



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Doenças Infeciosas

Vacinação contra a Tuberculose - Será o fim do BCG na Europa?

Joana Vanessa Capelo Freitas

JUNHO'2017



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Doenças Infeciosas

Vacinação contra a Tuberculose - Será o fim do BCG na Europa?

Joana Vanessa Capelo Freitas, nº: 14286

Orientado por:

Dr. Luís Caldeira

JUNHO'2017

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina, no contexto da conclusão do Curso de Mestrado Integrado em Medicina na Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

O presente Trabalho Final foi escrito de acordo com o Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, em vigor desde 2009.

DECLARAÇÃO

Declaro que este trabalho resulta da minha investigação pessoal e independente; e que o seu conteúdo é original, estando as fontes consultadas devidamente identificadas na sua bibliografia.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Dr. Luís Caldeira pela disponibilidade e simpatia, demonstradas nas aulas práticas do quinto ano do curso, bem como por ter aceite orientar a presente dissertação. Os seus conselhos, correção e adequação científica foram fulcrais à realização da mesma.

Agradeço, igualmente, à Clínica Universitária de Doenças Infeciosas pela oportunidade concebida e por todo o material e ajuda por parte do seu Secretariado, Hugo Caldeira. À sua direção, Prof^ª Dr^ª Emília Valadas, pela sugestão de autores essenciais para a pesquisa e enriquecimento da dissertação, bem como pelo rigor científico e exigência inculcada.

À minha irmã e futura colega de profissão, Dra. Miriam Capelo, pelo apoio e sugestão de artigos e estudos pertinentes para o presente trabalho.

Ao meu namorado, Hernâni Pires, pelos conselhos prestados e apoio ao longo da realização da dissertação.

Por fim, um agradecimento aos meus pais que proporcionaram todas as condições necessárias para que pudesse realizar o curso de Medicina.

LISTA DE ACRÓNIMOS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

CTL – Linfócitos T Citotóxicos

INF- γ – Interferão-gama

Linfócitos T-helper – Th

LYG – *life years gained*

M. – *Mycobacterium*

MAIS complex – *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*,
Mycobacterium scrofulaceum

MHC – Major Histocompatibility Complex

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PPD – *Purified Protein Derivatives*

TB – Tuberculose

TB-MDR – Tuberculose Multirresistente

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor alpha*

rBCG – BCG recombinante

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

WHO – World Health Organization

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1 – Taxa de incidência TB por 100,000 em Portugal no ano 2014. Os grandes centros urbanos do Porto, Lisboa, Setúbal e Algarve são os que apresentam a maior incidência entre os 30 a 47 casos por 100,000 habitantes. *Fonte: Infecção VIH, Sida e Tuberculose em números - Direcção Geral de Saúde 2015.*

Figura 2 – Organigrama dos dados epidemiológicos da incidência de Tuberculose em Portugal no ano de 2014. Em 2014 foram notificados 2264 casos de tuberculose dos quais, 2080 eram novos casos, representando uma taxa de notificação de 21,8/100,000 habitantes e uma taxa de incidência de 20,0/100,000 habitantes. *Fonte: Infecção VIH, Sida e Tuberculose em números - Direcção Geral de Saúde 2015.*

Figura 3 – Principais vacinas em estudo atualmente. As barras amarelas representam as vacinas terapêuticas, as barras verdes, as vacinas vivas atenuadas; as barras azuis, as proteínas adjuvantes; e as barras vermelhas, os vetores virais. *(adaptado de S.H.E. Kaufmann et al.– International Journal of Infectious Diseases 56 (2017) pág. 264)*

Tabelas

Tabela 1 – Grupos de risco para vacinação com BCG. Crianças com idade inferior a 6 anos (5 anos e 364 dias) que estejam inseridas em comunidades de elevado risco de transmissão da doença. *(adaptado da Norma nº 001/2016 de 12/02/2016 - Direcção Geral da Saúde).*

Tabela 2 – Estirpes vacinais. Cada continente apresenta diferentes estirpes vacinais obtidas através da estirpe original de 1921 comercializada pelo Pasteur Institute, obtida através do Mycobacterium bovis. Atualmente existem 22 estirpes em comercialização. Apesar de não existir indicação formal para utilização de uma determinada vacina, foram criados critérios de qualidade pela OMS. *(adaptado de J.I. Moliva et al. – Vaccine 33 (2015) pág. 5037).*

Tabela 3 – Fatores que podem influenciar a eficácia vacinal. Dada a manipulação inerente à produção em massa as alterações genéticas das estirpes vacinais são inevitáveis, causando possíveis efeitos na sua eficácia. Outros fatores, como a influência de infecções concomitantes nos indivíduos, estado nutricional e questões logísticas relacionadas com armazenamento dos lotes vacinais também são pertinentes.

Tabela 4 – Vacinas vivas atenuadas. A VPM1002 está a ser desenvolvida pelo Instituto Max Plank de Biologia de Infecção em colaboração com Vakzine Projekt Management (VPM) na Alemanha. MTBVAC está a ser desenvolvida pelo Tuberculosis Vaccine Initiative (TBVI) na Holanda em colaboração com a Universidade de Zaragoza, e Biofabri na Espanha. *(adaptado de S.H.E. Kaufmann et al.– International Journal of Infectious Diseases 56 (2017) pág. 265)*

Tabela 5 – Proteínas Ajuvantes. M72 foi desenvolvido pela Glaxo Smith Kline (GSK), Reino Unido. H1 foi desenvolvido pelo Statens Serum Institut (SSI) na Dinamarca, em colaboração com TBVI, Intercell e European & Developing Countries Clinical Trials Partnership. ID93 foi desenvolvido pelo Infectious Disease Research Institut, EUA, em colaboração com a Aeras. *(adaptado de S.H.E. Kaufmann et al.– International Journal of Infectious Diseases 56 (2017) pág. 265)*

Tabela 6 – Vetores virais e antigénios adjuvantes. Ad5Ag85A foi desenvolvido pelo McMaster University, Canadá, em colaboração com a CanSino (China). Crucell Ad35/AERAS-402 foi desenvolvido pela Crucell, Holanda, Aeras e Oxford no Reino Unido. *(adaptado de S.H.E. Kaufmann et al.– International Journal of Infectious Diseases 56 (2017) pág. 265).*

ÍNDICE GERAL

Declaração	ii
Agradecimentos	iii
Lista de Acrónimos.....	iv
Índice de Ilustrações	v
Índice Geral	vii
Resumo	1
Abstract.....	2
Métodos	3
Introdução	3
Bacilo Calmette-Guérin em Portugal	5
Tuberculose, Epidemiologia em Portugal	6
Bacilo Calmette-Guérin: a vacina, estirpes vacinais e suas limitações	8
Limitações da vacinação	9
Influência geográfica na eficácia vacinal e a influência micobactérias não tuberculosas	11
Mediadores de Imunidade induzidos pela vacinação	12
Eficácia da vacinação na proteção contra as diversas formas de doença	13
BCG, eficácia na tuberculose pulmonar	14
BCG, eficácia na tuberculose disseminada e meningite tuberculosa	14
Duração da proteção: diferenças na proteção nas diferentes formas de Tuberculose ..	15
Perspetiva Futura – nova vacinação	16
Vacinas vivas atenuadas.....	16
Proteínas Adjuvantes.....	17
Vetores virais	18
Vacinas terapêuticas.....	20
Conclusão	21
Bibliografia.....	22

RESUMO

A OMS estimou 340.000 novos casos de Tuberculose no continente europeu em 2014. A diminuição da incidência ao longo das últimas décadas levou à mudança do paradigma vacinal, sendo que, atualmente, grande parte dos países europeus apenas faz vacinação dos grupos de risco em detrimento da vacinação universal. No ano de 2016, Portugal passou a fazer dessa lista, contudo, os grandes centros urbanos do país continuam a ter incidências consideráveis da doença.

O Bacilo Calmette-Guérin (BCG) é a única vacina que reduz o risco de formas graves de tuberculose na infância, impedindo a sua disseminação, contudo a sua eficácia contra as formas pulmonares nos adultos é variável. As diferentes estirpes vacinais produzidas por vários laboratórios não são homogêneas nas suas características genéticas, colocando em dúvida se mantêm a mesma imunogenicidade. A insuficiência na prevenção das formas pulmonares produziu o mote para a investigação de novas vacinas, existindo 13 candidatos em estudo.

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) evoluiu com a espécie humana, obtendo numerosas alterações genéticas que permitem evasão ao reconhecimento celular e subsequente destruição pelo hospedeiro. A investigação destes mecanismos é essencial para a produção de novas vacinas ou adjuvantes do BCG.

Palavras chave: “BCG”, “eficácia vacinal”, “*Mycobacterium tuberculosis*”, “estirpes vacinais”, “nova vacinação”.

O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML

ABSTRACT

WHO has estimated 340,000 new cases of tuberculosis on the European continent by 2014. The decline in incidence, in the last decades, led to a change in the vaccine paradigm, with most European countries only vaccinating at-risk groups. In the year 2016, Portugal join this list, however, the great urban centers continue to have considerable incidence of the disease.

Bacille Calmette-Guérin (BCG) is the only vaccine that reduces the risk of severe forms of tuberculosis in childhood, preventing its spread, but its efficacy against pulmonary forms in adults is variable. The different vaccine strains produced by several laboratories are not homogeneous in their genetic characteristics, casting doubt on whether they maintain the same immunogenicity. Failure to prevent pulmonary forms produced the motive for the investigation of new vaccines, with 13 candidates under study.

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) evolved with the human species, obtaining numerous genetic alterations that allow evasion to the cellular recognition and subsequent destruction by the host. Research into these mechanisms is essential to produce new BCG vaccines or adjuvants.

Key words; “BCG”, “vaccine efficacy”, “*Mycobacterium tuberculosis*”, “vaccine strains”, “new vaccination”.

The final work expresses the opinion of the author and not of the FML

MÉTODOS

O referente artigo de revisão teve por base a pesquisa na plataforma “PubMed” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) de artigos de língua inglesa entre os anos 2000 e 2016 com as seguintes palavras chave: “BCG”, “BCG efficacy”, “BCG Europe”, “BCG failure”, “BCG immune response”, “BCG genetics”, “Mycobacterium tuberculosis”; e artigos referenciados na sua bibliografia.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima 1,4 milhões de mortes por Tuberculose (TB) e uma incidência de 10,4 milhões de casos, no ano de 2015, permanecendo na lista das 10 causas de morte mais comuns no presente ano [1].

Apesar da baixa incidência na Europa Ocidental, a TB continua a ser um problema de Saúde Pública, principalmente nos países menos desenvolvidos, devido à sua morbidade e mortalidade [11]. Dificuldades no diagnóstico e tratamento, bem como o aumento da incidência das formas multirresistentes, têm contribuído para atrasar o controlo adequado desta doença [1].

Atualmente, a única forma de prevenção, é a vacinação com o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) que é administrado ao nascimento, por via intradérmica. Esta reduz o risco de disseminação hematogénea das formas graves da doença, como a TB miliar e meningite tuberculosa [11]. Até hoje, é a vacina mais administrada em todo o mundo [3]. A OMS recomenda apenas a vacinação neonatal, nas zonas endémicas, com uma incidência superior a 40/100,000 casos/ano [1].

As múltiplas políticas de vacinação estão relacionadas, principalmente, com as diferentes opiniões na eficácia da vacina e variações locais da epidemiologia da TB [14]. A diminuição da incidência, entre os anos 80 e 90 levou a que, a maioria dos países da Europa Ocidental, modificassem a sua estratégia.

A descontinuação da vacinação universal iniciou-se com a Checoslováquia (1961 – 1972) [5] e Suécia (1975) [8]. A França alterou o seu programa em 2004, terminando

com a revacinação; e em 2007 passou para um programa seletivo. A Finlândia iniciou a mudança em 2005 [11,15]. Atualmente os únicos países europeus de baixa incidência, que continuam com esquema vacinal universal são: Albânia, Bósnia e Herzegovina, Croácia, Eslovénia, Hungria, Irlanda, Mónaco, Montenegro, Polónia e Sérvia. [11]

Segundo um estudo realizado na Irlanda [15], país que ainda mantém um esquema vacinação universal, a eficácia da vacina foi avaliada durante 15 anos e construído um modelo de análise matemático, tendo em conta os indivíduos vacinados à nascença e os não vacinados. Comparando com programa vacinal em vigor neste país, a mudança para a imunização seletiva dos grupos de risco apresenta uma probabilidade de custo-efetividade estimada em 76,8%. A reavaliação da eficácia confirmou seu efeito protetor nesta população, visto que os vacinados apresentam um risco relativo de 0,26 e 0,16 de adquirem TB pulmonar e extrapulmonar, respetivamente. Outro parâmetro avaliado corresponde aos anos de vida ganhos (LYG – *life years gained*) e os custos da vacinação universal e seletiva. Desta forma, a estratégia universal apresenta um LYG de 4,8 anos e um custo de 2,325,823€/ano; e a estratégia vacinal seletiva, um LYG de 1,1 anos e um custo de 1,270,1310€/ano. Assim, este estudo indica que a estratégia de vacinação seletiva, embora tendo menor impacto económico, é menos efetiva.

Deste modo concentrar a vacinação nos grupos de risco, se podem, igualmente, concentrar os recursos num diagnóstico e tratamento mais eficazes, contudo há aspetos éticos importantes, como o aumento dos casos TB com a mudança do paradigma. [15]

BCG EM PORTUGAL

Em fevereiro de 2016, Portugal entrou na lista dos países Europeus que fazem apenas a vacinação de grupos de risco [9] (tabela 1). Esta decisão advém da proposta da Direção Geral da Saúde (DGS), sendo a mudança justificada pelos bons níveis de controlo da TB e diminuição da sua incidência nos últimos anos [7, 9]. Em 2014, a incidência foi de 20 casos por 100,000 habitantes o que coloca Portugal como um país de baixa incidência. Concomitantemente, nos últimos cinco anos, houve um decréscimo considerável da meningite tuberculosa nas crianças com idade inferior a 5 anos com uma incidência de 0,01/100,000 habitantes [1, 9].

Segundo a DGS, a redução da incidência, permitiu o cumprimento de critérios de controlo recomendados pela OMS e consequente mudança do paradigma vacinal [9]. Esta entidade afirma que a vacinação, apenas das crianças inseridas em grupos de risco, é segura, visto a diminuição cumulativa do número de casos no país. [9, 11]

Não podemos, no entanto, deixar de salientar que esta mudança de política vacinal se segue a um período de falha na distribuição vacinal por parte do Laboratório Statens Serum Institut da Dinamarca.

Tabela 1 - Grupos de risco para vacinação com BCG - crianças com idade inferior a 6 anos (5 anos e 364 dias) que estejam inseridas em comunidades de elevado risco de transmissão da doença. VIH (vírus da imunodeficiência humana), SIDA (síndrome de imunodeficiência adquirida) (adaptado da Norma nº 001/2016 de 12/02/2016 - Direção Geral da Saúde).

Crianças sem registo de BCG ou sem cicatriz vacinal:
A. Provenientes de países com elevada incidência de tuberculose;
B. Que terminaram o processo de rastreio de contactos e/ou esquema de profilaxia/tratamento;
C. Cujos pais, outros coabitantes ou conviventes apresentem: - Infecção VIH e/ou SIDA, após exclusão de infeção VIH na criança; - Dependência de álcool ou de drogas; - Proveniência, nos últimos 10 anos, de país com elevada incidência.
D. Pertencentes a comunidades com risco elevado de tuberculose;
E. Viajantes para países com elevada incidência de tuberculose.

Tuberculose, Epidemiologia em Portugal

A incidência da TB tem vindo a diminuir, ao longo dos anos, sendo que em 2014 a incidência foi de 20/100,000 habitantes. Apesar desta evolução favorável, os grandes centros urbanos, nomeadamente, a região do Porto, Lisboa, Setúbal e Algarve, apresentam incidências superiores, entre 20 a 50 casos por 100,000 habitantes no ano de 2014 [7] (figura 1).

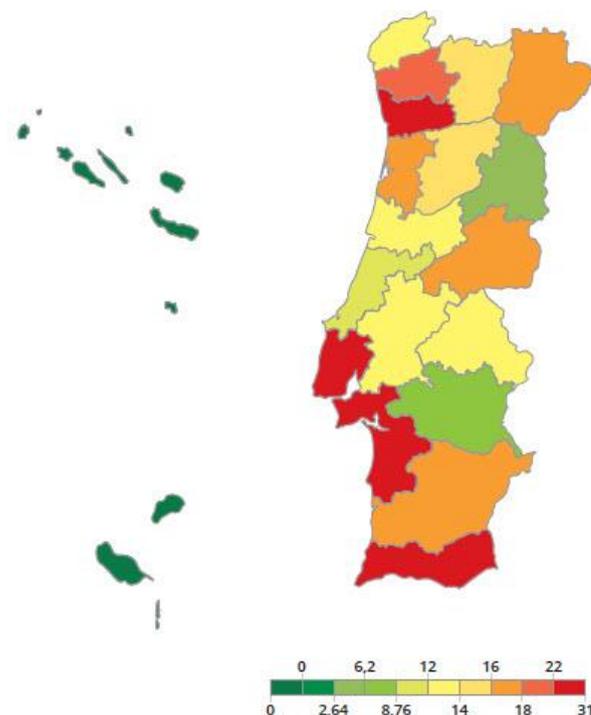


Figura 1 - Taxa de incidência TB por 100,000 em Portugal no ano 2014. Os grandes centros urbanos do Porto, Lisboa, Setúbal e Algarve são os que apresentam a maior incidência entre os 30 a 47 casos por 100,000 habitantes. *Fonte: Infecção VIH, Sida e Tuberculose em números - Direcção Geral de Saúde 2015*

Destes números, salienta-se o fato de 15,9% dos casos corresponderem a pessoas de nacionalidade estrangeira, e destes, 79,2% residiam em Portugal por um período de pelo menos 2 anos. Nesta população, a incidência de TB foi de 95,4/100,000 habitantes (cinco vezes superior à incidência nacional), o que demonstra ser um dado preocupante. A explicação destes números é pelo facto desta população estar inserida em comunidades de elevado risco para doença, bem como a ausência de imunização na infância.

De todos os casos notificados, 71,3% eram de doença pulmonar, destes 9,8% tiveram, igualmente, atingimento extrapulmonar. O género mais atingido foi o masculino com 63,4% de casos, sendo mais comuns nos adultos jovens (faixa etária entre os 35 e 54 anos).

Da população com o diagnóstico, cerca de 38% tinham comorbilidades associadas, sendo a mais comum a infeção com vírus da imunodeficiência (VIH), 13,3%. Em relação aos fatores de risco, no ano de estudo, 24,6% apresentavam consumos de álcool e/ou estupefacientes (figura 2).

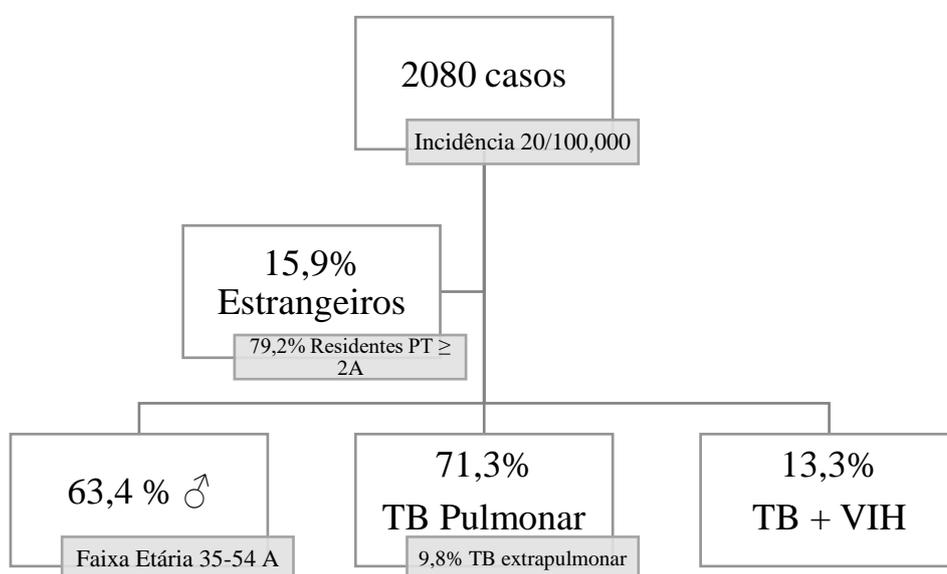


Figura 2 – Organograma dos dados epidemiológicos da incidência de Tuberculose em Portugal no ano de 2014. Em 2014 foram notificados 2264 casos de tuberculose dos quais, 2080 eram novos casos, representando uma taxa de notificação de 21,8/100,000 habitantes e uma taxa de incidência de 20,0/100,000 habitantes. PT (Portugal) *Fonte: Infecção VIH, Sida e Tuberculose em números - Direcção Geral de Saúde 2015.*

BACILO CALMETTE-GUÉRIN: A VACINA, ESTIRPES VACINAIS E SUAS LIMITAÇÕES

Originalmente, o BCG foi usado em humanos em 1921, sendo produzido a partir de uma estirpe de *Mycobacterium bovis* atenuada e comercializada pelo Pasteur Institut, em França [11]. Atualmente existem 22 estirpes, obtidas da estirpe original (tabela 2), comercializadas por mais de 40 laboratórios em todo o mundo [6]. O mecanismo vacinal, admitido ao BCG é o da deleção do *locus* RD-1 do *M. bovis*, que codifica nove genes, incluindo a proteína CFP-10 e o antígeno ESAT-6 (*6-kilo Dalton early secretory antigen target*). Ambos são fatores de virulência essenciais, que contribuem para a sua patogénese [2, 13]. O ESAT-6 é capaz de bloquear o receptor *Toll-like 2* (TRL-2) na superfície dos macrófagos e o complexo CFP-10/ESAT-6 faz uma inibição das espécies reativas de oxigénio (ROS). A ausência de expressão destas proteínas permite que o patógeno seja tolerado e os antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) tornam-se disponíveis para a ativação dos linfócitos CD4+ e CD8+, via células apresentadoras de antígenos, e consequente produção Interferão-gama (INF- γ) a citocina chave para a resposta imune contra Mtb. Todo o processo levará à formação de células de memória, capazes de induzir proteção no hospedeiro [3, 13].

Atualmente, as estirpes mais utilizadas são Denmark/Copenhagen strain 1331, Russian/Moscow e Tokyo-172 [2]. Moscow e Denmark strain 1331, apesar das diferenças genéticas e bioquímicas, apresentam um efeito protetor equivalente contra a TB [2].

Um estudo recente, demonstrou que, após a sequenciação do genoma de várias estirpes, 188 epítomos, essenciais para o reconhecimento antígeno da resposta imune, foram perdidos em diferentes graus em todas as estirpes do BCG, sendo que a Tokyo-172 é a que apresenta o maior número de epítomos ausentes, em relação às restantes [18]. Simultaneamente, esta estirpe apresenta uma menor eficácia em modelos animais, não se comprovando este fato nos estudos de eficácia realizados em humanos, nos diferentes países [2,6].

Tabela 2 – Estirpes vacinais. Cada continente apresenta diferentes estirpes vacinais. Atualmente existem 22 estirpes em comercialização. Apesar de não existir indicação formal para utilização de uma determinada vacina, foram criados critérios de qualidade pela OMS. (*adaptado de J.I. Moliva et al. – Vaccine 33 (2015) pág. 5037*)

Europa	Bulgarian BCG Sophia 222	Ásia	Chinese BCG Beijing
	Czechoslovakian BCG Prague		Chinese BCG Chandan
	Danish Denmark/Copenhagen strain 1331		Chinese BCG Lanzhou
	French Original Bacille Calmete et Guérin strain		Chinese BCG Shanghai
	French Pasteur 1173P2		Japanese BCG Tokyo strain 172
	Polish BCG Poland		
	Romanian BCG Romania 192		
	Russian BCG Moscow		
	Swedish BCG Gothenburg		
	UK Glaxo strain 1077		
América do Norte	American BCG Birkhaug	América do Sul	Mexican BCG Mexico
	American BCG Phipps		Brazilian BCG Moreau
	American BCG Tice		
	Canadian BCG Connaught		
	Canadian BCG Frappier		

Limitações da vacinação

O *M. bovis*, e o *Mtb* partilham um ancestral comum, mas evoluíram em diferentes ambientes com pressões de seleção distintas. As estirpes de BCG são cultivadas em meios artificiais e submetidas à manipulação humana enquanto que as estirpes *Mtb* sobrevivem no seu ambiente natural e estão sujeitas à pressão de seleção do sistema imunológico do hospedeiro. [13, 18]

As contínuas culturas para a produção de vacinas levaram a inevitáveis alterações genéticas e subsequente alteração da imunogenicidade vacinal [13]. Brosch et al., realizaram a sequenciação de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN), de

diferentes estirpes, e identificaram alterações nos fatores de regulação genética, sugerindo que vacinas desenvolvidas antes dos anos 30 e 40 seriam geneticamente e imunologicamente superiores às atualmente utilizadas em grande escala.

Outro fator que pode influenciar na eficácia é o meio de cultura utilizado. Existem dois meios globalmente difundidos, *Middlebrook 7H9* e *Sauton*. Num estudo realizado em 2012, num modelo animal, três estirpes foram cultivadas nos dois meios e concluiu-se que, embora o segundo consegue induzir uma maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, o BCG cultivado no meio de *Middlebrook 7H9* apresenta uma maior eficácia na proteção contra TB, quando exposto ao desafio com um aerossol contendo o patógeno [25].

Embora estes achados possam contribuir para explicar a variação nos resultados de eficácia das diferentes estirpes de BCG, Mangtani et al. considera as evidências anteriores insuficientes. [29]

Tabela 3 – Fatores que podem influenciar a eficácia vacinal. Dada a manipulação inerente à produção em massa as alterações genéticas das estirpes vacinais são inevitáveis, causando possíveis efeitos na sua eficácia. Outros fatores, como a influência de infecções concomitantes nos indivíduos, estado nutricional e questões logísticas relacionadas com armazenamento dos lotes vacinais também são pertinentes.

Fatores que podem influenciar a eficácia vacinal	1. Manipulação de culturas e produção em massa, podem provocar alterações genéticas que influenciam a imunogenicidade.
	2. Meios de cultura utilizados na produção. Ex.: meio de cultura <i>Middlebrook 7H9</i> proporciona estirpes com maior capacidade de proteção nos modelos animais;
	3. Relação cruzada entre o efeito protetor do BCG e a imunidade auferida pelo contato com micobactérias não tuberculosas;
	4. Condições logísticas relacionadas com o armazenamento dos lotes vacinais.
	5. Fatores intrínsecos dos indivíduos como estado nutricional, status de infecção VIH e outras comorbilidades.

Influência geográfica na eficácia vacinal e a influência de micobactérias não tuberculosas.

Desde os anos 60, discute-se a existência de variações na eficácia da vacina BCG, relacionadas com a latitude geográfica do local onde é administrada. A primeira evidência deste fenómeno surgiu em 1966, no estudo de Palmer e Long [41]. Num estudo realizado em Chingleput (1979) [66], no sul da Índia, e noutro conduzido no Reino Unido (1972) [69] verificou-se uma eficácia de zero e 80%, respetivamente. A tentativa de relacionar estas discrepâncias com a latitude dos locais onde foram conduzidos levou à hipótese que a luz solar, ou más condições de armazenamento de vacinas, em países com clima mais quente e/ou dificuldades económicas poderia explicar o padrão [67]; sendo que quanto mais próximo do equador menor a eficácia contra a TB, segundo a metanálise de Abubakar et. al [6].

Para além da latitude, foi postulada a hipótese de que, as populações residentes em locais com elevada exposição a micobactérias não tuberculosas ou de outros agentes infecciosos, poderiam interferir com a imunidade auferida pela vacinação. [29, 34]

Conduziram-se uma série de estudos, com objetivo de comparar a resposta imune inata de indivíduos residentes de um país tropical do continente africano (Malawi), e indivíduos do Reino Unido, que supostamente não estariam expostos a este tipo de micobactérias [34, 35, 38]. Mediu-se a quantidade de INF- γ , citocina responsável pela ativação dos macrófagos, essencial para a proteção contra o Mtb e igualmente contra outras micobactérias; após a incubação com os antígenos de derivados proteicos purificados (PPD) de um conjunto de micobactérias (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* - MAIS Complex) e Mtb em culturas celulares obtidas de amostras sanguíneas dos participantes do estudo. Verificou-se que os indivíduos não vacinados do Malawi, apresentavam um nível de imunidade superior em resposta aos PPD do Mtb, produzindo mais INF- γ em comparação com o grupo não vacinado inglês. (63% versus 22%) [35]. Os dados anteriores levaram à comparação das mesmas respostas, no grupo dos indivíduos vacinados de cada país,

sendo que os indivíduos do Reino Unido eram capazes de gerar mais INF- γ , invertendo-se a tendência inicial.

A hipótese postulada nos estudos anteriores [34-36, 38] é que a sensibilização aos antígenos micobacterianos pode induzir uma relação cruzada com o BCG, mascarando ou bloqueando a sua imunogenicidade. De forma a testar a premissa anterior, foi investigado o perfil de citocinas induzido pelo BCG em indivíduos do Reino Unido e Malawi, sendo que diferem em 27 citocinas [20]. Os últimos apresentam uma maior tendência para a produção de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , Interleucina-1 α e Interleucina-12), contudo esta diferença não comprova que, a proteção auferida pela vacinação é superior em relação aos indivíduos não expostos às micobactérias não tuberculosas. [20]

As evidências do envolvimento micobacteriano ambiental, na imunidade natural contra a tuberculose, em particular nos países tropicais, pode estar em desacordo com o fato de que a tuberculose é agora mais prevalente nas áreas onde essa imunidade natural deveria ser mais difundida [20, 29]. A evidência anterior poderá relacionar-se com fato dos indivíduos estarem inseridos em populações de elevada prevalência de TB e sujeitos a um grande número de contatos com portadores da doença. [6]

A influência sobre a epidemiologia da tuberculose depende de fatores socioeconômicos, estado nutricional, prevalência do VIH ou outras doenças infecciosas. Em suma, após a meta-análise de Mangtani et al. [29], o BCG tem uma maior eficácia em hospedeiros sem qualquer influência imunológica das micobactérias ambientais. Na tabela 3 são sumarizados os fatores que poderão influenciar a eficácia vacinal.

Mediadores de imunidade induzidos pela vacinação

O BCG induz citocinas pró-inflamatórias como o INF- γ e o *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) que são conhecidas pela ativação de macrófagos infetados pelo Mtb e restrição do crescimento do patógeno; e Interleucina-2 (IL-2) que promove a estimulação de linfócitos T-helper tipo 1 (Th1) e linfócitos CD8+. [20, 23]

Mais recentemente descobriu-se que a IL-17 é igualmente induzida pela vacinação, sugerindo uma resposta imune Th17 que é independente da imunidade mediada pelo interferão [37]. Sabe-se que a IL-17 encontra-se relacionada com processos de doenças autoimunes, contudo, foi demonstrado o seu papel na infecção Mtb, levando a uma regulação positiva de quimiocinas que aumentam o recrutamento de células Th1. [37]

Os efeitos protetores não se esgotam nos mediadores de imunidade, parecendo a haver, igualmente, indução de mudanças epigenéticas, via modificações das histonas do ADN das células de imunidade inata. [23]

As alterações do perfil inflamatório e epigenético podem ser passíveis de provocar alterações no metabolismo dos macrófagos, com aumento da glicólise e regulação positiva do metabolismo da glutamina e fosforilação oxidativa. Este processo de "imunidade treinada" é associado com reprogramação epigenética de monócitos ao nível de trimetilação da histona H3K4 [21, 23].

A persistência dos tipos celulares enunciados anteriormente, e formação de células de memória pela vacinação promovem um mecanismo de defesa contra as diversas formas TB. [26,41]

EFICÁCIA DA VACINAÇÃO NA PROTEÇÃO CONTRA TUBERCULOSE

O BCG é a única vacina capaz de prevenir a disseminação hematogénea de Mtb e consequentes formas severas da doença, como a meningite tuberculosa na infância. A vacina não previne a infecção primária com o patógeno nem reativação de infecção pulmonar latente [1, 11].

Segundo a meta-análise de Abdugar, et al. [6], o BCG protege contra ambas as formas da doença pelo menos até 10 anos, contudo os estudos não têm um tempo de follow-up suficiente para admitir um tempo de proteção superior, uma vez que poucos estudos foram prolongados até aos 15 anos de seguimento.

BCG Eficácia na Tuberculose Pulmonar

Apesar da variabilidade nos resultados de eficácia da vacinação contra a TB pulmonar, estima-se que esteja entre os 50 a 80 % nos adolescentes, mas com uma eficácia não completamente demonstrada nos adultos [3, 8]. Um estudo retrospectivo norueguês admite que a efetividade neste país é de 40% entre 20 a 40 anos, representando uma diminuição de metade o risco de adquirir a doença [4].

Apesar dos primeiros estudos de eficácia sugerirem diminuição de mortalidade e morbidade associadas a TB, estudos recentes sugerem que este efeito diminui na adolescência [3].

Em suma, existe a evidência que a BCG reduz o risco de ocorrência de TB pulmonar, quando administrada na infância e na idade escolar, tendo maior eficácia nos países mais distantes do equador. [6, 29]

BCG Eficácia na tuberculose disseminada e meningite tuberculosa

Segundo uma meta-análise realizada em 2014 por Mangtani et al. [29], a proteção proporcionada pela vacinação na idade infantil é superior à auferida contra TB pulmonar, quer seja no nascimento ou na idade escolar.

A vacinação tem uma eficácia de 73% na meningite tuberculosa e 77% na forma miliar. Desta forma das 100 milhões de doses de BCG administradas, por ano, existe a prevenção de 40,000 casos das formas extrapulmonares da doença. [12]

Duração da proteção: diferenças na proteção nas diferentes formas de Tuberculose

A duração da proteção é variável entre os diferentes estudos, postulando-se a hipótese da proteção auferida pelo BCG diminui aos longo dos anos, muito pela incapacidade de gerar um pool de células de memória suficientemente robusto e duradouro [6]. De forma a testar esta hipótese, o Medical Research Council realizou um estudo entre 1950 e 1970, incluindo 54,239 participantes, com idades entre 14 e 15 anos, para avaliar a eficácia da vacina BCG [70]. A incidência média anual correspondia a 98/100,000 habitantes entre indivíduos não-vacinados, e 23/100,000 habitantes nos vacinados. Contudo, a análise realizada a cada cinco anos revelou que a proteção diminuiu de 84%, nos primeiros cinco anos para, 59% entre os 10 e 15 anos. Comparando os dados anteriores, com a resposta imunológica, um estudo realizado em 2008 [26], que testou a resposta INF- γ aos PPD do Mtb em crianças vacinas, aos um, três e doze meses; e a um e quatorze anos após a vacinação neonatal verificou que a memória imunológica está presente, e é mensurável por pelo menos 14 anos na maioria dos vacinados, embora a magnitude da resposta diminua de três meses para 12 meses e de 12 meses para três anos após a vacinação.

Em relação às diferentes formas de apresentação da doença, a meningite tuberculosa, destaca-se por ser a forma de localização extrapulmonar mais frequente nas crianças. A proteção dura pelo menos, dez anos sendo superior nos primeiros três anos de vida, altura em que existe um maior risco de doença disseminada [6]. Um caso-controlo realizado no Brasil, estima um risco 12 vezes superior dos não vacinados em contrair a doença comparativamente com as crianças vacinadas. [72]

Relacionando os dados anteriores pode-se extrapolar a hipótese que a proteção auferida pelo BCG é superior pelo menos até aos três anos de idade.

A proteção contra a forma pulmonar, estima-se que dure até à adolescência, mas pouco se sabe sobre o risco de infeção pulmonar e a sua transmissão. A grande discrepância entre os resultados de eficácia da vacinação contra TB pulmonar não permite afirmar que a sua proteção dure até à idade adulta, altura em que há um maior risco de contrair a doença. [4]

PERSPETIVA FUTURA – NOVA VACINAS

Nas últimas duas décadas, ocorreu um progresso significativo no desenvolvimento de novas vacinas. Até à presente data, encontram-se 13 possíveis candidatos em estudo, tanto para a prevenção da doença como, para o tratamento da TB latente. [18, 19]

Estas vacinas são classificadas em: (1) vacinas preventivas, que são administradas tipicamente a recém-nascidos e são designadas por *vacinas vivas atenuadas*; (2) vacinas preventivas pós-exposição, que são dirigidas a adolescentes e adultos com TB latente e imunização com BCG prévia, chamadas *vacinas adjuvantes*; (3) *vacinas terapêuticas*, que devem ser administradas em associação com o tratamento da TB.

Vacinas vivas atenuadas

As vacinas vivas atenuadas apresentam o mesmo mecanismo imunológico do que a vacinação em uso. O objetivo das mesmas é a substituição do BCG, sendo administradas preferencialmente aos recém-nascidos. Atualmente existem duas vacinas em estudo: *BCG VPM1002* e *MTBVAC* (tabela 4).

VPM1002 é uma vacina que expressa BCG recombinante (rBCG) pela deleção de listeriolisina e urease. O VPM demonstrou segurança e imunogenicidade em ensaios clínicos randomizados de fase I, em comparação com o BCG em indivíduos saudáveis na África do Sul. Além disso, um estudo de fase II, para avaliar vacina em lactentes na África do Sul, mostrou-se segura e bem tolerada [30]. Atualmente encontra-se a ser avaliada em recém-nascidos expostos ao VIH.

MTBVAC é uma estirpe atenuada de *Mtb* com dois deleção de genes [31, 33]. Este mostrou proteção e segurança significativa em uma avaliação pré-clínica [39]. O candidato já completou um ensaio clínico de fase I.

Tabela 4 – Vacinas vivas atenuadas. A VPM1002 está a ser desenvolvida pelo Instituto Max Plank de Biologia de Infecção em colaboração com Vakzine Projekt Management (VPM) na Alemanha. MTBVAC está a ser desenvolvida pelo Tuberculosis Vaccine Initiative (TBVI) na Holanda em colaboração com a Universidade de Zaragoza, e Biofabri na Espanha. (*adaptado de S.H.E. Kaufmann et al. – International Journal of Infectious Diseases 56 (2017) pág. 265*)

Nome	Vacina	Modificação genética
VPM1002	rBCG	Integração cromossómica do gene codificador da listeriolisina (perfuração da membrana fagosomal); Deleção do gene da urease (acidificação do fagossoma)
MTBVAC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	A eliminação dos genes PhoP (factor de transcrição) e de fadD 26.

Vacinas Adjuvantes

O objetivo principal destas vacinas é aumentar a imunogenicidade do BCG. Estes candidatos são divididos em duas estratégias: *proteínas adjuvantes* (tabela 5) e *sistemas de vetores virais* (tabela 6). É importante lembrar que, segundo as novas políticas vacinais, estes tipos de adjuvantes não terão qualquer impacto, visto que só têm efetividade nas populações que tenham sido vacinadas com BCG.

Proteínas adjuvantes

A proteína de fusão **Hybrid 1 (H1)** corresponde aos antígenos imunodominantes, Ag85B e ESAT-6 [42]. Este híbrido H1 foi adjuvado com o Intercell (IC) 31 [43]. IC31 é uma combinação de peptídeo antimicrobiano e um oligodesoxinucleótido, recetor TLR-9 [44]. Um ensaio clínico de fase I mostrou, que esta vacina, induz respostas imunes significativas com excelente segurança [45, 46]. Mais recentemente, um ensaio clínico de fase II, comprovou a segurança e imunogenicidade em pacientes com tuberculose e infeção por VIH [48].

H4 é uma subunidade proteica que contém o antígeno Ag85B fundido com o antígeno TB10.4, que é expresso por BCG e formulado no adjuvante IC31 [49]. H4/IC31 melhorou a resposta imune induzida por BCG, causando uma proteção reforçada contra *Mtb* [50].

M72, poliproteína de 72 kDa, apresenta uma proteína de fusão dos antígenos de *Mtb* 32A e 39A. Reed et al. [51] mostraram que este candidato induz, a longo prazo, proteção contra a tuberculose em um modelo de primatas não-humanos.

Os estudos de fase II de M72/AS01 são clinicamente seguros e induziram respostas imunitárias significativas [52]. Mais recentemente, Idoko et al. [53] relataram segurança e imunogenicidade, quando administrada como um reforço ao BCG em crianças gambianas. Os ensaios de fase II, em adultos com doentes infetados com VIH, estão em curso.

Tabela 5 – Proteínas Ajuvantes. M72 foi desenvolvido pela Glaxo Smith Kline (GSK), Reino Unido. H1 foi desenvolvido pelo Statens Serum Institut (SSI) na Dinamarca, em colaboração com TBVI, Intercell e European & Developing Countries Clinical Trials Partnership. ID93 foi desenvolvido pelo Infectious Disease Research Institut, EUA, em colaboração com a Aeras. (adaptado de S.H.E. Kaufmann et al.– *International Journal of Infectious Diseases* 56 (2017) pág. 265)

<i>Proteínas Adjuvante</i>	<i>Vacina</i>	<i>Composição</i>
M72	AS01E	Lipossoma / TLR4 agonista
H1, H4, H56	IC31	Péptido catiónico / TLR9 agonista
ID93	GLA-SE	Emulsão de óleo em água / TLR4 agonista

Vetores Virais

Vetores virais, tais como os adenovírus, são uma estratégia importante para a o transporte de antígenos imunodominantes de micobactérias. Uma vantagem importante, é que podem ser administrados através das mucosas [54, 45].

AdAg85A, uma vacina recombinante de adenovírus, que expressa Ag85A micobacteriano. Vários estudos demonstraram proteção segura e significativa contra Mtb em modelos animais [56, 57]. Um estudo mais recente, relatou que AdAg85A melhora a proteção BCG-induzida em modelos animais, contra a infecção TB pulmonar [58]. Atualmente, esta vacina está num ensaio clínico de fase I.

Crucell Ad35 / AERAS-402 é um adenovírus 35 com défice de replicação, que expressa uma proteína de fusão de antígenos micobacterianos 85A, 85B e TB10.4. Esta candidata induz células T CD4 + polifuncionais, bem como uma resposta significativa de células T CD8 +; e potencia a sua acumulação. [59]

Estudos de fase I foram concluídos, em adultos saudáveis BCG-vacinados, em uma região na África do Sul [60]. Até à data, o Crucell Ad35/AERAS-402 encontra-se num ensaio de fase II em adultos vacinados com BCG e infetados pelo HIV na África do Sul.

MVA85A, um vírus modificado *Ankara* que expressa o antígeno de Mtb 85A, foi o primeiro ensaio clínico da vacina candidata TB desde o BCG [61, 62]. Vários estudos mostraram proteção e segurança significativa contra a TB em modelos animais [63, 64].

No entanto, em um estudo de Fase II com 2797 crianças BCG-vacinadas, MVA85A não mostrou nenhuma evidência de proteção contra TB. [65]

Tabela 6 – Vetores virais e antígenos adjuvantes. Ad5Ag85A foi desenvolvido pelo McMaster University, Canadá, em colaboração com a CanSino (China). Crucell Ad35 / AERAS-402 foi desenvolvido pela Crucell, Holanda, Aeras e Oxford no Reino Unido. MVA85A (*adaptado de S.H.E. Kaufmann et al. – International Journal of Infectious Diseases 56 (2017) pág. 265*).

<i>Vacina</i>	<i>Vetor</i>	<i>Antígeno</i>
Ad5Ag85A	Adenovírus 5	Antígeno 85A
Ad35	Adenovírus 35	Antígeno 85A, 85B e TB10.4
MVA85A	Vírus vaccinia Ankara modificado	Antígeno 85A

Vacinas terapêuticas

Atualmente, existem 3 vacinas terapêuticas em estudo: *M.vaccae*, *M.indicus pranii* e RUTI®, estas têm como alvo a Tuberculose Multirresistente (TB-MDR) e os doentes portadores da VIH. A importância desta abordagem prende-se com a necessidade de obtenção do maior benefício, com o menor número de opções farmacoterapêuticas. [22, 27, 28]

M.vaccae concluiu o estudo clínico de fase III, incluindo pacientes com MDR-TB e indivíduos co-infetados com HIV. Esta vacina mostrou-se segura, imunogénica e bem tolerada em adultos com HIV sofrendo de TB miliar. Também está sendo estudada para a prevenção da TB, após já ter sido aprovado para o tratamento adjuvante da TB, na China [68].

A primeira vacina a ser estudada, MVA85A, inicialmente demonstrava-se como uma revolução no novo panorama vacinal, contudo mostrou-se incapaz em mostrar superioridade em relação ao BCG. [65]

Neste momento a vacina com a melhor perspectiva de disseminação pelos cuidados de saúde é a *M.vaccae*, pela sua ação como vacina terapêutica, aguardando-se a sua capacidade de prevenção da doença seja comprovada nos próximos estudos. Na figura 3 são resumidas as principais vacinas em estudo. [68]

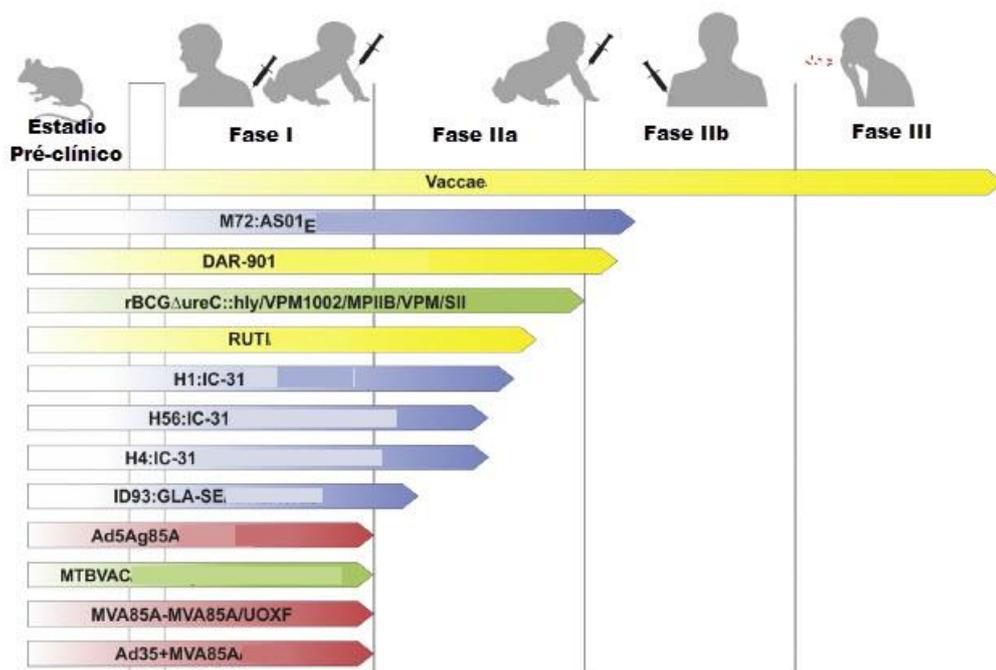


Figura 3 – Principais vacinas em estudo atualmente. As barras amarelas representam as vacinas terapêuticas, as barras verdes, as vacinas vivas atenuadas; as barras azuis, as proteínas adjuvantes; e as barras vermelhas, os vetores virais. (adaptado de S.H.E. Kaufmann et al.– *International Journal of Infectious Diseases* 56 (2017) pág. 264)

CONCLUSÃO

A vacinação provê a proteção contra as várias formas da doença tuberculosa, contudo a efetividade do BCG varia consideravelmente entre as populações a uma extensão que não pode ser atribuída apenas a um fator. [6, 11]

O BCG apresenta eficácia quando administrado a indivíduos sem qualquer tipo de exposição prévia, quer ao patógeno, quer a micobactérias não tuberculosas do meio. A proteção diminui com o tempo e não existem evidências que seja superior a 15 anos, uma vez que não se consegue comprovar a permanência do pool celular de memória, necessário para a montagem de uma resposta imune eficaz. [6]

O mecanismo imunológico adjacente à vacinação, apenas apresenta bons resultados nas formas graves de TB, pois impede a disseminação hematogénea do bacilo através da sua sequestração pelos macrófagos e ativação da fagocitose pelo INF- γ , citocina pró-inflamatória mais importante na patogénese da TB e da imunidade auferida

pelo BCG. No caso da meningite tuberculosa, existe uma boa cobertura sugerindo-se que a proteção possa ser eficaz pelo menos até aos três de idade [72], contudo são necessários mais estudos para comprovar esta hipótese.

Os estudos epidemiológicos em países europeus, com semelhanças ao nosso território, consideram a mudança para o novo plano vacinal custo-efetivo. Portugal apresenta incidência dentro do limiar considerado viável à passagem para a abordagem apenas de grupos de risco. Contudo estes dados têm que ser trabalhados, visto que as zonas de grande concentração urbana e população estrangeira representam um flagelo importante na taxa de incidência, estando acima do que é considerado aceitável para a mudança do paradigma vacinal. Um exemplo desta situação corresponde ao concelho da Amadora que apresentou uma incidência de 41,8/100.000 e 45,4/100.000 habitantes nos anos de 2011 e 2012, respetivamente. Estes dados correspondem a aumento da incidência em 3,6%, em relação ao ano de 2010, no mesmo concelho. [71]

Esta revisão sugere um estudo pormenorizado de cada uma destas áreas, com o apoio da Saúde Pública e Administrações Regionais de Saúde, de forma a caracterizar as populações e os seus contatos com portadores de doença ativa; identificando-se de forma mais precisa os grupos que necessitam da vacinação na infância e os que necessitam de um diagnóstico correto e tratamento eficaz da doença tuberculosa.

Os avanços conseguidos, a nível da produção de novas vacinas são significativos, mas não suficientes para a existência de alternativas ao BCG; havendo apenas uma vacina que completou os estudos de fase III, estando a sua eficácia ainda em estudo. Tendo em conta a duração limitada da proteção do BCG, o investimento nas vacinas adjuvantes pode demonstrar-se como uma possível solução, contudo em países que permaneçam a realizar a vacinação universal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization: Global tuberculosis report 2016. *WHO*. 2016:201.
2. Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Prospects in Mycobacterium bovis Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: Why does BCG fail to protect against tuberculosis? *Vaccine*. 2015;33(39):5035-5041.
3. Herzmann C, Sotgiu G, Schaberg T, Ernst M, Stenger S, Lange C. Childhood BCG vaccination does not influence control of Mycobacterium tuberculosis growth by human bronchoalveolar lavage cells. *Tuberculosis*. 2015;95(3):321-327.
4. Nguipod-Djomo P, Heldal E, Rodrigues LC, Abubakar I, Mangtani P. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: A retrospective population-based cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):219-226.
5. Styblo K, Danková D, Drápela J, et al. Epidemiological and clinical study of tuberculosis in the district of Kolin, Czechoslovakia. Report for the first 4 years of the study (1961–64). *Bull World Health Organ*. 1967; 37: 819–874.
6. Abubakar I, Pimpin L, Ariti C, et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2013;17(37):1-4.
7. Diniz A, Duarte R, Bettencourt J, Melo T de, Gomes M, Oliveira O. Infecção por VIH, SIDA e Tuberculose em números – 2015. *Direcção Geral de Saúde*. 2015:72.
8. Romanus V. First experience with BCG discontinuation in Europe. Experience in Sweden 15 years after stopping general BCG vaccination at birth. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1990; 65: 32–35.
9. George M. I – População e Vacina. Norma nº 001/2016 de 12/02/2016 *Direcção Geral da Saúde*. 2016:1-8.
10. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Criteria for discontinuation of vaccination programmes using Bacille Camille Guerin (BCG) in countries with low prevalence of tuberculosis. *Tuber Lung Dis*. 1994;75:179–80.
11. Dara M, Acosta CD, Rusovich V, Zellweger JP, Centis R, Migliori GB. Bacille Calmette-Guérin vaccination: The current situation in Europe. *Eur Respir J*. 2014;43(1):24-35.
12. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006;367(9517):1173-1180.
13. Davenne T, McShane H. Why don't we have an effective tuberculosis vaccine yet? *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(8):1009-1013.
14. Salo EP. BCG in Finland: changing from a universal to a selected programme. *Euro Surveill*. 2006;11(3):18–20
15. Usher C, Adams R, Schmitz S, et al. Evaluating the neonatal BCG vaccination programme in Ireland. *Arch Public Heal*. 2016;74(1):28.
16. Fletcher HA. Profiling the host immune response to tuberculosis vaccines. *Vaccine*. 2015;33(40):5313-5315.
17. Da Costa C, Walker B, Bonavia A. Tuberculosis Vaccines - state of the art, and novel approaches to vaccine development. *Int J Infect Dis*. 2015;32:5-12.

18. Zhang W, Zhang Y, Zheng H, et al. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. *PLoS One*. 2013;8(8):e71243.
19. Méndez-Samperio P. Global Efforts in the Development of Vaccines for Tuberculosis: Requirements for Improved Vaccines Against Mycobacterium tuberculosis. *Scand J Immunol*. 2016;84(4):204-210.
20. Brandt L, Cunha JF, Olsen AW, et al. Failure of the Mycobacterium bovis BCG Vaccine: Some Species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis. *Infection and Immunity*. 2002;70(2):672-678.
21. Kaufmann SHE. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. *J Intern Med*. 2010;267(4):337-353.
22. Prabowo SA, Groschel MI, Schmidt ED et al. Targeting multidrug- resistant tuberculosis (MDR-TB) by therapeutic vaccines. *Med Microbiol Immunol*. 2013:95–104
23. Arts RJW, Carvalho A, Rocca C La, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep*. 2016;17(6):2562-2571.
24. Rodriguez-Guell E, Agustí G, Corominas M, Cardona P, Luquin M, Juli an E. Mice with pulmonary tuberculosis treated with Mycobacterium vaccae develop strikingly enhanced recall gamma interferon responses to M. vaccae cell wall skeleton. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:893–6.
25. Venkataswamy MM, Goldberg MF, Baena A, et al. In vitro culture medium influences the vaccine efficacy of Mycobacterium bovis BCG. *Vaccine*. 2012;30(6):1038–1049.
26. Weir RE, Gorak-Stolinska P, Floyd S, et al. Persistence of the immune response induced by BCG vaccination. *BMC Infect Dis*. 2008;8:9.
27. Yadava A, Suresh NR, Zaheer SA, Talwar GP, Mukherjee R. T-cell responses to fractionated antigens of Mycobacterium, a candidate antileprosy vaccine, in leprosy patients. *Scand J Immunol*. 1991;34:23–31.
28. Vilaplana C, Montan e E, Pinto S et al. Double- blind, randomized, placebo-controlled phase I clinical trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine*. 2010;28:1106–16.
29. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*. 2014;58(4):470-480.
30. Grode L, Ganoza CA, Brohm C, Weiner J III, Eisele B, Kaufmann SH. Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open label randomized clinical trial. *Vaccine*. 2013;31:1340–8.
31. Perez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martin C. An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence. *Mol Microbiol*. 2001;41:179–87.
32. Black GF, Weir RE, Chaguluka SD, et al. Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, non-mycobacterium bovis BCG-vaccinated Malawian young adults. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(4):602-611.
33. Walker KB, Brennan MJ, HoMM EJ et al. The second Geneva Consensus: recommendations for novel live TB vaccines. *Vaccine*. 2010;28:2259–70.
34. Bennett AR, Gorak-Stolinska P, Ben-Smith A, et al. The PPD-specific T-cell clonal response in UK and Malawian subjects following BCG vaccination: A new repertoire evolves over 12 months. *Vaccine*. 2006;24(14):2617-2626.
35. Black GF, Weir RE, Floyd S, et al. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: Two randomised controlled studies. *Lancet*. 2002;359(9315):1393-1401.

36. Lalor MK, Floyd S, Gorak-Stolinska P, et al. BCG vaccination induces different cytokine profiles following infant BCG vaccination in the UK and Malawi. *J Infect Dis.* 2011;204(7):1075-1085.
37. Lalor MK, Smith SG, Floyd S, et al. Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine.* 2010;28(6):1635-1641.
38. Lalor Maeve K, Ben-smith A, Gorak-stolinska P, et al. Population differences in immune responses to BCG in infancy. *J Infect Dis.* 2009;199(6):795-800.
39. Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J et al. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live- attenuated M. tuberculosis–based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine.* 2013;31:4867–73.
40. Smith SG, Zelmer A, Blitz R, Fletcher HA, Dockrell HM. Polyfunctional CD4 T-cells correlate with in vitro mycobacterial growth inhibition following Mycobacterium bovis BCG-vaccination of infants. *Vaccine.* 2016;34(44):5298-5305.
41. Cruz A, Torrado E, Carmona J, et al. BCG vaccination-induced long-lasting control of Mycobacterium tuberculosis correlates with the accumulation of a novel population of CD4+IL-17+TNF+IL-2+ T cells. *Vaccine.* 2015;33(1):85-91.
42. Weinrich OA, Van PL, Meng OL, Birk RP, Andersen P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and ESAT-6. *Infect Immun.* 2001;69:2773–2778.
43. Dietrich J, Aagaard C, Leah R et al. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol.* 2005;174:6332–9.
44. Schellack C, Prinz K, Egyed A et al. IC31, a novel adjuvant signaling via TLR9, induces potent cellular and humoral immune responses. *Vaccine.* 2006;24:5461–72.
45. Ottenhoff T, Doherty T, van Dissel J et al. First in humans: a new molecularly defined vaccine shows excellent safety and strong induction of long-lived Mycobacterium tuberculosis-specific Th1-cell like responses. *Hum Vaccine.* 2010;6:1007–15.
46. Van Dissel J, Arend S, Prins C et al. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in naive human volunteers. *Vaccine.* 2010;28:3571–81.
47. van Dissel JT, Soonawala D, Joosten SA et al. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31(R) promotes strong and long-lived Mycobac- terium tuberculosis specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. *Vaccine.* 2011;29:2100–9.
48. Reither K, Katsoulis L, Beattie T et al. Safety and immunogenicity of H1/IC31, an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4+ lymphocyte counts greater than 350 cells/mm³: a phase II, multi- centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *PLoS One.* 2014;9:e114602.
49. Aagaard C, Hoang TT, Izzo A et al. Protection and polyfunctional T cells induced by Ag85B-TB10.4/IC31 against Mycobacterium tuberculosis is highly dependent on the antigen dose. *PLoS One.* 2009;4: e5930.
50. Billeskov R, Elvang T, Andersen P, Dietrich J. The HyVac4 subunit vaccine efficiently boosts BCG-primed anti-Mycobacterial protective immunity. *PLoS One.* 2012;7:e39909.
51. Reed SG, Coler RN, Dalemans W et al. Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:2301–6.
52. Montoya J, Solon J, Rosanna S et al. A randomized, controlled dose finding phase II study of the M72/AS01 candidate tuberculosis vaccine in healthy PPD positive adults. *J Clin Immunol.* 2013;33:1360–75.

53. Idoko O, Olumuyiwa A, Patrick O et al. Safety and immunogenicity of the M72/AS01 candidate tuberculosis vaccine when given as a booster to BCG in Gambian infants: an open-label randomized controlled trial. *Tuberculosis*. 2014;94:564–78.
54. Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM, Anderson RJ, Brookes RH, Hill AV. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol*. 2003;171:1602–9.
55. Wang J, Thorson L, Stokes RW et al. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *J Immunol*. 2004;173:6357–65.
56. Xing Z, McFarland C, Sallenave J, Izzo A, Wang J, McMurray D. Intranasal mucosal boosting with an adenovirus-vectored vaccine markedly enhances the protection of BCG-primed guinea pigs against pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2009;4:e5856.
57. Perez de Val B, Villarreal-Ramos B, Nofrarias M et al. Goats primed with Mycobacterium bovis BCG and boosted with a recombinant adenovirus expressing Ag85A show enhanced protection against tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19:1339–47.
58. Perez de Val B, Vidal E, Villarreal-Ramos B et al. A multi-antigenic adenovirus-vectored vaccine improves BCG-induced protection of goats against pulmonary tuberculosis infection and prevents disease progression. *PLoS One*. 2013;8:e81317.
59. Radosevic K, Wieland CW, Rodriguez A et al. Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of g interferon. *Infect Immun*. 2007;75:4105–15.
60. Abel B, Tameris M, Mansoor N et al. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:1407–17.
61. McShane H, Pathan AA, Sander CR et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*. 2004;10:1240–4.
62. McShane H, Pathan A, Sander C, Goonetilleke N, Fletcher H, Hill. Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis*. 2005;85:47–52.
63. Williams A, Goonetilleke NP, McShane H et al. Boosting with poxviruses enhances Mycobacterium bovis BCG efficacy against tuberculosis in guinea pigs. *Infect Immun*. 2005;73:3814–6.
64. Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Cockle PJ et al. Viral booster vaccines improve Mycobacterium bovis BCG induced protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun*. 2009;77:3364–73.
65. Tameris MD, Hatherill M, Landry BS et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2013;381:1021–8.
66. Tuberculosis Prevention Trial Madras. Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention. *Indian J Med Res*. 1980; 72 (suppl): 1-74
67. Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*. 1995;346(8986):1339-1345.
68. Kaufmann SHE, Weiner J, Reyn CF von. Novel approaches to TB vaccine development. *Int J Infect Dis*. 2016;56:263-267.

Vacinação contra a Tuberculose – Será o fim do BCG na Europa?

69. Medical Research Council. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Bull World Health Organ.* 1972;46:371–85.
70. Hart PD, Sutherland I. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br Med J.* 1977;2:293-5
71. ACES Amadora. Plano Local de Saúde Amadora 2014-2016. 2014:19.
http://www.cmamadora.pt/images/artigos/saudavel/noticias/pdf/2014/plano_local_saude.pdf.
(acedido a 25 de Novembro de 2016)
72. Nascimento C, Luiz E, Mota A, Silva L. Protective effect of intradermal BCG against tubercular meningitis. *Bol Of Saint Panam* 1991;110(1): 26-32