N.; RIVEAU G. Homologous and heterologous protection after single intranasal administration for live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*. **Inserm U167 and Inserm U447**. Pasteur Institute of Lille – 1998.

LUKER, E. K.; TYLER, A. N.; MARSHALL, G. R.; GOLDMAN, W. E. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in Pertussis. **Molecular Microbiology**, v.16, n.4, p.733-743, 1995.

MADSEN, T. Vaccination against whooping cough. **JAMA**, v. 10, p.187, 1933.

MAHON, B.P.; BRADY, M.T.; MILLS, K.H.G. Protection against *Bordetella pertussis* in mice in the absence of detectable circulation antibody: implications for long-term immunity in children. **The Journal of Infection Diseases**, v. 181, p. 2087-2091, 2000.

MANCLARK , C. R. & COWELL, J.L. Pertussis In: **Bacterial Vaccine**. Ed. René Germanier. Suíça. p. 69 a 105, 1984.

MASTRANTONIO, P.; CERQUETTI, M.; CARDINES, R. *et al.* Immunogenicity issues in quality control of the new acellular pertussis vaccine. **Biologicals**, v. 27, p. 119-21, 1999.

MILLER, E. Progress toward a new pertussis vaccine. Br.Méd. J. v. 228, p1348-1986. In: **Imunizações**. 3º Edição. Ed. Sarvier. São Paulo. p. 43-54, 1991.

MILLER, E. Overview of recent clinical trials of acellular pertussis vaccines. **Biologicals**, v.27, p. 79-86, 1999.

MILLS, K.H.G; BARNARD, A.; WATKINS, J.; REDHEAD, K. Cell mediate immunity to *Bordetella pertussis*: role of th1 cells in bacterial clearance in a

murine respiratory infection model. **Infection and Immunity**, v.61, p.399-410, 1993.

MILLS, K.H.G; RYAN, M.; RYAN, E.; MAHON, B.P. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. **Infection and Immunity**, v.66, p.594-610, 1998.

MILLS, K.H.G; RYAN, M.; McGUIRK, P.; GRIFFIN F.; MURPHY, G.; MAHON, B. The immunology of *Bordetella pertussis* infection. **Biologicals**, v.27, p. 77, 1999.

MILSTIEN, J.; MUNIRA, S. L.; McKINNEY, S.L. Issues in selection of DTwP-based combination vaccines. **Vaccine**, v.21, p. 1658-1664, 2003.

MOBBERLEY-SCHUMAN, P.S.; CONNELLY, B.; WEISS, A.A. Phagocytosis of *Bordetella pertussis* incubated with convalescent serum. **Journal of Infectious Disease**, v.187, p. 1646-53, 2003.

MULLER, A. S.; LEEUWENBURG, J.; PRATT, D.S. Epidemiology and control of pertussis. **Tropical Doctor**, p. 17:182, 1987.

NJAMKEPO, E.; RIMLINGER, F.; THIBERGE S.; GUIISO N. Thirty-five years' experience with whole-cell pertussis vaccine in France: vaccine strains analysis and immunogenicity. **Vaccine**, v.20, p. 1290-1294, 2002.

PARTON, R. Review of the Biology of *Bordetella pertussis*. **Biologicals**. v.27, p.71-76, 1999.

PRESTON, N. W. Pertussis Today In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**, 1988 Ed. A. C. Wardlaw and R. Parton, Inglaterra. p. 1-15, 1988.

PRÉZIOSI, M.P. & HALLORAN, M.E. Effects of pertussis vaccination on transmission: vaccine efficacy for infectiousness. **Vaccine**, v.21, p. 1853-61, 2003.

RODUIT, C.; BOZZOTI, P.; MIELCAREK, N. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy against *Bordetella pertussis* in a murine model: evidence for early control of Pertussis. **Infection and Immunity**, v.70, p.3521-3528, 2002.

ROMANUS, V.; JONSELL, R.; BERGGWIST, S. Pertussis in Sweden after cessation of general immunization in 1979. **Pediatric Infectious Disease**, v.6, p.364, 1987.

SATO, Y. & SATO, H. Animals models of pertussis In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**. Ed. A. C. Wardlaw and R. Parton, Inglaterra, p. 309-326, 1988.

STAINER, D.W.; SCHOLTE, M.J. A simple chemically defined medium for the production of Phase I *Bordetella pertussis* . **Journal General Microbiology**. V.63, p.211-20, 1971.

STAINER, D. W. Growth of *Bordetella pertussis* In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**. Ed. A. C. Wardlaw and R. Parton, 1988 Inglaterra, p.1933, 1988.

STANDFAST, A. F. B. The comparison between field trials and mouse protection tests against Intranasal and intracerebral challenges with *Bordetella pertussis*. **Immunology**, v.2, p.135-143, 1958.

TUOMANEN, E. *Bordetella pertussis* adhesin. In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**, 1988 Ed.A. C. Wardlaw and R. Parton, Inglaterra, p. 75-91, 1988.

VANDEBRIEL, R.J.; HELLWIG, S.M.M.; VERMEULEN, J.P. *et al.* Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. **Microbiological Pathogenesis**, v.35, p. 19-29, 2003.

VAN DEN BERG, B.M. Protection and humoral immune response against *Bordetella pertussis* infection in mice immunized with acellular pertussis vaccines and a whole-cell pertussis vaccine. **Vaccine**, v.19, p.1018-1128, 2001.

WALKER, E. Clinical Aspects of pertussis today In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**. Ed. A. C. Wardlaw and R. Parton, Inglaterra, p. 273-281,1988.

WARDLAW, A. C. & PARTON, R. The host parasite Relationship in Pertussis In: **Pathogenesis and Immunity in Pertussis**. Ed. A. C. Wardlaw and R. Parton, Inglaterra, p.327-347,1988.

WATANABE, M.; KOMATSU, E.; SATO, T.; MASAACKI, N. Evaluation of efficacy in terms of antibody levels and cell-mediated immunity of acellular pertussis vaccine in a murine model of respiratory infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.33, p. 219-225, 2002a.

WATANABE, M.; KOMATSU, E.; SATO, T.; MASAACKI, N. *et al.* Efficacy of Pertussis componentes in an acellular vaccine, as assessed in a murine model of respiratory infection and a murine intracerebral challenge model. **Vaccine**, v.20, p.1429-1434, 2002b.

WATANABE, M. & MASAACKI, N. Reciprocal protective immunity against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection. **Infection and Immunity**, v.69, p.6981-6986, 2001.

WHO, Requeriments for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. **International Requirements for Biological Substances**. World Health Organization. Technical Report Series, nº 800, p. 87-149, 1990.

WHO, Guidelines for the production and control of the acellular pertussis component of monovalent or combined vaccines. **Technical Reports Series**, nº 878, p. 58-76, 1998.

XING, D.K.L.; DAS, R.G.; WILLIAMS, L. *et al.* An aerosol challenge model of *Bordetella pertussis* infection as a potential bioassay for acellular pertussis vaccines. **Vaccine**, v.17, p. 565-76, 1999.