

Do Acidente de Lubeck ao Advento do BCG Recombinante com maior poder protetor e polivalente

José Rosemberg¹

À memoria de Arlindo de Assis pioneiro da vacinação BCG à qual consagrou sua vida com suas pesquisas e incentivando sua aplicação
1 - Professor titular de Tisiologia e Pneumologia de Fac. de Clínicas Médicas de Sorocaba da P.U.C. - São Paulo

Pulmão-RJ. Vol. 4 - nº 1; 29 a 46, 1994

Nenhuma vacina teve trajetória tão tortuosa e controvertida como o BCG (bacilo de Calmette e Guerin) continuando até nos dias de hoje questionado quanto ao seu papel na profilaxia da tuberculose.

Decorridos mais de 70 anos da primeira criança vacinada, abrem-se perspectivas de reforço de sua capacidade imunizante graças às técnicas da biologia molecular e de transformá-lo em veículo de vacinas contra infecções bacterianas e víroíticas, tornando-se a primeira vacina polivalente universal.

Nascimento da Vacinação BCG

Calmette e Guerin visando obter suspensões não grumosas do bacilo de Koch que se prestasse para reações imunológicas de aglutinação, cultivaram o *Mycobacterium bovis* em meio de batata glicerinada a 5%, adicionada de bile de boi devido à propriedade desta de dispersar os germes obtendo-se suspensões homogêneas. Com 230 passagens quinzenais durante 13 anos, esse germe inicialmente virulento perdeu o poder patogênico tornando-se inócuo para os novilhos, cobaias e demais animais de experimentação. Sofreu um mutacionismo, porém

manteve as qualidades antigenicas conferindo proteção contra o *Micobacterium tuberculosis* (¹¹). A fixidez da avirulência foi definitivamente proclamada em 1913 (¹²). Em 1921 foi vacinada a primeira criança por Weil Hallé, na França (⁷⁶). Em 1928, a Comissão de Peritos da então Liga das Nações confirmou a inocuidade do BCG para os animais e para o homem (⁵⁹). No início da década dos anos 30 o BCG já estava difundido em muitos países, sendo todas as cepas fornecidas pelo Instituto Pasteur (^{9, 10}).

Em 1925 uma cepa BCG fornecida por Calmette, foi trazida para o Brasil por um médico uruguai, a qual recebeu o nome deste - "amostra BCG Moreaus". Foi cultivada e estudada por Arlindo de Assis na Fundação Ataupiho de Paiva. Aplicada pela via oral até 1973 e depois intradérmica, essa cepa passou a ser denominar "BCG Rio de Janeiro" - com ela se processando até hoje a vacinação antituberculosa no país.

Acidente de Lubeck

Eis que em 1930 explode a dramática notícia provinda do centro de vacinação de Lubeck, tomado de perplexidade e de pânico todo o mundo. De 251 crianças vacinadas por via oral, nos primeiros dias de vida, 77 faleceram de tuberculose, das quais 600 autopsiadas mostrando lesões graves extensas, disseminadas. Das crianças que sobreviveram muitas desenvolveram processos crônicos; em 127 a radiologia identificou

extensos complexos primários abdominais, e em diversas com localizações traquibrônquicas. Estas últimas surgiram nas crianças cuja enfermeira para forçar a deglutição da vacina, tapou suas narinas havendo aspiração de emulsão de germes. Esse episódio passou para a história como "O Acidente de Lubeck".

Fato que logo chamou a atenção, foi a comprovação de que o Instituto Pasteur no mesmo dia que remeteu BCG para Lubeck, expediu cultura irmã para Riga onde apreciável contingente de crianças foi vacinado sem qualquer problema adverso. Contudo a vacinação BCG foi suspensa em todos os países com algumas poucas exceções como por exemplo, a França e o Brasil. Aqui, Arlindo de Assis teve a firme convicção da inocuidade da amostra de BCG, porque sua avirulência vinha sendo controlada desde o início por inoculações mensais em animais de laboratório.

Para apurar as causas do sucedido em Lubeck, o Ministério da Saúde Pública da Alemanha, designou comissão de técnicos de renome mundial em tuberculose: Schumann patologista; Kleischmidt, pediatra; Bruno Lange e Ludwig Lange, bacteriologistas. Depois de anos de investigação ficou comprovado que no laboratório central de Lubeck cometeu-se terrível engano. No final de 1929 havia sido, a este remetida uma cultura de "bacilos tuberculose variedade hominis" rotulada H29, isolada

de criança doente, de Kiel. Cultivada na mesma estufa onde havia culturas de BCG, houve troca de rótulos. As emulsões vacínicas, então preparadas continham uma mistura de aproximadamente dois terços de BCG e um terço de bacilos tuberculosos H29. Os germes recuperados das lesões dos mais diversos órgãos de todas as crianças autopsiadas foram exaustivamente estudados nos seus caracteres culturais, bioquímicos, provas sorológicas, patogenicidade nos animais, além de outros testes. Todos os resultados convergiram sem discrepâncias como sendo bacilos de Koch variedade humana (o BCG provém de bacilo tuberculoso bovino). Dois detalhes a destacar: a patogenicidade em animais foi típica do bacilo humano, isto é, alta virulência para cobaias e dificilmente lesivo para coelhos a cepa de bacilos tuberculosos H29 de Kiel possuía uma característica rara de produzir fosforescência verde no meio de Sauton, a qual permaneceu em todas as culturas dos germes isolados das lesões das autopsias. Ao cabo de 5 anos todos os protocolos, a discussão e conclusões desta longa e trabalhosa investigação foram reunidos em alentado volume (⁶⁵). Deycke chefe do laboratório de Lubeck foi processado e condenado por negligência. A partir desse acidente, regulamentos internacionais determinam que os laboratórios que preparam a vacina BCG, em absoluto não podem se ocupar com qualquer outra micobactéria.

Não obstante o completo esclarecimento do acidente de Lubeck, dúvidas restaram por anos, inclusive quanto à possibilidade do BCG se transformar em bacilo humano, virulento, quanto albergado em "anima-

nobile". Para apurar a possibilidade de revirulentar o BCG empregaram-se os mais diversos procedimentos, todos com resultados negativos comprovando a fixidez de sua avirulência (^{9, 10}). Afinal o I Congresso Mundial de BCG realizado em 1948, Paris, com 300 cientistas de 35 nações (⁵⁷) face à vastíssima documentação existente, conclui pela absoluta inocuidade do BCG para a espécie humana e que a cepa originária do Instituto Pasteur é estável com poder protetor antituberculose.

Como se infere, foi longa a caminhada para provar e convencer a todos da inocuidade do BCG, sobretudo porque os meios de pesquisa então existentes eram de realização demorada fornecendo muitas vezes respostas ambíguas. Cabe aqui indagar de quanto tempo se gastaria hoje para apurar a verdade sobre o Acidente de Lubeck. Com o advento da biologia molecular, uma resposta clara e decisiva seria obtida em poucas horas. Bastaria submeter os germes das culturas e os isolados das lesões das crianças, à técnica FINGER-PRINT.

Fingerprint (RFLP), Identificador Rápido de Cepas e Subcepas de Micobactérias

O fingerprint facilita identificar rapidamente o padrão genético de cepas e subcepas bacterianas.

Até recentemente a tipagem genética de bactérias era demorada e incompleta. Os métodos sorológicos não diferenciam as micobactérias e menos ainda as do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A tipagem por meio de micobacteriófagos é de alcance limitado e de restrito valor epidemiológico, por-

que poucos fagos são reconhecidos (^{18, 26}). Além do mais são procedimentos para os quais poucos laboratórios estão aparelhados.

Havia portanto enorme necessidade de criar um método rápido e simples para reconhecer as cepas e subtipos do *M. tuberculosis* e isso foi facultado graças à biologia molecular que proporcionou técnica segura, o RFLP, que detecta variabilidade genética (³²). Diversas investigações têm identificado elementos do DNA do *M. tuberculosis* que estão presentes em múltiplas cópias por genoma, os quais mostram padrões de fragmentos polimórficos. Para identificá-los a técnica RFLP (restriction fragment length polymorphism) (⁷⁵) revela-se útil e de fácil execução. A técnica baseia-se na existência do "sítios de restrição" do DNA que são pontos específicos onde este pode ser fragmentado por meio de enzimas chamadas "endonucleases de restrição" as quais reconhecem os referidos pontos, para cortá-los. Pode-se detectar a variabilidade genética identificando os fragmentos que são de tamanhos diversos no genoma da micobactéria, mas contém seqüências de nucleotídeos que lhes são específicas (³²). Esses elementos são móveis variando de localização no genoma mas mantém constante a inserção sequencial de nucleotídeos. A técnica Fingerprint é usada para identificar esses elementos que podem estar presentes em diversas cópias por genoma, as quais mostram um padrão de associação ou agrupamento de extremo polimorfismo, mas geneticamente específico para determinada cepa de micobactéria (^{24, 91}). A técnica portanto faz a tipagem genética, pois as mencionadas inserções sequenciais

O seu produto
precisa de um
especialista?

Nós temos vários a seu alcance.

A ALDEIA edita para Pneumologistas, Mastologistas/
Ginecologistas/ Oncologistas, DST/ urologistas as
seguintes publicações:

Pulmão-RJ

Revista Brasileira de Mastologia

Jornal Brasileiro de DST

Nós não temos dúvida; com as nossas revistas de
circulação nacional, seu produto irá até o especialista.
Informe-se mais.

ALDEIA Editora e Gráfica Ltda
Tel.: (021) 280.2639.

A S M A :

N

ÃO SE TEM UMA
IDÉIA PRECISA DE
SUA ORIGEM.
MAS, PELO MENOS,
TEMOS DUAS
MANEIRAS DE
TRATÁ-LA.

Farmalab

chiesl



- Previne a inflamação e a hiperreatividade brônquica.
- Aumenta o limiar da reação alérgica.
- Possibilita a associação com a Beclometasona por via tópica.
- Isento de efeitos colaterais sobre o SNC e cardio-vascular.
- Comodidade posológica: apenas duas doses diárias.
- Primeira escolha em tratamento pediátrico.
- Não apresenta toxicidade inerente à substância ativa.

Dipropionato de Beclometasona - 250 mcg



CLENIL Forte

- Único produto com apresentação de 250 mcg de Beclometasona por erogação.
- Maior comodidade posológica: apenas duas administrações ao dia.
- Menor custo/tratamento em relação aos similares de baixa dosagem.
- Ação antiinflamatória e antialérgica tópica amplamente reconhecida a nível mundial.
- Inibição progressiva do broncoespasmo.
- Redução do edema e da hipersecreção (início de ação entre 3 a 7 dias).
- Virtual ausência de efeitos colaterais sistêmicos.



Tratamento das infecções das vias respiratórias.

LEVES



Cipro 250 mg
1 comprimido a cada 12 horas



Cipro 500 mg
1 comprimido a cada 12 horas

SEVERAS



Terapia sequencial:
Cipro 200 mg
1 frasco a cada 12 horas
ou
Cipro 500 mg
1 comprimido a cada 12 horas

Composição: Cipro 250 e 500 mg = 1 comprimido revestido contém 291,5 e 583 mg de cloridrato de ciprofloxacina H_2O , equivalente a 250 e 500 mg de ciprofloxacina. Cipro solução para infusão - 100 ml de solução contém 200 mg de ciprofloxacina.

Indicações: Infecções do trato respiratório, ouvido médio, sinusite, oticárias, rins e trato urinário, órgãos genitais (incluindo gonorréia), abdômen (por ex.: infecções bacterianas do trato gastrintestinal, trato biliar, peritonite) pele e tecidos moles, ossos e articulações, além de septicemia, infecções em pacientes com imunodeficiência, descontaminação seletiva.

Contra-Indicações: não deve ser administrado a pessoas com hipersensibilidade a ciprofloxacina ou a derivados quinolônicos. Não há dados disponíveis sobre seu uso no período de gestação e lactação.

Precavações: Cipro deve ser utilizado com cautela em pacientes com idade avançada, epilepticos e em pacientes com lesões previas do sistema nervoso central.

Reações adversas: reações do trato gastrintestinal, do sistema nervoso central, de hipersensibilidade, musculoesqueléticas, alterações dos elementos do sangue e dos parâmetros laboratoriais. Muito raramente: colite pseudo-membranosa, convulsões, reações psicóticas e outras, reações anafiláticas incluindo choque. Síndrome de Stevens-Johnson, nefrite intersticial, alterações hepáticas inclusive necrose hepatocelular, fotossensibilidade, alterações da função renal inclusive insuficiência renal transitoria e diminuição transitoria da acuidade auditiva. A capacidade para dirigir ou operar máquinas pode ser comprometida. Local: febre.

Interação medicamentosa - Oral: a administração concomitante de anti-acídios reduz a absorção de Cipro. Portanto, Cipro deve ser administrado 1 a 2 horas antes do antiácido ou pelo menos 4 horas depois.

Oral/EV: a administração simultânea de Cipro e teofila pode aumentar a concentração sérica de teofila. Aumento transitório da creatinina sérica foi observado na administração associada a ciclosporina.

Cipro associado a alguns anti-inflamatórios não esteroides: pode causar convulsões.

Possologias: dependendo da indicação e severidade da infecção 250 e 500 mg duas vezes ao dia. No caso de clearance de creatinina inferior a 20 ml/min, deve-se administrar metade da dose diária recomendada em uma única tomada ou reparti-la em duas tomadas. Os casos de gonorréia aguda podem ser tratados com dose única de 250 mg.

Apresentações: na forma de comprimidos nas dosagens de 250 e 500 mg de ciprofloxacina em caixas com frascos de 6 e 14 comprimidos e em solução para infusão, na dosagem de 0,2% de ciprofloxacina, em frascos com 100 ml.

Para maiores informações, consulte a bula ou a Bayer do Brasil S.A. - Produtos Farmacêuticos - Rua Domingos Jorge, 1000 - São Paulo - SP.

Produtos Farmacêuticos

Bayer



servem como marcadores taxomônicos, como é útil também para o diagnóstico bacteriológico, pesquisando esses elementos específicos em materiais clínicos.

Já estão sequenciados vários desses elementos, específicos de determinadas bactérias. Nas micobactérias poucos estão identificados. Porém conseguiu-se sequenciar um, com 263 pares de bases nucleotideas, específico do Complexo *M. Tuberculosis*, que recebeu sigla IS 6110, pertencente à grande família de inserções sequenciais denominada IS3. Quadro 1 (40, 48, 52, 66, 70 e 71).

Outra seqüência, IS 986 semelhante à IS 6110 foi também isolada (40, 66). As duas são similares diferindo apenas por 3 bases nucleotídeas (52) e são altamente específicas do Complexo M. tuberculosis, como ficou demonstrado pela análise de muitas cepas de moco-bactérias. (40, 66, 70, 71).

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* é constituído pelo *M. tuberculosis* (que é o tipo humano), *M. bovis*, *M. africanum* (que é do tipo humano mas tem algumas características de *M. bovis*) *M. bovis BCG* e há tendência de incluir o *M. microti* nesse Complexo, pela similaridade antigênica (6). Nas micobactérias

desse Complexo os elementos IS 6110 e IS 986 estão em várias cópias ao longo do genoma variando de duas a vinte (⁴⁰) fazendo exceção o BCG que apenas tem uma (³⁹).

A técnica de identificação do padrão genético das cepas pelo fingerprint utiliza essencialmente o método Southern blot (40, 66) * a) digestão do DNA da micobactéria por endonuclease de restrição, sendo os mais empregados os que levam a sigla Pvul e PsTI. b) fragmentos do DNA são dispersados por eletroforese em gel agarose. c) transferência para papel nitrocelulose. d) inclusão de sonda sintetizada oligonucleotida da inserção

QUADRO 1
ELEMENTO DE INSERÇÃO NO DNA - IS 6110
ESPECÍFICO DO COMPLEXO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
SEQÜENCIA DOS NUCLEOTÍDEOS

DR. INV. REP.

INV. REP.

DR.

FONTE: Thierry D. Cave MD, Eisenach KD. 1990 referência 71.

sequencial IS 6110 ou IS 986, marcada com P32 ou digoxigenina; havendo homologia da sonda com os fragmentos, processa-se a hibridização; e) os fragmentos são detectados por autoradiografia no caso da sonda marcada com P32 ou com filme radiológico comum, se a sonda foi marcada com digoxigenina; f) conforme a técnica do RFLP e para detecção de bacilos em material clínico, emprega-se a PCR (reação em cadeia da polimerase. Há no comércio sondas sintetizadas oligonucleotídeas, polimerase, kits e aparelhos tornando os procedimentos praticamente automáticos. No quadro 2 há vários exemplos de fingerprint.

A análise do RFLP mostra padrões diferentes no número e disposição dos elementos sequenciais conforme a micobactéria e as cepas e subcepas de uma mesma micobactéria. A localização dos elementos no cromossomo difere de cepa a cepa (91). Isso foi confirmado analizando dezenas de cepas do *M. tuberculosis* (40). O extremo poliformismo desses elementos sequenciais IS 6110 e IS 986 reforça a suposição de que são elementos de inserção funcional do DNA que pode ser inserir em novos sítios do genoma. Parece paradoxal o uso de elementos instáveis movendo-se frequentemente dentro do genoma, para tipificar geneticamente a bactéria. É que o elemento IS é

estável quanto ao arranjo da seqüência de bases nucleotídeas (31). Em síntese, a disposição dos elementos no DNA é variável, porém, a seqüência de suas bases nucleotídeas é imutável e é esta que fornece o padrão RFLP, ou seja, a identidade de cada cepa.

A estabilidade do elemento IS foi testada por diversas maneiras (40, 52, 66, 70, 71): passagens em série de germes por longo tempo em diferentes meios de cultura; adição de drogas antituberculosas tornando os germes resistentes (quadro 2); manutenção de germes dentro de macrofagos cultivados *in vitro*. mesma estabilidade dos fragmentos de

QUADRO 2
ESTABILIDADE DO FINGERPRINT DO DNA
DE CEPAS DO MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS E DO BCG



- Fingerprint copiados do artigo referência 66.

A seis cepas do *M. Tuberculosis*: colunas (1, 2) (3, 4) (5, 6) (7, 8) (9, 10) (11, 12).

Duas cepas de BCG: colunas (13, 14) (15, 16). Em cada par de colunas os dois fingerprints são respectivamente antes e depois de passagens em série em meio de cultura durante 6 meses.

B *M. Tuberculosis*: coluna 1 cepa sensível às drogas, colunas 2, 3, 4 e 5 semana cepa resistente respectivamente à rinfamicina, isoniazida, etambutol e estreptomicina - BCG: colunas 6 e 7 mesma cepa respectivamente sensível e resistente às drogas - Bacilos isolados de um paciente. colunas 8 e 9, respectivamente, antes da quimioterapia e na recaída após o tratamento.

- O padrão do fingerprint de uma cepa permanece estável, imutável em qualquer circunstância.
- No *M. tuberculosis* há diversas cópias de elemento IS do DNA. No BCG há somente uma cópia do elemento IS.
- Os números à esquerda do fingerprints, referem-se ao tamanho dos fragmentos do DNA, em kolobases.

DNA, sem qualquer rearranjo, se verifica nos germes albergados por vários anos no organismo humano. Bacilos isolados de recaídas de tuberculose em pacientes sem e com tratamento, mesmo que tenham adquirido resistência às drogas, inclusive poliresistência, mantém o mesmo padrão fingerprint. (quadro 2).

Portanto a técnica RFLP pode demonstrar nos casos de recidiva tuberculosa de pacientes sem e com tratamento, se houve reativação endógena ou reinfecção exógena (novo contágio), porque no primeiro caso o padrão do fingerprint é idêntico aos dos bacilos isolados anteriormente e no segundo, aquele é diferente. Compreende-se como a técnica é útil nos estudos epidemiológicos (34) de importância acrescida no estabelecimento da origem dos bacilos nos indivíduos HIV positivos assintomáticos ou em fase de SIDA, e na identificação da fonte causadora de microepidemias tuberculosas em países que estão em fases de eliminação da doença. Para os estudos epidemiológicos é necessário formar um banco de padrões de fingerprint, o que facilita a rápida identificação da cepa analisada.

Considerando que a inserção sequencial IS 6110 é somente encontrada nas micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, esse elemento é de grande valia para o diagnóstico bacteriológico rápido nos espécimes clínicos, como escarro, lavado gástrico, puz, derrames pleurais, liquor, urina, sangue etc. (25, 40, 70). O procedimento é o da hibridação *in situ*, ampliação do segmento hibridado pela PCR e identificação pelo Southern blot.

Continuam os estudos para isolar elemento IS de outras micobactérias. Já se identificaram os elementos, IS 900 específico do *M. paratuberculosis*, (37) e IS 610 do *M. fortuitum* (39). Estão adiantadas as investigações no *M. avium* (40) e *M. smegmatis* (39). O conhecimento dos elementos específicos das micobactérias atípicas proporcionará notável avanço no diagnóstico rápido das micobacterioses atípicas.

Fingerprint do BCG

Em contraste com as cepas das demais bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* nas quais há múltiplas cópias em número variável dos elementos IS, altamente polimórficos quanto à integração no genoma, o BCG distingue-se por possuir apenas um só elemento inserido sempre no mesmo sitio do cromossomo. Esse elemento recentemente sequenciado é o IS 987 com 386 pares de bases, virtualmente idêntico aos elementos IS 6110 e IS 986 do *M. tuberculosis* diferindo apenas por dois aminoácidos (39). Esse elemento único, está sempre no fragmento Pvull de 1.7 kb, no mesmo sitio do genoma (14, 39, 40) quadro 2. As cepas do *M. bovis* BCG cultivadas por anos nos diversos laboratórios adquiriram alguns caracteres fenotípicos que as diferenciam uma das outras: têm porém duas características em comum: avirulência e uma só cópia do elemento IS 987 implantado sempre na mesma região do cromossomo (39). Essa singularidade e estabilidade topográfica no genoma não se altera com passagens em série do BCG nos diferentes meios de cultura, com a resistência às drogas antituberculosas, adquiridas *in vitro* pela incorporação destas às culturas, assim como persiste nos

germes recuperados dos tecidos dos indivíduos vacinados (39, 66).

A estabilidade do elemento de inserção IS 987 na topografia do cromossomo, sugere que este pode ter anulado a expressão do gene responsável ou co-responsável pela virulência do *M. bovis* localizado no mesmo sitio. Especula-se se o mutacionismo ocorrido neste bacilo, gerando o BCG avirulento, pode ser explicado por essa condição. Investigações em curso talvez possam dar uma resposta a essa suposição (47).

Em síntese se ressalta que nas cepas do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* os elementos de inserção IS tem cópias múltiplas e são extremamente móveis dentro do genoma e no BCG ao contrário o elemento é único, sem cópias e está fixo sempre no mesmo sitio. Isso proporciona a este último um fingerprint de padrão genético característico muito distinto das outras micobactérias. Quadro 2.

Pelo exposto no item anterior e neste, depreende-se que se nos anos 30 já existisse o avanço da biologia molecular, a técnica do fingerprint teria demonstrado instantânea e cabalmente que nas emulsões vacinícias do laboratório de Lubeck, além do BCG havia germes com padrão genético diferente. Ainda mais teria demonstrado que o padrão RFLP de bacilos das emulsões e dos bacilos isolados das lesões das crianças vitimadas, era idêntico não só à do *M. tuberculosis*, mas também idêntico à cepa de *M. Tuberculosis* H29 remetido de Kiel ao laboratório. Para apurar o ocorrido no chamado acidente de Lubeck, em lugar das investigações morosas e muitas vezes controvertidas, que

consumiram anos para provar que recém-nascidos ingeriam bacilos tuberculosos virulentos, misturados ao BCG, o esclarecimento do erro cometido teria sido instantâneo, em 24 a 48 horas, mudando o curso da história da vacinação.

Sobre a Proteção Antituberculosa do BCG

Ao contrário dos receios iniciais da possibilidade de revirulentaçao do BCG, as cepas cultivadas nos diversos países, submetidas à subculturas em série, passaram a sofrer mutações inevitáveis. Ocorreram mudanças de alguns atributos, como caracteres morfológicos, pigmentação, velocidade de proliferação, decréscimo da capacidade sensibilizante à tuberculina, e da proteção contra a tuberculose experimental em animais, e inclusive evidência de diferença na proteção no homem.

Para prevenir esses inconvenientes abandonou-se a prática tradicional da manutenção do BCG por meio de subculturas em série, adotando-se o sistema denominado "seed lot" (80) que consiste na liofilização e sua estocagem em ampolas seladas das quais periodicamente retira-se quantidade adequada de acordo com a necessidade; o BCG é então reconstituído para o preparo da vacina a ser utilizada. Não obstante essas precauções não há duas cepas de procedência de laboratórios diferentes que sejam qualitativamente idênticas. Nesse particular a cepa Rio de Janeiro adquiriu algumas características especiais depois que passou a ser cultivada em meio Sauton com fécula de batata substituindo a asparagina que não podia ser importada durante a

guerra mundial (3). Ulteriormente um estudo comparativo de vários cepas de BCG Rio de Janeiro, Paris, Gothemburgo, Copenhaguen, Moscou, Tóquio, Londres e Praga - indicou que a primeira tem maior "virulência residual", sendo a mais ativa e é a que produz mais baixo índice de reações adversas (77). Todavia além da qualidade das cepas do BCG outros fatores intervenientes podem alterar o seu poder protetor. O programa de vacinação abarcando o continente europeu implementado pela Joint Interprise (68), evidenciou que uma mesma vacina fornece vírus diversos de proteção antituberculose, variando nos países incluídos no programa (69).

Proteção conferida pelo BCG nos ensaios controlados

Os estudos prospectivos sobre o poder protetor do BCG contra a tuberculose forneceram fundas dis-

crepâncias como ressalta dos clássicos ensaios controlados. De 1935 a 1955 foram publicados 8 destes, totalizando aproximadamente 150.000 pessoas (23, 26A, 78). Quadro 3.

De acordo com os resultados podem ser divididos em três grupos: a) Estados Unidos, Índios até 20 anos de idade; Chicago, crianças até 3 meses de idade; Inglaterra, escolares de 14 a 15 e meio anos respectivamente 80%, 75% e 78% de proteção. b) Porto Rico, população de 1 a 18 anos; Alabama, Georgia, 5 e mais anos de idade; Índia, Mandanapalle, população, todas as idades, proteção respectivamente de 31%, 14% e 31%. c) Georgia escolares; Illinois escolares excepcionais, resultados totalmente nulos em ambos. Pelo menos dois fatores estão implicados nos resultados discrepantes dos 5 ensaios reunidos nos grupos b e c. Nas áreas geográficas desses inquéritos há elevada prevalência da in-

COORTES AUTORES	RESULTADOS DA VACINAÇÃO	PERÍODO DE APLICAÇÃO DO BCG	BCG - ENSAIOS CONTROLADAS		
				DURAÇÃO EM ANOS, SEGUIMENTO	PROTEÇÃO %
Índios norte-americanos 8 tribus Stein e Aronson 1953	1935-1938 0 a 20 anos			9-11	80
Chicago, crianças de áreas de alto risco Rosenthal et al. 1961	1937-1948 menores de 3 meses			12-23	75
Georgia escolares Comstock e Webster, 1969	1947-8 6 a 17 anos			20	nenhuma
Illinois, escolares retardados mentais Bettag et al. 1964	1947-1949 adolescentes e jovens adultos			12	nenhuma
Porto Rico, população geral Palmer et al 1958	1949-1951 1 a 18 anos			5 e meio - 7 e meio média 6,3	31
Georgia, Alabama, população geral Comstock e Palmer 1966	1950 maiores de cinco anos			14	14
Grã-Bretanha, escolares British Medical Research Council 1972	1959 a 1952 14 a 15 e meio anos			15	78
Índia, Mandanapalle, população rural. Fridmodt-Moller et al. 1968	1950-1955 todas as idades			9-14 média 12,3	31
Índia, Sul Chingleput população geral. Conselho Indu de Pesquisas Médicas e OMS.	1968-1971 todas as idades mais de 14 anos menos de 14 anos			7 e meio 15 15	nenhuma nenhuma 17%

O quadro está adaptado da referência 78. Os 8 primeiros estudos constam da referência 26-A. O estudo de Chingleput é das referências 73, 74

fecção por micobactérias atípicas. Estas produzem imunidade cruzada para a tuberculose, embora inferior à do BCG (23). Demonstrou-se que a imunidade conferida por esse último em animais infectadas experimentalmente com micobactérias atípicas, não sobrepassa o nível conferido quando é administrado sozinho (53). Disso decorre diminuição da margem de proteção da vacina (16, 23, 53). O outro fator é a baixa potência da cepa vacinal preparada por um mesmo laboratório nos estudos dos Estados Unidos e de Porto Rico; essa fraca vacina ainda foi mais inferiorizada pela técnica de vacinação empregada, a multipuntura, menos eficiente que a intradérmica (23).

No final dos anos 60, a Organização Mundial de Saúde e o Conselho Indu de Pesquisas Médicas iniciaram um estudo controlado sobre o BCG na área de Chingleput, por ser onde se registram as mais altas prevalências de infecção e morbidade tuberculosa da Índia e porque não existia ali nenhum programa de vacinação. Aproximadamente 260.000 habitantes (100.000 a mais que os oito estudos clássicos reunidos) foram incluídos no ensaio controlado, somando os que receberam o BCG ou placebo. Quadro 3. O primeiro relatório com 7 e meio anos de acompanhamento, para grande decepção, revelou resultados nulos (28, 74, 79, 82, 83). A última avaliação com 15 anos de acompanhamento (73) mostrou peculiaridades inesperadas: acima dos 15 anos de idade continuou sem qualquer indício de proteção tuberculosa todavia abaixo dos 15 anos de idade as causas se passaram diferentes; estranhamente depois de um período de 5 anos com resultados nulos, houve 45% de pro-

teção nos 5 anos seguintes, caindo para 16% no último período de 5 anos. Média de proteção 17%, o que é um índice baixo. Da análise das peculiaridades encontradas em Chingleput destacam-se: as características epidemiológicas da tuberculose fogem dos padrões gerais e podem ter concorrido para a anulação do efeito da vacina; o *M. tuberculosis* graxando na área é de muito baixa virulência para a cobaia, e por isso e outros atributos está sendo classificado como *M. tuberculosis* variedade Sul-Índia (56, 82); poderá esse germe elevar a imunidade dos infectados que não desenvolvem tuberculose-doença? Em geral decorre um período de tempo inusitado entre a viragem tubercu-línica e as manifestações clínicas. A maioria dos casos de tuberculose, acima dos 30 anos, são por reativação endogena, sobre os quais o BCG não exerce efeito. O estudo não foi planejado para apurar a proteção do BCG nas crianças de baixa idade, mormente em relação à incidência de meningite e de formas hematogênicas como a miliar, contra as quais o BCG oferece maior índice de proteção, na área de estudo há prevalência elevada de infecção de micobactérias atípicas e a maioria da população é positiva à sensitina do Complexo *M. avium* intracelular que como foi discutido para outros estudos controlados, contribuem para diminuir a margem de proteção do BCG; os fatores étnicos e de desnutrição não influiram nos resultados (28, 73); as vacinas dinamarquesas e do Instituto Pasteur de Paris, usadas no estudo, eram potentes e desenvolveram o mesmo nível de proteção em animais infectados experimentalmente com o *M. tuberculosis* como pelo *M. tuberculosis* variedade Sul-Índia (28,

38, 79). É importante informar que com essas mesmas cepas de BCG, nessa mesma região de Chingleput, consignou-se proteção antileprótica de 24% a 30% (8, 28, 73).

Da análise dos ensaios controlados há forte evidência de que a falta ou diminuição do efeito protetor do BCG mesmo que a vacina empregada seja potente, deve ser debatida a intervenção dos fatores epidemiológicos e ambientais.

Deve-se, pois, buscar identificar essas causas que obstaculizam a atividade da vacina para saná-las quando existirem. Pesquisas nessa direção, inclusive na área de Chingleput, são recomendadas pela O.M.S. e estão em curso (82, 83).

Proteção do BCG nas crianças de Baixa Idade. Política de Vacinação

É preciso deixar claro que o poder protetor do BCG nas crianças de baixa idade, até 4 anos, não foi invalidado por qualquer dos estudos prospectivos. Ao contrário, o de Chicago que concentrou a pesquisa em lactentes até 3 meses de idade, consignou 75% de proteção antibacteriana, apesar de ter usado a técnica de multipunturas, inferior à intradérmica.

É ponto pacífico, inclusive para os estudos retrospectivos, que o BCG exerce forte poder protetor contra as manifestações graves de primo-infecção como as disseminações hematogênicas, meningoencefalite e granuloma, mas que não impede as reativações endógenas e reinfecções exógenas nas já infectadas pelo *M. tuberculosis*. Por isso, enquanto não se conseguir estender a faixa de proteção do BCG para outros estágios tisiogenéticos, precisa-se conver-

gir as pesquisas na ação do BCG contra a primo-infecção. Em lugar dos estudos prospectivos controlados custosos e demorados, convém usar metodologias simples de avaliação rápida para medir mais aprofundadamente a proteção antituberculosa do BCG nas crianças. Procedimentos deste tipo estão sendo financiados pela Organização Mundial de Saúde. Entre estes difundem-se os métodos "caso-contato" e "caso-controle" pelos quais se estabelece dos casos de crianças comunicantes ou não de tuberculoses, portadoras de meningite ou outros processos específicos, com a presença de cicatriz vacinal, confrontando-os com testemunhas; a informação pode ser complementada com outros dados que sejam seguros. Já existem dezenas desses estudos retrospectivos dos quais alguns entre nós (^{13, 88, 89}), muitos comentados em publicações recentes (^{22, 67}). Avaliação global desses estudos surgidos até 1991, consigna, no grupo de 0 a 4 anos de idade, 52% a 100% de proteção contra a meningoencefalite e de 43% a 83% contra diversos tipos adenopáticas (⁵⁰).

Paralelamente há registros epidemiológicos demonstrativos, inclusive no Brasil, onde o número de menores de 1 ano vacinados entre 1983 e 1990 atingiu aproximadamente 33 milhões. A cobertura nacional de crianças até 4 anos de idade foi de 70%. De 1981 a 1990 a meningite tuberculosa decresceu 4.6%. O Estado de São Paulo onde a cobertura com o BCG sempre foi acima de 80% teve taxa de incidência de meningite de 1.05/100.000. De 1983 a 1990, o Estado do Rio Grande do Sul, o único a não seguir as recomendações do

Programa Nacional de Controle da Tuberculose, acusou taxa de meningite de 3,2 /100.000 que não se alterou significantemente por todo o período considerado (^{41, 58}).

Por isso a política de vacinar com BCG as crianças de baixa idade o mais precocemente possível, de preferência os recém-nascidos é recomendada aos países em desenvolvimento, estando integrada no Programa Ampliado de Imunização (PAI) (^{27, 83}). A União Internacional contra a Tuberculose e Doenças Respiratórias recentemente também fez a mesma recomendação, enfatizando que a vacinação BCG deve ser aplicada na faixa até 14 anos de idade, mesmo trabalhando com margem de 40% a 70% (⁵⁰). A O.M.S. recentemente recomendou a inclusão do BCG no programa de controle da tuberculose integrado nas ações de saúde da atenção primária (⁸⁵).

Nos países em desenvolvimento surge na atualidade ponderável motivo para intensificar ainda mais a vacinação BCG devido à epidemia do HIV, pelo risco multiplicado das crianças contraírem tuberculose. O Programa Global de AIDS da O.M.S., do PAI e a UNICEF, recomendam vacinar com BCG o mais rapidamente as crianças HIV soropositivas assintomáticas (^{33, 84}) e os filhos de mães infectadas com HIV, independente da resposta sorológica (^{33, 43, 44}). Os países desenvolvidos que atingiram o limiar da eliminação da tuberculose praticamente suspenderam a vacinação BCG. Essa política começa a ser repensada. Na Suécia a prevalência tuberculosa nas crianças subiu 6 vezes ao cabo de 15 anos após a sus-

pensão do programa de vacinação BCG (⁶¹). Nesses países onde o risco de infecção tuberculosa está aumentando estuda-se incrementar o BCG nos grupos de risco, como comunicantes de doentes com SIDA, nos imigrantes provindos de países com prevalência elevada de infecção tuberculosa, nas comunidades economicamente mais desprovidas e devido às micropidemias de tuberculose que estão se tornando mais frequentes. Em todas essas situações são as crianças as primeiras e principais vítimas seguidas dos adolescentes, que são mais receptivas ao *M. tuberculosis*, demandando proteção imunológica.

Revacinação

Os programas de vacinação BCG prevêm a revacinação como reforço da primo-infecção ou para restabelecer a imunidade quando se extinguiu. Não há dados concretos quanto ao tempo de duração da proteção conferida pelo BCG. Em cobaias vacinadas a imunidade pode sofrer enfraquecimento relativo porém persiste até a morte natural dos animais. Os estudos controlados indicam que no homem esse debilitamento seria mais lento, ao cabo de anos (^{23, 73}). Em geral níveis válidos de proteção persistem por 10 a 15 anos.

Não há procedimentos práticos e simples para medir a imunidade. O modelo "*in vitro*" criado com a biologia molecular (será comentado no item seguinte) não se presta para operações rotineiras. A resposta positiva à PPD só traduz a existência de um estado de sensibilidade. Quando a sensibilidade a tuberculina se esvanece, pode persistir um estado latente no organismo, que pode ser

exaltado e detectado com o corpo bacilar integral, procedimento em que se baseia o BCG-Teste. Todavia a resposta positiva ou negativa dos organismos vacinados com BCG não informa sobre a resistência contra o *M. tuberculosis*. É substancial a demonstração experimental e clínica de que sensibilidade tuberculina e imunidade são fenômenos independentes e dissociáveis podendo não caminhar paralelamente. Assim a extinção da alergia tuberculinica num vacinado com BCG não significa necessariamente que a imunidade desapareceu. É farta a literatura, inclusive nacional, sobre o assunto, mas sua abordagem escapou dos objetivos deste artigo.

Face ao exposto, o critério para revacinação tem-se fundamentado mais em função dos dados epidemiológicos. O Nono Informe Técnico da O.M.S. (⁸¹) baseado em que a resposta imunitária dos lactentes é fraca e que não há certeza quanto à duração da proteção do BCG, recomendou a revacinação na idade escolar, argumentando ainda que essa política tem o mérito de prolongar e ou reforçar a imunidade antituberculosa até a idade da adolescência e dos jovens adultos, faixas etárias essas mais vulneráveis a desenvolver tuberculose ativa quando se infectam com *M. tuberculosis*. Logo depois a O.M.S. aduziu que nos países de alto risco de infecção tuberculosa, além da vacinação da população infantil, uma segunda vacinação deve ser administrada, sem prova tuberculinica prévia, antes da idade em que a prevalência da infecção atinja níveis ainda mais elevados (⁷⁸). Assim, a época ideal para a revacinação é a idade escolar, dos 10 aos 12 anos, porque a proteção se

prolonga até adolescência, o que é muito conveniente pelos motivos expostos, sobretudo na América Latina. A revacinação na idade escolar oferece ainda a vantagem da facilidade operacional. A Organização Panamericana de Saúde advoga esse critério mas devido a grande evasão escolar nas idades acima citadas, aconselha revacinar logo na entrada, isto é, dos 6 aos 9 anos (⁵¹). No Brasil advoga-se a revacinação também aos 6 anos de idade no ingresso na escola primária, independente de prova tuberculinica prévia e da presença de cicatriz vacinal, tendo o procedimento ainda a vantagem de agir como vacinação primária para os que eventualmente não foram vacinados ao nascer (⁵⁵). Com muita razão a Coordenação de Pneumologia Sanitária vem recomendando com empenho a inclusão sistemática da revacinação no programa da vacinação BCG, pelos motivos acima referidos, face à epidemiologia da tuberculose em nosso país, agora agravada com a entrada em cena do HIV. Grande número de países dos 5 continentes adotam a revacinação. Há meio século que Arlindo de Assis advogou a política de vacinação, como abordada no item anterior e neste, com enfase na administração do BCG às crianças recém-nascidas primordialmente, e nos adolescentes (⁴). Seu apelo constante era "vacinar e revacinar eis a conduta que nos deve congregar no futuro próximo; cabe a nós médicos divulgar a vacinação BCG" (⁵).

Em Busca de um BCG mais Potente

Com advento da biologia molecular as manipulações mais usadas pela engenharia genética consis-

tem no transporte por meio de vetores, como os plasmídeos ou bacteriófagos temperados que não lisam as bactérias, de genes, epitopos e outros fragmentos do DNA de micoorganismos, para inseri-los mais comumente no *E.coli*, onde são armazenados. Constitui-se desse modo os bancos ou bibliotecas de genomas. Esse material genético fica para ser estudado, codificado e clonado. Já estão praticamente codificados os genomas do *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG e *M. leprae* (^{14, 42, 72, 90}). Os epitopos têm propriedades antigênicas produzindo anticorpos monoclonais altamente específicos e portanto muito importante para engenharia genética do BCG. Três são os principais objetivos na transformação genética do BCG; aumentar seu poder imunizante, estender seu poder protetor contra as reativações endógenas e reinfeções exógenas e torná-lo veículo de outras vacinas conferindo-lhe qualidade polivalente.

As tentativas de obtenção de vacina antituberculosa empregando apenas extratos antingênicos do BCG ou seus epitopos, resultaram infrutíferas. O próprio corpo integral do BCG morto, tem baixo poder imunológico (^{19, 35}). Há evidência de que os epitopos imunizantes necessitam da conjugação de um adjuvante sendo este essencial para o procedimento da imunidade. O adjuvante é elaborado pela célula bacteriana. Parece ser essencial para o processo de proteção antituberculosa que esses epitopos sejam sintetizadosativamente com a participação conjugada do coadjuvante elaborado como parte integrante do processo (^{19, 28, 62}). Esse mecanismo pode explicar porque o BCG

mortal é menos efetivo para elaboração da imunidade antituberculosa (19). Há grande evidência que o coadjuvante seja uma proteína dimérica de 46 KDa, que algumas cepas de BCG secretam em maiores quantidades que outras, influindo assim na potência protetora (1).

Se o adjuvante é proteínico, os epitopos imunizantes são da natureza polissacarídea. Há muita evidência que抗igenos carbohidratos participam no desencadeamento das respostas imunitárias mediadas por células (19,28,35). Um deles de grande poder ativador de macrofagos em animais e no homem, é constituído por arabinose, manose e galactose parecendo estar ligado a um peptide (21) e também possivelmente a lipides (19,86). Esse polissacarídeo está em vias de ser sintetizado (19). Os抗igenos proteínicos estão mais relacionados com as reações de hipersensibilidade dérmica. O PPD é apenas uma proteína purificada extraída da tuberculina. Esta ainda contém um glúcido que provoca reações de precipitação com soro de organismos infectados pelo *M. tuberculosis*.

Para aumentar o poder protetor do BCG, busca-se identificar o gene codificador da proteína dimérica 46KDa e inserí-lo no DNA do próprio BCG com o objetivo de criar uma cepa que a elabore em maior quantidade, aumentando sua capacidade protetora antituberculosa. Outro caminho em pauta é ele-

var o poder imunizante do BCG empregando anticorpos monoclonais específicos de seus próprios epitopos e do *M. tuberculosis* cepa H37 Rv. Essa cepa recombinante foi designada BCG-a. Um抗ígeno polipeptídico foi preparado baseado em seqüência de aminoácidos do BCG-a, sendo a nova cepa chamada BCG-a-P. Cobaias imunizadas com BCG-a-P desenvolvem reações imunológicas intensas de respostas celulares de proteção (49). Há perspectivas de desencapear estas últimas em organismos já infectados pelo *M. tuberculosis*, em que pese uma investigação experimental com essa cepa, não ter produzido resposta favorável (87). Construir um BCG recombinante de muito maior poder protetor, é factível com a inserção de genes codificadores de epitopos do *Mycobacterium microti*. Este também conhecido como bacilo de Wells ou volebacillus, é mais imunizante que o BCG, o que foi constatado no ensaio da Inglaterra, no qual ele foi administrado paralelamente a coorte de adolescentes. No cômputo final, o BCG conferiu 78% de proteção antituberculosa, e o *M. microti* mais de 80%. Contudo este último não é recomendado como vacina, devido as lesões locais que provoca e pelo desconhecimento de sua patogenicidade para o homem. O *M. microti* produz lesões num roedor selvagem "microtis agrestis", ocupa posição fenotípica entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*, seu DNA

tem grande homologia com esses dois germes e seus extratos imunológicos têm padrão comum a eles; há tendência de integrá-lo no Complexo *M. tuberculosis* (6).

As investigações em curso para se construir um BCG recombinante com genes codificadores de epitopos imunizantes do *M. microti*, *M. tuberculosis* e provavelmente de mais outras microbactérias, abrem perspectivas promissoras da obtenção de cepa BCG muito mais potente do que atualmente se emprega e com capacidade de proteger não só contra a primo-infecção como contra os demais estágios da tuberculose.

Para avaliar os vários tipos de BCG geneticamente transformados não há necessidade dos estudos prospectivos epidemiológicos que levam anos para fornecer conclusões. A aferição do seu poder protetor e inclusive de epitopos imunizantes, pode ser feita por meio de células e linfocina, clonadas, envolvidas no processo da imunidade antituberculosa. (21,30). Macrófagos e linfócitos T com linfocina inibidora do crescimento do *M. tuberculosis*, cultivados *in vitro* e postas em contato sob condições adequadas com o抗ígeno a ser avaliado, fornecem resposta rápida quanto à capacidade de impedir a multiplicação do *M. tuberculosis* e mesmo destruí-lo. (20,21). O método é valioso. Os testes podem ser medi-

dos e monitorados. Todavia é preciso cautela, pois nem sempre os resultados podem ser transferidos integralmente para expressar a proteção no organismo humano.

Como se disse no início desse item, a transferência de material genético de uma bactéria para outra, se opera por meio dos plasmídeos ou bacteriófagos, sendo estocados dentro do *E. coli* porque este oferece maiores facilidades de manipulação. Não obstante, só um germe, entre 1000 a 10000 unidades aceita o vetor. Nas micobactérias o problema é mais difícil devido à carapaça cero-lipídica que constitui grande obstáculo à penetração de um vetor. Por isso a transformação genética do BCG exige técnica sofisticada e especial, que é abordada no item seguinte.

7 - Construção de um BCG Polivalente

Outro grande avanço com repercussão na estratégia geral das vacinações, é a construção de um BCG servindo de veículo para diversas vacinas. Desde logo surgiu a idéia de reforçar sua capacidade protetora, já existente contra hanseníase. Há largo espectro de homologia antigênica entre o *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Na década dos anos 40 iniciaram-se pesquisas, inclusive entre nós, demonstrativas da capacidade do BCG, tornar os

indivíduos positivos à lepromina (reação de Mitsuda), mesmo os recém-nascidos (⁶⁴). A resposta positiva à lepromina exprime forma de resistência à lepra lepromatosa.

Estudos efetuados ulteriormente, consignaram níveis diversos de proteção do BCG contra o *M. leprae*: em Uganda 80%, Malavii 45% a 60%, Nova Guiné 44%, Sul da Índia 24% a 30%, Burma 20% (^{8,28,29}). Também aqui, fatores estranhos ao BCG devem ter influído na discrepância dos resultados, como sucedido nos estudos prospectivos relativos à proteção antituberculosa.

A proteção do BCG contra a hanseníase tem todas as chances de ser melhorada, não obstante não serem ainda conhecidos todos os抗ígenos envolvidos no processo imunológico, das micobactérias. Tratando-se de imunidade mediada por células, pesquisas sugerem que epitópos produzidos pelos linfócitos T e linfocinas têm larga participação no processo. Estando já clonado o genoma do *M. leprae*, o caminho para a identificação de todos os genes codificadores dos抗ígenos imunizantes, está aberto.

No estado atual dos conhecimentos há todo o interesse na construção de um BCG bivalente de alto poder protetor contra o *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Na

Venezuela empregou-se uma mistura de BCG e *M. leprae* morto, com resultados animadores contra a lepra lepromatosa (¹⁷). Nos *M. tuberculosis* e *M. leprae* existem epitópos imunizantes produzindo proteção cruzada, e explora-se a possibilidade de identificar抗ígenos específicos ainda mais potentes, assim como a sintetização de hidrocarbonetos e peptides também específicos, para inseri-los no DNA e BCG, reforçando neste o poder protetor antileprótico (⁵⁴); estes últimos estão sendo clonados para investigar sua estimulação às respostas das células T e macrófagos. Os que se revelam com maior poder imunogênico nas provas *in vitro* estão sendo inseridos no DNA e BCG (³⁰). O banco do genoma do *M. leprae*, já constituído está servindo para alimentar essas pesquisas de construção de um BCG bivalente conferindo proteção contra as duas micobactérias responsáveis pelas duas doenças de maior significação epidemiológica: tuberculose e lepra.

O BCG presta-se muito bem com veículo para diversas vacinas. Há 30 anos que se demonstrou não haver qualquer inconveniente na administração simultânea de BCG com outras vacinas. O Programa Ampliado de Imunização recomenda a aplicação simultânea do BCG com a vacina oral antipoliomielite, e vacinas contra difteria, coqueluche, sa-

rampo e tétano (23,51,78,83).

Com a engenharia genética insere-se no DNA do BCG, elementos imunizantes do genoma de batérias e virus, agentes causais de várias doenças. Constrói-se assim um BCG polivalente.

A escolha do BCG como veículo multivacinal, alicerça-se nos seguintes dados fundamentais:

- Nos últimos 40 anos administraram-se 3 bilhões de doses de BCG; mais de 70% das crianças no mundo receberam essa vacina (8,28).

- É a vacina que tem a mais baixa incidência de efeitos indesejáveis sérios; extensa revisão da literatura consigna o baixo índice de 0,0004%. (45). Não produz complicações nas crianças HIV positivas, assintomáticas e é recomendada nos filhos de mães infectadas com esse vírus (44,60,84).

- É a única vacina, ao lado da vacina oral antipólio, recomendada à recém-nascidos.

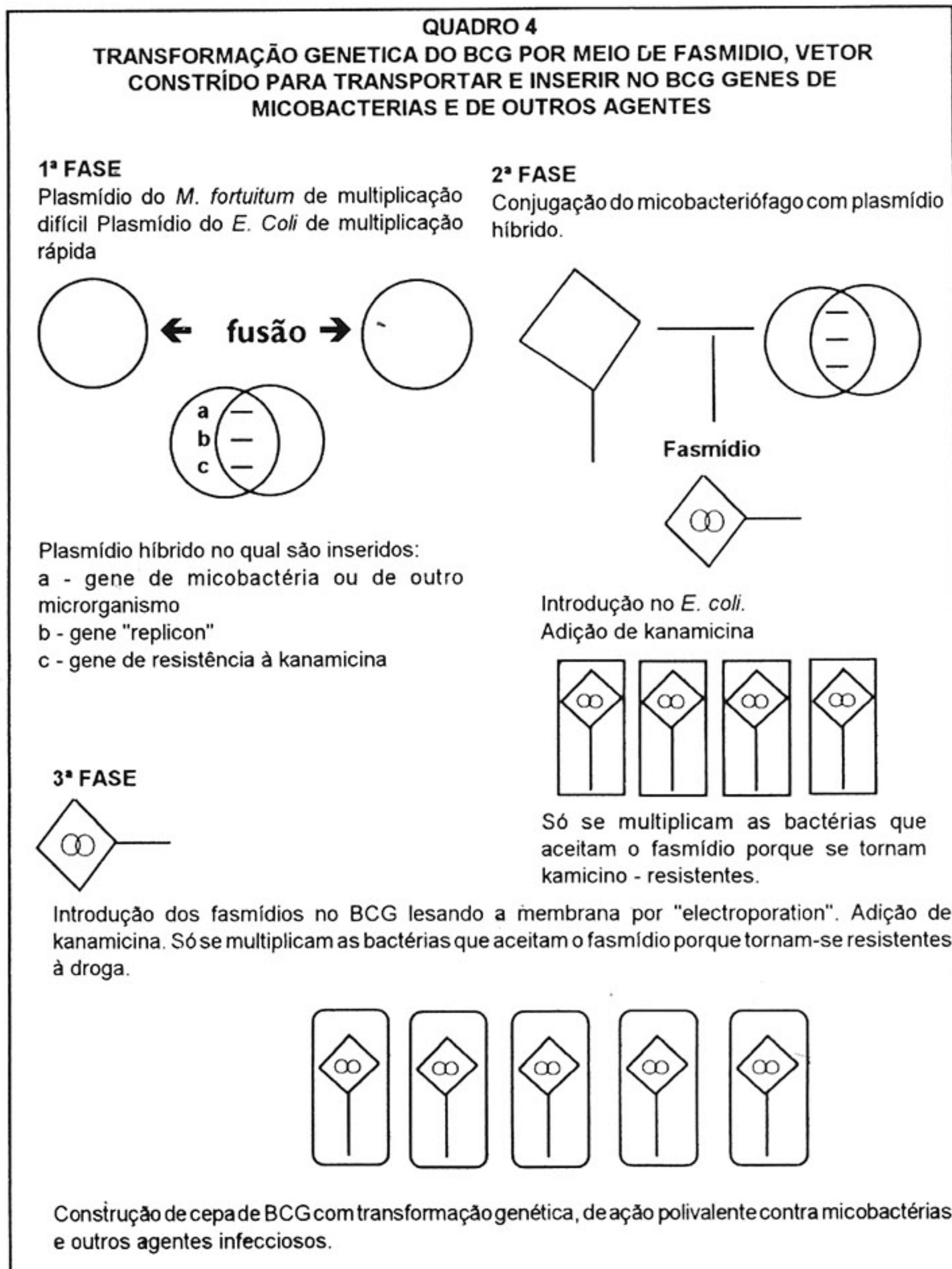
- Com uma só dose produz imunidade que se mantém por 10 a 15 anos.

- É o maior indutor de imunidade mediada por células.

Contudo não é fácil fabricar

um BCG transformado geneticamente. Isso porque como foi registrado no item anterior, a membrana Cero-lipídica da microbatéria é extremamente refratária, obstaculizando a passagem de material estranho com plasmídios ou bacteriófagos veiculando material genético.

Para contornar essa dificuldade, no Departamento de Micro-biologia e Imunologia do Albert Einstein College of Medicine, N. York (7,8,46,90), engendrou-se procedimento engenhoso baseado fundamentalmente na construção do "fasmídio" que é a fusão do bacteriófago com o



plasmídio. O termo fasmídio é composto com o início da palavra fago e o final de plasmídio. Assim foi possível pela primeira vez introduzir genes estranhos numa micobactéria, no caso o BCG.

O único vetor capaz de introduzir DNA estranho nas micobactérias é o micobacteriófago. Conhecem-se relativamente poucos micobacteriófagos; têm a vantagem de permanecerem imutáveis mesmo que a micobactéria se torne resistente às drogas antimicobacterianas. Para inserir genes estranhos na micobactéria, mesmo transportado pelo micobacteriófago é preciso grande quantidade deles para aumentar as chances de êxito nessa operação de transferência. Faz-se portanto a fusão daquele com o plasmídio, seguindo-se a inserção no *E. coli*, que duplicando-se a cada 20 minutos, em poucas horas produz milhões de cópias, para se fazer então sua introdução no BCG. Dessa forma o material genético replica-se como plasmídio no *E. coli* e como fago no BCG. Em síntese é essa a operação com o fasmídio, que está sintetizada no quadro 4 e vai a seguir resumida em três fases: **Primeira fase** - usou-se o plasmídio de sigla pAL 5000 do *M. fortuitum*, bactéria esta de crescimento rápido; não obstante a multiplicação desse plasmídio não é fácil, razão porque foi feita sua hibridação com o plasmídio de sigla p/J666 de

E. coli, que é de replicação rápida. Nesse plasmídio híbrido inseriu-se o gene estranho a ser transportado, um gene "replicon" para ativar a replicação e o gene codificador da resistência à kanamicina para servir de marcador. **Segunda fase** - conjugação do plasmídio híbrido com o micobacteriófago; forma o fasmídio. Este é introduzido no *E. coli*. As unidades que aceitam o fasmídio tornam-se resistentes à Kanamicina (47). Esta droga é adicionada à cultura na qual só se multiplicam os genes contendo o fasmídio com o gene codificador da resistência à kanamicina. **Terceira fase** - transferência dos fasmídios para cultura de BCG. Para vencer a resistência da membrana cero-lipídica da micobactéria, emprega-se a técnica, em língua inglesa denominada "electroporation", pela qual o DNA é carregado eletricamente e a célula micobacteriana é submetida a potencial elétrico muito elevado, por rápidos períodos. A carapaça cero-lipídica sofre uma espécie de abrasão, facilitando a passagem de fasmídios que operarão a transformação genética do BCG. Aqui também se adiciona kanamicina ao meio de cultura, multiplicando-se somente as micobactérias que aceitam o fasmídio porque se tornaram resistentes à droga.

Compreende-se o alto significado da construção de cepas de BCG

de ação polivalente graças à engenharia genética.

Para construir um BCG multivalente, levará ainda longo tempo, porque será necessário primeiramente identificar quais os epitopos ou genes com maior propriedade imunogênica, de pelo menos cerca de uma dezena de bactérias e vírus, que serão escolhidos para serem inseridos no BCG e neste se expressarem. É um trabalho complexo e lento. Para obviar essa dificuldade no mesmo Departamento de Microbiologia da Escola Médica Albert Einstein, engendrou-se um modelo revolucionário que poderá em pouco tempo fornecer um BCG polivalente (7,8). Em última análise a operação consiste no seguinte:

- preparação de vetores plasmídios contendo em conjunto todos os genes dos agentes patogênicos escolhidos para se expressar no BCG

- inserção dos plasmídios, transformados em fasmídios, no BCG, pela técnica "electroporation". Cada unidade da cultura expressará alguns ou um só gene ou epitopo do agente patogênico considerado. Todos os genes BCG em conjunto contém o total do genoma do referido agente.

- introdução de unidades de BCG no rato. Estes ulteriormente são

inoculados com doses letais do agente.

- sobrevivem somente os animais que desenvolveram imunidades efetiva contra o agente inoculado.

- das unidades de BCG cujos animais sobreviveram, os fasmídios serão recuperados, porque albergam o gene codificador do antígeno protetor, cuja estrutura será então facilmente identificada. Os autores consideram essa estratégia elegante e revolucionárias porque faz a clonagem dos genes codificadores dos antígenos imunizantes antes mesmo que sua estrutura seja identificada, representando enorme economia de trabalho e de tempo.

Pelo exposto até aqui, infere-se haver promissoras perspectivas da construção de cepas de BCG com maior potencial protetor contra a tuberculose e com expectro de imunização mais extenso protegendo os organismos já infectados com o *M. tuberculosis*, das reativações endógenas e reinfecções exógenas. Há também larga evidência do aumento da proteção do *M. leprae* e com largas possibilidades de extendê-las à outra micobactérias, especialmente as do Complexo avium-intracelulares.

Por fim há a auspiciosa perspectiva da obtenção de um BCG

como vacina universal. Indubitavelmente há ainda muito trabalho para concretização de uma vacina polivalente eficiente contra várias doenças que são problemas de saúde pública. A possibilidade de expressar no DNA do BCG genes codificadores de antígenos imunizantes de diversos agentes patogênicos abre os caminhos para uma vacina polivalente universal o que representará excepcional progresso no campo da epidemiologia.

Referências Bibliográficas:

- 1 - Aboud-Zeid C, Smith I, Grange JM et al. Subdivision of doughter strains of Bacille Calmette-Guerin (BCG) according to secreted protein patterns. J. Gen. Microbiol. 1986; 132:3047.
- 2 - Andrade Lec - Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. Rev. Ass. Med. Brasil. 1983; 39:175.
- 3 - Assis A. - Meio líquido para cultivo abundante do b. tuberculozo. O Hospital. 1944; 25:1.
- 4 - Assis A. - Ensinamentos de dezessete anos (1927-1944) de vacinações BCG no Brasil. O Hospital. 1948;27:528.
- 5 - Assis A. - Reflexões sobre o combate à tuberculose no Brasil. O Hospital. 1945;27:1045.
- 6 - Bergeys Manual Of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Ed. Willianns e Wilkins. Section 16. The Mycobacteria., 1986.
- 7 - Bloom BR - Guide de la biologie moléculaire des mycobactéries à l'intention du commun des mortels. Bull. Union Int. Tuberculose Mal. Respir. 1989;64:51 e An ordinary mortal's to the molecular biology of mycobacteria. Int. J. Leprosy and Mycobact. Dis. 1990;58:365.
- 8 - Bloom BR, JACOBS WR - New strategies for leprosy and tuberculosis and for development of bacillus Calmette-Guerin into a multivaccine vehicle. An. N. York Acad. Sci. 1990,155.
- 9 - Calmette A - La vaccination preventive contre la tuberculose par le BCG. Ed. Masson. Paris, 1927.
- 10 - Calmette A - L'infection bacillaire et la Tuberculose chez l'homme et chez animaux. Étude biologique et expérimentale; vaccination preventive. Ed. Masson. Paris, 1936.
- 11 - CALMETT A, GUERIN C - Surquelques propriétés du bacille Tuberculeux d'origine bovine, cultivé sur la bile de boeuf glycérinée. Compt. Rend. Acad. Sci. 1909;

149:716.

12 - Calmette A, Guerin C - Nouvelles recherches expérimentales sur la vaccination des bovidés contre la Tuberculose et sur la sort des bactéries tuberculeuses dans l'organisme des vaccinés. An. Inst. Pasteur 1913;24:36.

13 - Camargos PAM, Guimarães MDC, Antunes CMF Risk assessment for acquiring meningitis Tuberculosis among children not vaccinated with BCG: a casecontrol study. Inn J. Epidemiol. 1988; 17:193.

14 - Cave MOK, Eisenach PF, McDermott JH et al. IS6110 conservation of sequences in the Mycobacterium tuberculosis complex and its utilization in DNA fingerprint. Mol. Cell. Probes, 1991;5:73.

15 - Clark-Curtis I E, Jacobs WR, Docherty MA et al. - Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of Mycobacterium leprae/J. Bacterial, 1985;161:1093.

16 - Comstock GW, Livesay VT, Woolper SF - Evaluation of BCG vaccination among Puerto Rico children. Am. J. Public Health 1974;64:283.

17 - Convit J, Ulrich M, Aranzazun

et al. - The development of a vaccination model using two microorganisms and its application in leprosy and leishmaniasis. Leprosy Rev. 1986;57 (suppl.2):263.

18 - Crawford J, Bates JH - Phage Typing of mycobacteria. In Kubica G. P., Wayne L G. The mycobacteria a sourcebook. Part A: Marcel Dekker, Inc. N. York, 1934.

19 - Crowle AJ - Immunization against tuberculosis: what kind of vaccine? Inf. Immunity 1988; 56:2769.

20 - Crowle AJ, Douvas GS, May MH. Natureza cellular y molecular de la imunidad contra la tuberculosis en el hombre Bol. Union Int. Tuberculosis 1983;58(1):75.

21 - Crowle AJ, May M. - Preliminary demonstration of human Tuberculosis-munity in vitro. Inf. Immunity 1981;31:453.

22 - Dam GH Ten - Études sur Sugets contacts pour tester l'efficacité de la vaccination par le BCG chez l'enfant. Bull Union Tuberculosis Mal. Respir. 1987;62(3):68.

23 - Dam HG ten, Toman K, Hitze KL e al. - Estado actual de los conocimientos técnicos sobre la immunización contra la tuberculosis

Unidad de Tuberculosis, División de

Enfermedades Transmisibles. Documento Técnico who/tb/76.104.

24 - Eisenach KDJ T, Bates JH - Repetitive DNA sequence as probe for *Mycobacterium tuberculosis*, J. Clin. Microbiol - 1988; 26:2240.

25 - Eisenach KD., Cave MD, Bates JH et al - Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Nuclieic Acids Res. 1990;18:168.

26 - Engel HWB - *Mycobacterium* and phage typing. Ann. Microbiol, 1978;129a:75.

27 - ENSAIOS CONTROLADOS CLÁSSICOS DE BCG. - Bettag OL et al. Dis. chest 1964;45:503 - British Medical Research Council. Brit. Med. J. 1971;4:79, Bull Wld Health Org. 1972;64:381 - Comstock GW, Palmer CE, Amer. Rev. Respir. Dis. 1969;100:839. Fridmodt Moller J et al. Indian J. Tuberc. 1968;15:50 - Palmer CE et al. Amer. Rev. Tuberc. 1959;77:877 - Rosenthal SR et al. Pediatrics 1961;28:622 - Stein SC, Aronson JD. Amer. Rev. Tuberc. 1953;63:695.

28 - Expanded Programme on Immunization. Global Status Report. WHO Weekly Epidemiol. Rev. 1987;62:241.

- 29 - Fine PEM, BCG vaccination against tuberculosis and leprosy. Brit. Med. J. 1988;44:691..
- 30 - Fine PEM, PONNIGHAUS JM - Leprosy in Malawi. Trans. Royal Soc. Tropical Med. Hyg. 1988;82:810.
- 31 - Fine PEM, Rodrigues L.C. - Modern vaccines. Mycobacterial diseases Lancet, 1990;335:"1016.
- 32 - Galas D.J., Chandler M - Bacterial insertion sequences. In Berg D.E, Hewe M M, Ed Mobile DNA. Amer. Soc. Microbiol Washington 1989.
- 33 - Gill PAJ, Jeffreys DJ - Forensic application of DNA fingerprint. Nature, 1985;318:577.
- 34 - Global Programme on AIDS and Expander Programme on Immunization Joint Who/UNICEF. Statement on larly immunnization for HIV - infected chieldren. Wkly. Epidemiol. 1989;64:48.
- 35 - Godfrey-Faussett P, Mortimer PR, Jenkins PA et al. Evidence of transmission of tuberculosis by DNA finger print Brit. Med. J. 1992;305:221.
- 36 - Grange JM - Molecular Biology: News hopes and challenges. Tuberclle 1988,69:1.
- 37 - Grange JM - Recents développements en matière de biologie moléculaire des mycobactéries. Bull Union Int. Tuberculose Mal. Respir. 1990;65:20.
- 38 - Green EPMs, Tizardmt, Moss J et al. - Sequence and characteristics of IS 900, an insertion element identified in a Crnh's disease isolate of M paratuberculosis. Nucleic Acids Res. 1989;17:9063.
- 39 - Hank JA, Chan JL, Edwards ML et al. - Influence of the virulence of Mycobacterium tuberculosis on protection induced by bacille Calmette-Guerin in guinea pig 5. Infect. Dis. 1981;143:734.
- 40 - Hermans PWM, Soolinge D, Bik EM et al. - Insertion element IS 987 from Mycobacterium bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis complex strains infimmunityy - 1991;59:2695.
- 41 - Hermans PWM, Soolingen D. Dale JW et al. Insertion element IS 986 from Mycobacterium tuberculosis. A useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1990;28:2051.
- 42 - Hijar MA - Epidemiologia da Tuberculose no Brasil. Informe Epidemiológico do SUS. 1992, Ano 1 (6):53.
- 43 - Jacobs WR, Tuckman M, Bloom. BR - Introduction of foreign DNA into mycobacteriu using a statte fasmd. Nature 1987;327:532.
- 44 - Lallemand, Lallemant M, Cheynier D et al Bacillus Calmette-Guerin immunization in infants born to HIV-1 soropositive mothers. AIDS, 1991, 5:195.
- 45 - Lallemant Le Coeur S, Lallemant, CheynierD et al. - Bacillus Calmette-Guerin immunization in infants to HIV-1 soropositive mother. AIDS 1992;5:195.
- 46 - Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N et al Seconde e'tude de LUCTMR sur les complications dues a la vaccination intradermique par le BCG, Bull. U. Int. Tuberculose Mal. Respir. 1988;63(2):50.
- 47 - Lugosi L, Jacobs WR, Boomer - Genetic Transformation of BCG Tuberb, 1989;70:159.
- 48 - Martini CJ, Timm J, Rauzier J et al Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria Nature 1990;345:739.
- 49 - Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD et al. - Cromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS 6110 as stain specific markers for epidemiologic study of Tuberculosis. J. ClinMicrobiol. 1991;29:2030.

- 50 - Minden P, Houghten RA, Sperar UR et al. A chemical synthesized peptide which elicits humoral and cellular immune responses to mycobacterial antigens. *Inflammity*. 1986;53:560.
- 51 - Murray CJL, Styblo K, Rouizlon N. La tuberculose dans les pays en développement: Importance, stratégies de lutte et cout. *Bull. Union Int. Tuberculose Mal. Respir.* 1990;65(1):6.
- 52 - Organização Panamericana de Saúde - Control de la Tuberculosis en América Latina - Washington, EUA - 1979.
- 53 - Otal I, Martin C, Levy Frebault W, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS 6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991;29:1252.
- 54 - Palmer CE, Long MW. - Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1966;94:553.
- 55 - Patarroyo ME, Parra CA, Pinella C et al. Immunogenic synthetic peptides against mycobacteria of potential immuno-diagnostic and immunoprophylactic value. *Leprosy. Rev.* 1986;54. Suppl, 2:163.
- 56 - PERITOS EM BCG DO PROGRAMA DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE - Informe Técnico sobre BCG - 4 set. 1992. Rio de Janeiro. Mineo.
- 57 - Prabhakar R, Venkatraman P, Vallishayee RS et al. - Virulence of guinea pigs of tubercle bacilli isolated from the sputum of participant in the BCG trial, Cingleput District, South India. *Tubercle*, 1984;68:3.
- 58 - Premier Congrès International DU BCE. Institut Pasteur 12;23-VI, 1948 Paris.
- 59 - PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE - Reunião de Avaliação Operacional e Epidemiológica do PNCT na década de 80. Gerência Técnica de Pneumologia Sanitária. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Ministério da Saúde. Brasília 1992.
- 60 - REPORT OF THE TECHNICAL CONFERENCE FOR THE STUDY OF VACCINATION AGAINST TUBERCULOSIS BY MEANS OF BCG. Publications of the League of Nations (Health) 1958;3:1.
- 61 - Reyn CF, Clemens CJ, Mann JM - Human Immunodeficiency virus infection and routine childhood immunization. *Lancet*, 1987, set 19:669.
- 62 - Romanus V - Tuberculosis in bacillus Calmette-Guerin immunized and unimmunized children Sweden: a ten-year evaluation following the cessation of general bacillus Calmette-Guerin immunization of the newborn in 1945. *Pediatr. Inf. dis. T.* 1987;6:272.
- 63 - Rook G. Progress in the immunology of the mycobacterioses. *Clin. Exp. Immunol.* 1986;132:3047.
- 64 - Rosemberg J - Repercussões da biologia molecular na tuberculose. *J. Pneumologia*, 1993;19:25.
- 65 - Rosemberg J, Souza Campos N, AUN JN - Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra: 1 - ação positivante do BCG sobre o lepromino - reação. *Rev. Bras. Leprologia*, 1950;18:3. - Estado atual do conhecimento da inversão da reação de Mitsuda por efeito do BCG oral. O Hospital 1953:44:33 - Comparative study of the results of the lepromin test in subjects submitted to serial injection of Mitsuda's antigen and to oral BCG vaccination Internat. *J. Leprosy*, 1960;28:271.
- 66 - Schurmann P Kleischmidt Sauginstuberkeose in Lubeck Pathologie und Klinik der Lubercker Sauginstuberkeose Erkrankungen. Ed. Verlag J. Springer, Berlin, 1935.
- 67 - Soolinger D, Hermans PWM, Petra EW et al. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium* tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence - dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991;29:2578.
- 68 - Smith PGS - Les études de cas témoins concernant l'efficacité du BCG chez l'enfant. *Bull. Union Inst. Tuberculose Mal. Respir.* 1987;62(3):62
- 69 - The Conference on European BCG Programmes. 8-12 setembro 1949. Copenhague
- 70 - The International Tuberculosis Campaign - Second Annual Report junho 1949-junho 1950. Genebra.
- 71 - Thierry D, Brisson-Noel A, Ley-

- Frebaul TW et al.- Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS 6110, ,and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990;28:2668.
- 72 - Thierry D, Cave KD, Eisenach JT. et al IS 6110 an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acid Res.* 1990;18:188.
- 73 - Thole Jer, Dauwerse HG, Das PK et al. - Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG-DNA and expression of antigens in *Escherichia coli*. *Inf. Immunity.* 1985;50:800.
- 74 - Thipathy SP - L'essai sur la prevention par le BCG en Inde: quinze années de suivi. *Bull. Union Int. Tubercule Mal. Respir.* 1987;62(3):59.
- 75 - Tuberculosis Prevention Trial - Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention: first report - *Bull Word Health Orga.* 1979;59:819.
- 76 - Watkins PC - Restriction fragment length polymorphim (RFLP) Aplication in human chromosome mapping and disease research. *Biotechniques*, 1988;6:310.
- 77 - Weil - Hallé B, Turpin R - Premier essais de vaccination antituberculeuse de l'enfant par le bacille Calmette-Guerin (BCG). *Bull et Mem. Soc. Méd. Hôp. Paris;* 1925;49:1589.
- 78 - WHO-Expert Committee on Biological Standartization - Selection of strain for a proposed replacement of the international reference preparation of BCG Vaccine. WHO/ BS/69.956.-1969.
- 79 - WHO - Present knowledge of immunization against tuberculosis. WHO/TB/76.104 e WHO/TB/73/98.
- 80 - WHO-Division of Communicable Diseases - Present Knowledge of immunization against tuberculosis WHO/TB/76.104.
- 81 - WHO-Expert Committee on Biological Standartization. Einghteenth Report Geneva 1966, (WHO Technical Report Series nº 329).
- 82 - WHO - 9 Informe do Comitê de Expertos de la OMS en Tuberculosis serie de informes técnicos 552 - Genebra - 1974.
- 83 - WHO - Vacunacion contra tuberculosis. Informe de um Grupo Científico ICMR/OMS. Série Informes Técnicos 651, 1980.
- 84 - WHO - Políticas de Vacunacion, com BCG. Informe de um Grupo de Estudo de la OMS. Série Informe Técnico 352.1980.
- 85 - WHO - Special Programme on AIDS and Expanded Programme on Immunization: Consultation on human immunodeficiency virus (HIV) and routine childhod immunization. WKLY, Epidemiol Res. 1987;62:297.
- 86 - WHO - Tuberculosis Control as an integral part of primary health case. Genebra 1988.
- 87 - WHO - EPI - Update. agosto 1989.
- 88 - Wiegshaus EH, Smith DW - Evolution of the protective potency of new tuberculosis vaccines. *Rev. Inf. Dis.* 1989;11(supp. 2) S-484.
- 89 - Wunsch V - Os estudos de casos-controle na avaliação da eficácia de vacinas. A eficácia da vacina BCG. Dissertação de Mestrado, Fac. Medicina da USP, 1985.
- 90 - WUNSCH V, CASTILHO EA, RODRIGUES LC et al. Eficácia da vacinação BCG contra meningite tuberculosa: um estudo caso-conrole em São Paulo, Brasil, *Bull. WHO.* 1990;68:69.
- 91 - Young RA, Bloom BR, Grosskinsk CM et al. - Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Acad. Sci. USA.* 1955;82:2583.
- 92 - Zainuden ZF, Dale JW, Werret DJ - Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium* Tuberculosis detectec with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. *J. Gen., Microbiol.* 1989;135:2347.

PULMÃO-RJ

**A Revista de
Pneumologia do
Rio de Janeiro**

**Publique aqui a
sua experiência**