

**Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
Fundação Oswaldo Cruz**

*Imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre
amarela: implicações para o Programa Nacional de Imunizações*

Aluno doutorado: Guilherme Côrtes Fernandes

Orientador: Luiz Antonio Bastos Camacho

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*Tese para defesa de Doutorado em Saúde Pública
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
Fundação Oswaldo Cruz*

*Título da tese: Imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre
amarela: implicações para o Programa Nacional de Imunizações*

*Aluno doutorado: Guilherme Côrtes Fernandes
Orientador: Luiz Antonio Bastos Camacho*

Ano de conclusão: 2010

*Dedico às crianças.
Ao que já foi da vida e a tudo que ainda será.
Vó Mabel e Vó Lourdes,
Ciça, Tatá, Pepa, Lucas e Camille
e suas históricas (e futuras) fugas, choros e corridas das salas de vacinas...*

Agradecimentos

Ministério da Saúde

CNPQ

Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Dra. Maria de Lourdes Souza Maia e equipe da Assessoria Clínica (ASCLIN)

Dra. Anna Yoshida Yamamura e equipe do Laboratório de Tecnologia em Vírus

Instituto Oswaldo Cruz – IOC/ FIOCRUZ

Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira, Chefe do Laboratório de Flavivírus e equipe.

Dra. Marilda Mendonça Teixeira de Siqueira, Chefe do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, e equipe.

Instituto Evandro Chagas

Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, Chefe do Departamento de Virologia

Sociedade Brasileira de Pediatria, Departamento de Infectologia

Dr. Reinaldo Menezes Martins

Sociedade Mineira de Pediatria

Dr. José Orleans da Costa

Secretaria de Saúde de Brasília, Distrito Federal

Dra. Ivone Perez de Castro e equipe.

Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo

Dra. Helena Keico Sato, Coordenadora do CVE-SP, e equipe.

Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais

Dr. José Geraldo Leite Ribeiro e equipe.

Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande, Mato Grosso do Sul

Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto, São Paulo

Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão das Neves, Minas Gerais

Secretaria Municipal de Saúde de Contagem, Minas Gerais

Secretaria Municipal de Saúde de Juiz de Fora, Minas Gerais

Secretaria Municipal de Saúde de Lima Duarte, Minas Gerais

Secretaria Municipal de Saúde de Matias Barbosa, Minas Gerais

Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora

Dr. José Limar de Oliveira e Dr. Renato Loures

Resumo: A efetividade das vacinas contra febre amarela tem sido aferida indiretamente pelo sucesso das ações de vacinação em muitos países. Em que pese o sucesso das ações de vacinação no controle da doença, há questões pendentes sobre a imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas disponíveis que precisam ser avaliadas para definição de estratégias das ações básicas de imunização na infância. Em um estudo observacional com a vacina 17DD, foi demonstrada menor imunogenicidade vacinal em crianças, principalmente com a aplicação simultânea da vacina contra sarampo (Grupo Colaborativo, 2003). No atual calendário básico de imunizações há a possibilidade da aplicação simultânea das vacinas contra febre amarela e da vacina tríplice viral. Um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, foi realizado para investigar a imunogenicidade e a reatogenicidade das vacinas contra febre amarela (17D213/77 e 17DD) em crianças (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007) e definir os possíveis determinantes. A relevância deste estudo está na capacidade de obter dados para responder questões relativas às estratégias do Programa Nacional de Imunizações necessárias para a definição das políticas públicas para controle e prevenção da doenças. A proporção de soroconversão e soropositividade pós-vacinal contra febre amarela em crianças aos 9 e 12 meses de idade foi menor do que a observada previamente em ensaio clínico em adultos. Não houve diferença na imunogenicidade ou reatogenicidade das subcepas de vacinas contra febre amarela testadas (17D e 17DD). A situação sorológica das mães não foi um fator determinante de menor soroconversão em crianças menores de 12 meses de idade, porém a presença de anticorpos pré-vacinais contra febre amarela em crianças menores de 12 meses está associada a menor soroconversão. A vacinação simultânea contra febre amarela e tríplice viral afeta substancialmente a resposta imunológica para rubéola e febre amarela, mas não a vacina contra sarampo, o que pode influenciar de forma relevante as estratégias para controle da febre amarela e rubéola. A presença de anticorpos contra dengue, independentemente de seu título, não interfere na imunogenicidade ou no padrão de reatogenicidade das vacinas contra febre amarela aplicadas em crianças residentes em áreas endêmicas. A proporção estimada de soronegatividade após duas doses de vacina contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade foi de apenas 1,25%. A ocorrência de casos esporádicos e surtos não permite que a idade recomendada para a primovacinação seja deslocada para idades em que a vacina mostrou maior imunogenicidade. Uma alternativa seria alterar o esquema primário de vacinação contra febre amarela para duas doses: mantendo a primeira dose aos 9 meses e aplicando uma segunda dose após 12 meses de vida. A aplicação da segunda dose aos 18 meses de idade seria conveniente para não coincidir com outras vacinas do calendário de imunizações. A primeira dose aos 9 meses seria mantida para proteger indivíduos de zonas endêmicas, o mais cedo possível. A segunda dose permitiria (1) imunizar um número adicional de crianças que não tinham respondido à primovacinação (falha primária), (2) reforçar respostas à primovacinação, e (3) ampliar as oportunidades de vacinar aqueles que não haviam recebido a primovacinação aos 9 meses.

Palavras-chave: vacina contra febre amarela; imunogenicidade; reatogenicidade

Abstract: The effectiveness of yellow fever vaccines has been indirectly assessed by the success of vaccination in many countries. Despite the success of vaccination efforts to control the disease, there are still pending issues about immunogenicity and reactogenicity of available vaccines that need to be addressed in order to define the strategies for basic efforts for immunization in children. In an observational study with the 17DD vaccine, lower immunogenicity was observed in children, especially with simultaneous application of measles vaccine (Grupo Colaborativo, 2003). In the current basic immunization calendar, simultaneous vaccination against yellow fever and MMR is a possibility. A multicenter, randomized, double-blind study was conducted to investigate the immunogenicity and reactogenicity of yellow fever vaccines (17D213/77 and 17DD) in children (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007) and define possible determinant reasons. The relevance of this study lies in its ability to obtain data to answer questions related to the National Immunization Program strategies needed to define public policies to control the disease. The proportion of post-vaccination seroconversion and seropositivity against yellow fever in children 9 and 12 months old was lower than previously observed in a clinical trial with adults. There was no difference in immunogenicity or reactogenicity between the yellow fever vaccine substrains that were tested (17D and 17DD). Mothers' serostatus was not a determining factor for lower seroconversion in children under 12 months of age, but the presence of pre-vaccination antibodies against yellow fever in children under 12 months is associated with lower seroconversion. Simultaneous vaccination against yellow fever and MMR substantially affects the immune response to rubella and yellow fever, but not to measles vaccination, which can have a relevant influence on the strategies to control yellow fever and rubella. The presence of dengue antibodies, regardless of titration, does not interfere in immunogenicity or reactogenicity pattern of yellow fever vaccines applied in children living in endemic areas. The estimated proportion of seronegativity after 2 doses of yellow fever vaccination in children under 2 years of age was of only 1.25%. The occurrence of sporadic cases and outbreaks makes it impossible to raise the recommended age for first vaccination to ages when the vaccines has demonstrated higher immunogenicity. An alternative would be to alter the primary vaccination regimen against yellow fever to 2 doses: one at 9 months and another after the first year of life. The application of a second dose at 18 months of age would be convenient since it would not be applied with other vaccines in the current calendar. The first dose at 9 months would be kept to protect individuals in endemic areas at the earliest possible moment, while the second dose would (1) allow immunization of an additional number of children that did not respond to the first vaccine (primary failure), (2) strengthen responses to the first vaccine, and (3) widen the opportunities to vaccinate individuals who did not receive the first dose at 9 months.

Keywords: yellow fever vaccine; immunogenicity; reactogenicity

Sumário	Página
Lista de tabelas e figuras	ix
Lista de abreviaturas e siglas	x
Introdução	1
Objetivos	12
Método	13
Considerações sobre a eticidade do estudo	21
Referências	24
Artigo 1 <i>Neurological adverse events temporally associated to mass vaccination against yellow fever in Juiz de Fora, Brazil, 1999–2005</i>	28
Artigo 2 <i>Imunogenicidade e reatogenicidade da vacinação contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade em área endêmica de dengue.</i>	34
Artigo 3 <i>Resposta humoral a revacinação com a vacina contra febre amarela 17DD em crianças menores de 2 anos de idade.</i>	54
Considerações finais <i>Recomendações sobre a vacinação contra febre amarela revisitadas: implicações dos resultados dos estudos com duas vacinas contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade para as estratégias do Programa Nacional de Imunizações.</i>	73
Anexos	
Anexo 1 Artigo de publicação do protocolo <i>Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program. Vaccine 2007; (25): 3118–3123</i>	96
Anexo 2 Termo de consentimento livre e esclarecido	103
Anexo 3 Questionário.	109
Anexo 4 Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	122
Anexo 5 Grupo Colaborativo de estudos com as vacinas contra febre amarela	127

Lista de tabelas e figuras

	Página
Quadro 1: Eventos adversos neurológicos associados à vacina 17D publicados em relatos de caso e série de casos	9
Quadro 2: Estudos observacionais com descrição de eventos adversos neurológicos associados à vacina 17D	10
Artigo 1	
Table 1: Annual rate (per 100,000 doses) of adverse events following immunization (AEFI) and aseptic meningitis rate (per 100,000 inhabitants)	30
Table 2: Rates of adverse event following immunization by age group	31
Figure 1: Distribution by year and age group of aseptic meningitis cases, Juiz de Fora Brazil, 1999–2005.	31
Artigo 2	
Tabela 1: Características dos lactentes e distribuição por tipo de vacina aplicada nos centros colaboradores	42
Tabela 2: Proporção de soropositividade e médias de títulos de anticorpos contra febre amarela e dengue segundo centro colaborador	43
Figura 1: Histogramas de distribuição de nível de anticorpos neutralizantes (PRNT) específicos antes (a) e após (b) a vacinação contra febre amarela e da diferença do logaritmo (c) do nível de anticorpos neutralizantes (PRNT) antes e após a vacinação contra febre amarela.	43
Tabela 3: Frequência de duplicação e quadruplicação de anticorpos contra febre amarela (PRNT) segundo título de anticorpos contra dengue	45
Tabela 4: Modelos de regressão linear multivariada para variável dependente sorologia pré-vacinal contra febre amarela (logPRNT)	45
Tabela 5: Modelo de regressão linear para variável dependente sorologia pós-vacinal contra febre amarela (logPRNT)	46
Artigo 3	
Tabela 1: Tipo de resposta humoral após a segunda dose da vacina contra a febre amarela segundo faixa etária	63
Figura 1: Distribuição de nível de anticorpos neutralizantes (logPRNT) contra febre amarela antes e após a primovacinação segundo resposta humoral após a segunda dose da vacina antiamarilica	64
Tabela 2: Tipo de resposta humoral após a segunda dose da vacina contra a febre amarela em crianças vacinadas simultaneamente com as vacinas contra febre amarela e triviral (sarampo, caxumba, rubéola).	65

Lista de abreviaturas e siglas

PRNT	Plaque Reduction Neutralization Test
mUI/ml	Miliunidades Internacionais/mililitro
MLD50	Minimal Lethal Dose 50
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
PNI	Programa Nacional de Imunizações

Introdução

A febre amarela é uma doença infecciosa transmitida por vetores hematófagos da família *Culicidae*, especialmente dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus*. O vírus da febre amarela é um flavivírus pertence à mesma família do vírus da dengue (Vasconcelos, 2003). Há um único sorotipo do vírus da febre amarela, porém com genótipos diferentes. Não se sabe se as diferenças genotípicas têm implicação na patogenicidade viral (Vasconcelos, 2003). A apresentação clínica inclui formas leves com sintomatologia febril inespecífica de início súbito (até 80% das infecções) e formas graves com alta letalidade, não havendo tratamento específico para a doença (Benenson, 1990; Monath, 1995).

Atualmente a febre amarela é endêmica em países da América do Sul e África. Cerca de 90% dos casos anuais ocorrem no continente africano (aproximadamente 5.000 casos). Na América do Sul a taxa de transmissão de febre amarela é menor (cerca de 300 casos anuais) devido principalmente às elevadas coberturas vacinais. Entre 1970 e 2001 foram notificados 4.543 casos de febre amarela na América do Sul, sendo 18,7% no Brasil (Vasconcelos, 2003; Barnett, 2007).

A vacinação em massa na América do Sul levou à redução na incidência de febre amarela na região, o que constitui forte evidência de sua efetividade, sendo a imunização considerada o método mais efetivo para controle da doença. Outros métodos de controle, como o vetorial, têm se mostrado atualmente pouco efetivos apesar de já terem sido responsáveis pelo controle da doença em algumas regiões (Barnett, 2007). O ciclo silvestre da doença torna sua erradicação impossível devido a perpetuação do vetor em seu ciclo silvestre, e força a utilização da vacina indefinidamente (WHO, 1998). A vacinação no Brasil foi intensificada no final da década de 90 e início da década de 2000, após casos de febre amarela terem ocorrido em regiões e populações com menor cobertura vacinal (Barnett, 2007). Considera-se que há no Brasil duas áreas epidemiológicas com diferentes riscos de transmissão (área endêmica e área indene). Estima-se que cerca de 80% da população residente na área endêmica e de transição esteja vacinada, porém a cobertura vacinal na área indene é muito baixa (Vasconcelos, 2003).

Embora não se registrem casos de febre amarela urbana no Brasil desde 1942, a ocorrência de epidemias da febre amarela silvestre na região Sudeste próximo a centros urbanos e a abundância do mosquito *Aedes aegypti* em zonas urbanas próximas de zonas enzoóticas indicam o risco para epidemias urbanas (Ministério da Saúde, 2000). No Brasil, a utilização da vacina contra febre amarela tem aumentado em resposta à expansão da área

endêmica e à ocorrência de epidemias próximas a grandes centros urbanos infestados por *A. aegypti* (Ministério da Saúde, 2001).

As vacinas contra febre amarela

Em 1927 o vírus da febre amarela foi isolado de um paciente africano (cepa Asibi) que após passagens sequenciais e atenuação da virulência originou a cepa 17D e as duas subcepas (17D-204 e 17DD) que são utilizadas para a produção das atuais vacinas contra febre amarela (Barnett, 2007; Monath, 2005). Vacinas contra a febre amarela estão disponíveis desde 1937. A vacina da subcepa 17DD tem demonstrado segurança e efetividade no controle da febre amarela no Brasil ao longo de 7 décadas. A Organização Mundial da Saúde recomenda a imunização contra a febre amarela no calendário básico de vacinas para crianças maiores de 6 meses de idade em zonas endêmicas. No Brasil, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) alterou a idade recomendada para a primo-vacinação de 6 meses para 9 meses nas regiões endêmicas e de transição, com reforço após 10 anos (Ministério da Saúde, 1999). A recomendação vale para aqueles que residem ou que irão viajar para regiões endêmicas de febre amarela.

A identificação entre 1938 e 1941 de algumas subcepas vacinais pouco imunogênicas e outras com maior neurovirulência levou à necessidade de padronização da produção com controle no número de passagens para produção da vacina (sistema lote semente) (Monath, 2005). As vacinas atuais são de vírus vivos e atenuados, produzidos pelo sistema de lote semente sob normas internacionais padronizadas de fabricação definidas desde 1945 (Monath *et al.*, 2002; Monath, 2005), que limita o número de passagens do vírus diminuindo assim o risco de mutações (Freestone, 1994). Em 1966 foi identificada contaminação da vacina 17D pelo vírus da leucose aviária mas sua patogenicidade em humanos nunca foi demonstrada. Na década de 70 foram desenvolvidos lotes sementes livres da leucose aviária, sendo o lote originário da subcepa 17D-204 mantido como estoque referência (designado 17D-213/77) e disponível para novos fabricantes desde 1977 (WHO, 1984; WHO, 1987, Monath *et al.*, 2002). As vacinas recomendadas atualmente pela Organização Mundial de Saúde são originárias das subcepas 17DD e 17D-204 e consideradas seguras e imunogênicas (WHO, 1976; Monath, 2004). Essas subcepas apresentam pequenas diferenças na sequência de nucleotídeos (dos Santos, 1995) que podem representar variações em imunogenicidade e reatogenicidade entre as subcepas vacinais. A análise de dados comparativos sobre o perfil de imunogenicidade e reatogenicidade das subcepas 17D e 17DD na população alvo de

vacinação em áreas endêmicas (crianças menores de 1 ano) é de extrema relevância para a definição das políticas públicas para controle da doença.

Considerações sobre a imunogenicidade vacinal

De modo geral, a vacinação contra febre amarela produz soroconversão maior que 95% em adultos e imunidade duradoura, aparentemente superior a 10 anos (Barnett, 2007). Após a vacinação em indivíduos não imunizados, a viremia detectável é, em geral, breve e tem níveis baixos, com picos entre o terceiro e sétimo dias após a vacinação (Monath, 2004; Camacho *et al.*, 2005). A produção de anticorpos neutralizantes induzidos pela vacina 17D é considerada o principal marcador de proteção contra futuras infecções. A evidência da correlação entre a presença de anticorpos neutralizantes e a proteção foi demonstrada pela imunização de macacos e camundongos (Monath, 2005). Quatro a sete dias após a vacinação com vacinas 17D é observado rápido surgimento de anticorpos neutralizantes tipo IgM e elevação de níveis de interferon gama (Monath, 2005). Os anticorpos do tipo IgM aumentam em média até 14-17 dias após a exposição ao vírus, diminuindo em seguida. Anticorpos tipo IgM permanecem detectáveis geralmente por 2 a 3 meses. No entanto, tem sido observado que alguns primo-vacinados não expostos à infecção natural nem revacinados, persistem com anticorpos IgM detectáveis por MAC Elisa por pelo menos um ano, se desconhecendo as razões dessa persistência (Vasconcelos PFC, informação pessoal). Já os anticorpos do tipo IgG e IgA surgem na segunda ou terceira semana após a vacinação e persistem por tempo prolongado (Monath, 1996; Poland *et al.*, 1981). Cerca de 90% dos indivíduos vacinados desenvolvem anticorpos neutralizantes 10 dias após a vacinação, sendo que 99% dos vacinados alcançam níveis protetores de anticorpos 30 dias após a vacinação (Barnett, 2007). Doses de 100 a 200 LD₅₀ resultam em soroconversão de mais de 90% dos vacinados (Monath, 2004). A presença de anticorpos antes da imunização teve efeito supressor da resposta sorológica com anticorpos neutralizantes em alguns estudos (Smith *et al.*, 1962; Lopes *et al.*, 1988b), enquanto um aumento de 2 a 23 vezes no título de anticorpos neutralizantes foi observado em outro (Wisserman & Sweet, 1962). As indicações são de que uma dose maior de vírus é necessária para reforçar imunidade preexistente (Fox & Cabral, 1943).

Há diferentes métodos para aferição de imunidade contra febre amarela: os testes de neutralização viral (*constant serum-varying virus neutralization test* e *serum dilution-constant virus plaque-reduction neutralization test* – PRNT); o teste de inibição de hemaglutinação; o teste de fixação de complemento; e o ELISA. O PRNT é considerado o teste mais sensível e

mais específico para febre amarela (Dobler *et al.*, 1997, Niedrig *et al.*, 1999) produzindo resultados quantitativos (em Unidades Internacionais) que se correlacionam com proteção. Apesar da menor sensibilidade, o *constant serum-varying virus neutralization test* teve seu *cut-off* padronizado (LNI 0,7) por meio da correlação com proteção em macacos expostos ao vírus (Monath, 2005). Para medida de imunidade em humanos é utilizada a diferença de títulos pré e pós-vacinais expressos em LNI, que foi validada para ser usada em ensaios clínicos (Monath, 2002). O teste de inibição de hemaglutinação é menos sensível do que os testes de neutralização. Apesar de o teste de fixação de complemento ser raramente utilizado, ele pode ter utilidade na identificação de indivíduos com exposição prévia a flavivírus, pois esses indivíduos não desenvolvem anticorpos fixadores de complemento após vacinação contra febre amarela (Monath, 2005). Já o ELISA, apesar da baixa sensibilidade para detecção de IgG após primo-vacinação contra febre amarela, apresenta maior sensibilidade para detecção de anticorpos em indivíduos revacinados (Monath, 2005).

A vacina produzida a partir de vírus da subcepa 17DD demonstrou desempenho imunogênico comparável a uma vacina produzida com lote-semente da OMS (subcepa 17D-213/77) com soroconversão de 98% em adultos (Camacho *et al.*, 2004). Em um ensaio clínico conduzido com a vacina 17D em crianças, foi observada menor soroconversão (93%) do que previamente observado em adultos (Belmusto-Worn *et al.*, 2005). Em um estudo observacional com a vacina 17DD, foi demonstrada soroconversão de 97% em indivíduos com idades de 10 anos ou mais, 94% nas crianças de 2 a 9 anos, 88% nas crianças de 12 a 23 meses, 72% nas de 9-11 meses e 82% nas de 6-8 meses. Nos lactentes de 9 a 11 meses em São Paulo a soroconversão foi de 67% (Grupo Colaborativo, 2003). Os dados indicaram associação da baixa soroconversão e da menor intensidade da resposta imunológica com aplicação simultânea da vacina de sarampo. A história de vacinação das mães daquelas crianças não mostrou associação com soroconversão nem com intensidade da resposta imunológica, mas dados sobre antecedentes de vacinação materna foram baseados em entrevista. Esses dados contrariam os achados de estudos anteriores com vacinas das subcepas 17DD (Stephano *et al.*, 1999) e 17D (Lhuillier *et al.*, 1989; Mouchon *et al.*, 1990), em que a proteção de indivíduos vacinados simultaneamente contra sarampo e febre amarela não foi afetada. Por outro lado, foi observada soroconversão de 86,5% em crianças com idade entre 18 a 36 meses de idade no Peru (Belmusto-Worn *et al.*, 2005). A mesma vacina (YF-VAX[®]) havia soroconvertido 99,3% dos adultos em estudo anterior nos E.U.A. (Monath *et al.*, 2002).

No atual calendário básico de imunizações, a aplicação simultânea das vacinas contra

febre amarela e da vacina tríplice viral (sarampo, rubéola e caxumba) nas crianças de 12 meses ou mais possibilita a interação de quatro antígenos virais atenuados. Além disso, há a orientação de que a vacina contra febre amarela seja aplicada simultaneamente ou com intervalo mínimo de duas semanas de outras vacinas vivas (Ministério da Saúde, 2001). Apesar de não haver evidências de que vacinas inativadas interfiram com a resposta imunológica a outras vacinas, os dados são limitados em relação à interferência entre vacinas com vírus vivo. A resposta imunológica a uma vacina com vírus vivo pode ser prejudicada caso seja administrada a menos de 30 dias da administração de outra vacina com vírus vivo (Watson & Peter, 1999; Centers for Disease Control, 2006), o que se justificaria pela produção de interferon produzido pela vacina inicial de vírus vivo, que inibiria a replicação do vírus da vacina seguinte. O potencial de interferência imunológica é a razão para a recomendação de que doses de vacinas com vírus vivo não sejam administradas ao mesmo tempo e que devam ser aplicadas com um intervalo de pelo menos quatro semanas.

As implicações para as estratégias de saúde pública em relação ao controle da endemia de febre amarela são enormes, com a possibilidade de menor soroconversão em crianças e acumulação de indivíduos em que a vacina não conferiu proteção plena e que permaneceriam suscetíveis até a revacinação após 10 anos. Possíveis determinantes para níveis menores de soroconversão após vacinação contra febre amarela em crianças mais jovens incluem a subcepa da vacina, a presença de imunidade materna, imaturidade imunológica das crianças, interferência de outras vacinas, a presença de anticorpos contra dengue e o próprio método e desenho da pesquisa.

Portanto, é importante para as recomendações de calendários de imunização básica que alguns pontos sejam avaliados, como a interferência de outras vacinas com vírus atenuado e presença de anticorpos contra dengue ou anticorpos maternos contra febre amarela na imunogenicidade vacinal. É também importante que seja avaliado até que ponto as subcepas das vacinas atualmente em uso (17D e 17DD) explicam as diferenças de imunogenicidade vacinal observadas nos estudos anteriores. A obtenção de dados sobre imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela em crianças entre 9 e 23 meses de idade é importante para indicar a melhor faixa etária para vacinação e controle da doença (a menor idade em que haja uma taxa de soroconversão ótima e reatogenicidade mínima). Crianças entre 9 e 23 meses, em geral, são trazidas com maior frequência a unidades de saúde e a definição de imunogenicidade e reatogenicidade nos subgrupos dentro dessa faixa de idade pode fornecer informações importantes para as estratégias do calendário básico de vacinação.

Em crianças maiores de 12 meses é menor a probabilidade de que a resposta imune a vacinas atenuadas seja influenciada por anticorpos maternos, ou de aplicação concomitante com outras vacinas. Dessa forma, podem ser alcançadas maiores taxas de soroconversão.

Considerações sobre a reatogenicidade vacinal

A vacina contra febre amarela é geralmente considerada segura e os sinais e sintomas mais frequentemente atribuídos à vacinação são inespecíficos (cefaléia, febre baixa, mialgia e fraqueza muscular), levando à interrupção das atividades normais em menos de 0,5% dos vacinados. Essas reações ocorrem 5 a 7 dias após a vacinação e são, na maioria das vezes, brandas e com evolução favorável espontânea (Monath, 2004; Camacho *et al.*, 2005). No estudo de Camacho *et al.* (2005), o perfil reatogênico da vacina da subcepa 17D-203/77 foi semelhante ao da vacina da subcepa 17DD-102/84.

A segurança das vacinas contra febre amarela aumentou após a introdução do sistema de lote semente e padronização dos procedimentos de produção das vacinas. Eventos adversos brandos são esperados no local de inoculação da vacina e decorrentes da viremia pós-vacinal. Eventos graves são considerados raros, sendo classificados como eventos neurotrópicos e viscerotrópicos (Monath, 2004). A neurovirulência do vírus vacinal foi demonstrada em experimentos com animais e em relatos de encefalite e outras manifestações neurológicas em humanos (Monath, 2004). A síndrome neurológica de encefalite associada à vacina 17D inicia-se 7 a 21 dias após a vacinação e se manifesta com diferentes sinais e sintomas neurológicos e alterações do líquido cérebro-raquidiano, tendo evolução autolimitada e sem sequelas (Monath, 2004). Relatos de caso de encefalite ocorreram principalmente em crianças menores de 7 meses de idade e se tornaram raros após a padronização dos procedimentos de produção da vacina 17D (Monath, 2004). Houve relatos de casos de encefalite esporádicos após a padronização da produção da vacina, porém essencialmente relacionados ao uso da vacina em crianças menores de 6 meses de idade e com vacinas nas quais acredita-se que possa ter ocorrido variação na subcepa e nível de passagem que não era adequadamente controlado na época (Monath, 2004). A incidência de encefalite pós-vacinal em crianças maiores de 9 meses é considerada rara (Monath, 2004). Porém, apesar da restrição de uso em menores de 6 meses de idade e sistematização da padronização do sistema de lote semente, eventos neurológicos com associação temporal e plausibilidade biológica continuam sendo ocasionalmente citados na literatura (Monath, 2004; Fernandes *et al.*, 2005; Khromava *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2001; Vellozzi, 2006), fato que pode comprometer a confiança popular

nas estratégias e recomendações vacinais e assim baixar a cobertura vacinal. A ocorrência episódica de eventos neurológicos e o reconhecimento da possibilidade de emergência de mutações (apesar de amenizadas pelo sistema de lote-semente) que podem estar relacionadas com virulência justificam a necessidade de monitoramento e análises contínuas sobre segurança e reatogenicidade das vacinas em uso atualmente, considerando as diferentes subcepas e fabricantes.

O sequenciamento comparativo das subcepas 17D-213/77 e 17DD demonstrou diferenças nas sequências nucleotídicas, assim como diferenças em relação à cepa parental virulenta Asibi (Monath, 2004; Monath, 2005). Essa comparação ajudou a elucidar parcialmente a base molecular da atenuação da vacina 17D. Porém, há inúmeras mutações que separam as subcepas atuais das cepas originárias, é difícil precisar quais são as responsáveis pela atenuação viral, assim como quais são os determinantes de eventos adversos graves como neurotropismo ou viscerotropismo (Monath, 2005). De qualquer forma, através da comparação genética de diferentes cepas, foi possível identificar a etiologia multigênica da virulência, assim como identificação de alguns possíveis genes envolvidos na virulência (Monath, 2004). Baseado tanto nas diferenças nucleotídicas entre as subcepas atuais quanto na etiologia multigênica da virulência, é possível que os perfis de reatogenicidade das subcepas atuais sejam diferentes. Além disso, mutações (ex. no sítio E52) foram identificadas como associadas a maior neurovirulência da cepa 17D (Monath, 2005) o que justifica a necessidade contínua de vigilância de reatogenicidade nas diferentes passagens.

A identificação de eventos adversos pós-vacinais é importante para permitir uma resposta com fundamentação científica à população e para manter sua confiança nos programas de imunização. A ocorrência de eventos adversos associados a uma vacina pode não ser detectada durante estudos para licenciamento por erros metodológicos, incidência relativamente baixa para o tamanho da amostra, surgimento dos sinais e sintomas após o encerramento do estudo e pelo uso da vacina em uma população mais homogênea, resultante de critérios de elegibilidade capazes de excluir subgrupos com risco mais elevado para ocorrência de eventos adversos (Fritzell, 2002; Fine, 1995; Chen & Orenstein, 1996). Eventos adversos não detectados em estudos clínicos de fase 3 podem ser identificados em dados de sistemas de vigilância e em estudos de fase 4 (*postmarketing surveillance*) (Chen, 1999; Collet *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Rosenthal & Chen, 1995). Porém, outros estudos epidemiológicos podem ter importância para a identificação e investigação de eventos adversos pós-vacinais como série de casos, estudos caso-controle e coortes retrospectivas e

prospectivas (Rodrigues & Smith, 1999; Chen & Orenstein, 1996; Chen, 1999; Rodrigues & Dourado, 2002; Farrington *et al.*, 1996). Estudos de eventos adversos pós-vacinais apresentam limitações metodológicas, como dificuldades de definir critérios para identificação de casos e a introdução de viés ou confundimento decorrentes de estudos observacionais que podem ser minimizados em ensaios clínicos cegos e randomizados (Fine *et al.*, 1992; Farrington *et al.*, 1996).

Considerando as dificuldades metodológicas para identificação de eventos adversos pós-vacinais raros, estudos observacionais surgem como uma ferramenta adicional para a análise de eventos raros temporalmente associados à vacinação contra febre amarela. A análise e a avaliação crítica das limitações metodológicas de estudos epidemiológicos de intervenção ou observacionais é parte indispensável do monitoramento contínuo sobre a reatogenicidade vacinal. Revisões sistemáticas da literatura podem configurar ferramenta útil para aumentar a capacidade de detecção de casos de eventos adversos pós-vacinais raros. Além disso, servem como investigação exploratória para se definir a necessidade de criação de uma rede de vigilância sentinela e estudos multicêntricos explanatórios.

Para investigar a questão de eventos neurológicos associados à vacinação contra febre amarela, foi realizada uma revisão sistemática da literatura. Foram avaliados dados disponíveis sobre a reatogenicidade neurológica das vacinas contra febre amarela atualmente em uso (17D e 17DD) segundo as indicações atuais (crianças maiores de 9 meses e adultos). Para tal, estudos sobre a segurança e eficácia das vacinas contra a febre amarela com as subcepas 17DD e 17D-213/77, produzidas pelo sistema de lote-semente que seguem as orientações da Organização Mundial da Saúde para produção de vacinas contra febre amarela e que estão atualmente em uso foram incluídos na revisão. Ensaios clínicos e estudos observacionais incluindo relatos de casos, série de casos, estudos tipo caso-controle e estudos de vigilância foram avaliados. Artigos sobre outras vacinas contra febre amarela originadas de outras subcepas que não as citadas ou que não produzidas pelo sistema de lote-semente foram excluídos da análise, assim como estudos com crianças menores de 9 meses de idade e estudos com modelos animais e cobaias. Artigos de revisão ou recomendações, diretrizes, consensos e livros-texto serviram como base de dados para busca manual de referências. As seguintes bases de dados foram pesquisadas para identificação de referências disponibilizadas até dezembro de 2006: *International Database for Medical Literature (MEDLINE)*, *Latin America and Caribbean Health Sciences (Lilacs)*, *World Health Organization Library Information System (WHOLIS)*, *PAHO HQ Library Catalogy (PAHO)–Caribbean Health*

Science Literature (MedCaribe). Apesar de vacinas contra febre amarela serem utilizadas desde a década de 1930, a busca de referências em bases de dados não informatizadas como *Index medicus* (anteriores a 1966) não foi realizada dado que as recomendações atuais para a produção dessas vacinas foram definidas na década de 70.

Os eventos adversos identificados em estudos controlados foram essencialmente eventos brandos. A maioria dos estudos controlados identificados foi realizada com vacinas 17D. Apesar da ampla utilização da vacina 17DD em programas de vacinação há dois artigos de estudos controlados com a vacina 17DD (Camacho *et al.*, 2004; Camacho *et al.*, 2005).

Eventos adversos neurológicos, apesar de menos frequentes do que descritos previamente à utilização do sistema de lote-semente, foram identificados em oito relatos de casos com vacinas 17D, sendo quatro casos de encefalite, dois de neuropatia, um caso de ataxia e um único caso de mieloencefalite em paciente HIV positivo (Quadro 1). Em dois de onze estudos baseados em dados de sistemas de vigilância de eventos adversos pós-vacinais com a vacina 17D também foram registrados casos de eventos neurológicos, sendo referidos um total de 26 casos entre 1987 e 2003 nos EUA e Canadá (Quadro 2). Foi identificado um estudo relatando eventos adversos neurológicos associados à vacina 17DD (Fernandes *et al.*, 2005). A possibilidade de subnotificação em sistemas de vigilância não pode deixar de ser considerada na avaliação dos dados.

Quadro 1: Eventos adversos neurológicos associados à vacina 17D publicados em relatos de caso e série de casos

<i>Artigo</i>	<i>vacina</i>	<i>Evento adverso</i>
JAMA 1966; 198:671	17D	encefalite
Pédiatrie 1981; 36:539	17D	encefalite
Vaccine 1993; 11: 691	17D	encefalite
J Infect 1990; 21(1):105-106	17D	encefalite
J Med Assoc Thai 2002;85(1):131-134	17D	Mieloencefalite em paciente HIV positivo
Klin Monatsbl Augenheilkd 2001;218(10):688-690	17D	Neurite nervo óptico
J Peripher Nerv Syst 2002;7(3):163-167	17D	Neuropatia periférica
An Pediatr (Barc) 2006;65(5):500-510	17D	Ataxia

Quadro 2: Estudos observacionais com descrição de eventos adversos neurológicos associados à vacina 17D

<i>Artigo</i>	<i>Eventos adversos</i>	<i>N</i>	<i>Denominador</i>	<i>Período</i>
Vaccine 2004;22(17-18):2103-2105	Viscerotrópico (4) e neurotrópico (4)	8	3.046.007 doses	1991-2003
Can Commun Dis Rep 2002;28(2):9-15.	Eventos adversos neurológicos	22	-	1987-2000

As vacinas contra febre amarela são seguras e eventos adversos neurotrópicos graves são raros e somente foram identificados em estudos observacionais baseados em dados de vigilância passiva e principalmente relacionados à vacina 17D-204. Estudos de intervenção, estudos tipo caso-controle ou coortes prospectivas (utilizando oportunidades de uso de vacina em larga escala como campanhas vacinais) cujo objetivo seja avaliar o risco de eventos adversos neurológicos são necessários para que os dados e as estimativas sugeridas pelos estudos observacionais disponíveis na literatura sejam mais bem explorados. A investigação de eventos neurológicos pós-vacinais em populações específicas como crianças, idosos e imunodeprimidos, também deve ser mais bem explorada. Além disso, o monitoramento regular de eventos adversos associados ao uso de vacinas de diferentes subcepas e fabricantes deve ser realizado. Dentre as hipóteses presentes na literatura sobre fatores que podem modificar a reatogenicidade da vacina estão a possibilidade de imunidade cruzada com outros flavivírus como dengue e imunidade materna que poderiam contribuir com uma menor reatogenicidade vacinal em áreas endêmicas para dengue e com vacinação antiamarílica de rotina (Monath, 2005).

O fato de eventos adversos neurológicos relacionados às vacinas contra febre amarela somente terem sido identificados em estudos observacionais, posteriormente ao seu emprego em programas de vacinação, levanta as seguintes possibilidades: (1) os eventos serem raros, não detectáveis mesmo em estudos com grandes tamanhos de amostra; (2) o aparecimento dos sinais e sintomas poderia ter ocorrido após o período de seguimento; (3) o início de uso da vacina em uma população heterogênea, diferente das populações de estudos controlados, com subgrupos com possibilidade de terem risco mais elevado para ocorrência de eventos adversos; (4) os eventos representados por sinais e sintomas pouco específicos tinham outros determinantes. Além disso, a estimativa de risco de eventos adversos neurológicos a partir de dados oriundos de sistemas de vigilância passiva é de difícil aferição uma vez que há falta de informação sobre ocorrência de doença em não vacinados e faltarem dados prospectivos de

indivíduos vacinados, o que pode acarretar subestimação de taxas de eventos adversos. A análise e discussão das estratégias para detecção de eventos adversos pelos sistemas de vigilância e as limitações metodológicas e logísticas para investigação de casos e inferência de causalidade, são de importância para o melhor entendimento da frequência de eventos adversos e dos fatores que possam influenciar na confiança da população e dos profissionais de saúde na estratégia vacinal.

Durante uma campanha vacinal contra febre amarela ocorrida em 2001 houve um surto coincidente de casos de meningite asséptica (Fernandes *et al.*, 2007) levantando a necessidade de ampliar a análise sobre a ocorrência de eventos neurológicos com a vacina da subcepa 17DD levando em conta questões relativas à vacina empregada, à população vacinada e à metodologia vigente para identificação de casos. O fato de não terem sido confirmados na literatura eventos neurológicos com a vacina 17DD, pode ser devido a fatores tanto pertinentes a vigilância e viés de publicação, quanto a questões como coinfeção com outros flavivírus como o vírus da dengue ou características da própria subcepa vacinal.

A questão da reatogenicidade vacinal não pode ser vista de forma independente da imunogenicidade. Primeiramente por serem ambos aspectos considerados para traçar estratégias de vacinação para controle da febre amarela. Além disso, provavelmente há questões imunológicas que definem uma menor ou mais lenta resposta imunológica e que provavelmente afetam os níveis de viremia e o risco de eventos adversos segundo faixa etária de forma independente a variações genéticas (Belsmuto-Worn *et al.*, 2005; Monath, 2005). Apesar de não haver dados de comparação dos níveis de viremia ou da cinética da resposta imunológica entre adultos e crianças, algumas questões biológicas de diferenças de respostas às vacinas entre faixas etárias tornam a investigação conjunta de reatogenicidade e imunogenicidade importantes para definição de estratégias de saúde pública.

Objetivos

Objetivo geral

Analisar as possíveis implicações para as estratégias de vacinação contra febre amarela em crianças baseada nos dados disponíveis sobre imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela das subcepas 17 D e 17 DD.

Objetivos específicos

(i) descrever e discutir dados de eventos adversos neurológicos pós-vacinais relacionados temporalmente à vacinação contra febre amarela detectados em sistema de vigilância na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais no período de 1999 e 2005.

(ii) analisar a interação de antecedentes de infecções por dengue e vacinação contra febre amarela em crianças.

(iii) analisar o tipo de resposta humoral obtida após a segunda dose da vacina contra febre amarela em crianças que não responderam à primeira dose vacinal.

(iii) analisar as implicações para o Programa Nacional de Imunizações dos resultados encontrados sobre imunogenicidade e reatogenicidade da vacinação contra febre amarela e contra sarampo, caxumba e rubéola em crianças.

Métodos

Organização dos artigos propostos para composição da tese de doutorado

Os artigos que compõem a tese abordam e discutem fatores relacionados a imunogenicidade e reatogenicidade vacinal e as possíveis implicações para o Programa Nacional de Imunizações baseados em dados do ensaio clínico já mencionado e em dados secundários de vigilância passiva de eventos adversos pós-vacinais. A tese está organizada em 4 artigos que abordam e discutem fatores relacionados a imunogenicidade e reatogenicidade vacinais e as possíveis implicações para o Programa Nacional de Imunizações.

Há questões pendentes sobre a imunogenicidade e reatogenicidade da vacina contra febre amarela que influenciam diretamente as estratégias de saúde pública para controle da doença. Essas questões serão abordadas da seguinte forma: (i) as limitações do sistema de vigilância de eventos adversos pós-vacinais e a confiabilidade dos profissionais de saúde e população em relação á reatogenicidade da vacina contra febre amarela; (ii) entendimento dos fatores que influenciam a imunogenicidade e efetividade vacinal na população alvo do programa de imunizações; (iii) investigação da influência de outros flavivírus prevalentes (dengue) na imunogenicidade e reatogenicidade vacinal; (iv) determinação do tipo de resposta imunológica humoral e soropositividade após duas doses vacinais nas crianças soronegativas após a primo-vacinação.

O primeiro artigo descreve a ocorrência de eventos adversos pós-vacinais neurológicos (meningite asséptica) identificados em sistemas de vigilância passiva, temporalmente associados a uma campanha de vacinação contra febre amarela e discute as limitações identificadas para investigação dos casos e suas possíveis implicações para o programa de vacinação. O segundo artigo investiga a influência de anticorpos contra dengue sorotipos 1, 2 e 3 na imunogenicidade e reatogenicidade da vacinação contra febre amarela em crianças. O terceiro artigo investiga o tipo de resposta humoral (anamnástica ou primária) que ocorre após a segunda dose da vacina antiamarílica em crianças que não apresentaram anticorpos neutralizantes após a primeira dose vacinal. A seção das considerações finais contém o quarto artigo que aborda os dados conjuntamente e discute as possíveis implicações para o Programa Nacional de Imunizações e o calendário de vacinação baseada nos resultados de imunogenicidade e reatogenicidade analisados neste trabalho.

Para o primeiro artigo, além da revisão sistemática da literatura, foram utilizados dados secundários provenientes do sistema de notificação passiva de eventos adversos pós-vacinais do município de Juiz de Fora, Minas Gerais entre os anos de 1999 e 2005.

Para o segundo e terceiro artigos foram utilizados dados oriundos do “*Ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego com duas vacinas contra febre amarela (subcepas 17DD e OMS 17D-213/77)*”.

Desenho do ensaio clínico randomizado com duas vacinas contra febre amarela em crianças

O objetivo desse ensaio foi estimar e comparar a imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela das subcepas 17DD e 17D-213/77 em indivíduos de menos de 2 anos de idade. Um dos centros colaboradores do estudo (Brasília-DF) investigou a vacinação contra febre amarela simultânea e com 30 dias de intervalo da vacinação contra sarampo, rubéola e caxumba (tríplice viral). Nesta Unidade da Federação, a vacina contra febre amarela é administrada aos 12 meses simultaneamente com a vacina tríplice viral. Dessa forma, pretendeu-se investigar as seguintes questões: (i) comparar a soroconversão obtida com as subcepas 17DD e OMS 17D-213/77 da vacina contra febre amarela em indivíduos entre 9–23 meses de idade; (ii) comparar a soroconversão obtida com as vacinas 17D e 17DD contra febre amarela e a vacina tríplice viral em subgrupos de crianças vacinadas simultaneamente e com intervalo de 30 dias; (iii) comparar a soroconversão obtida com as vacinas 17D e 17DD contra febre amarela em crianças abaixo de um ano de idade com mães soropositivas e soronegativas para febre amarela; (iv) comparar a soroconversão obtida com as subcepas 17DD e OMS 17D-213/77 da vacina contra febre amarela em crianças com e sem anticorpos contra dengue; (v) comparar a soroconversão obtida com a revacinação com a subcepa 17DD em crianças que não responderam sorologicamente com produção de anticorpos à primo-vacinação contra febre amarela; (vi) comparar a frequência de eventos adversos até 30 dias após a vacinação.

O estudo realizado é um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, para comparar a imunogenicidade e reatogenicidade entre duas vacinas contra febre amarela, das subcepas 17DD (produto comercial, licenciado) e 17D-213/77 (produto experimental produzido do lote-semente da OMS) produzidas em Bio-Manguinhos, FIOCRUZ. Crianças de 9 a 23 meses de idade que se apresentaram para vacinação em centros de saúde da rede pública foram elegíveis para o estudo. O protocolo do estudo foi publicado (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007) e encontra-se no anexo 1.

O estudo teve caráter multicêntrico e envolveu os Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Brasília-DF, onde a vacinação contra febre amarela está no calendário básico de imunizações do Ministério da Saúde, sendo parte das atividades da rotina

das unidades básicas de saúde. O Centro Coordenador do Estudo foi sediado na Assessoria Clínica do Instituto de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da FIOCRUZ.

Foram convidados a participar do estudo indivíduos com menos de 2 anos de idade, sem história de vacinação contra febre amarela, que não apresentavam as contra-indicações para a essa vacina e que se apresentaram para vacinação em centros de saúde da rede pública. Os pais ou responsáveis legais pelas crianças elegíveis para vacinação foram informados dos objetivos e métodos do estudo por auxiliares de pesquisa treinados e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo. O estudo consistiu em receber após randomização uma das vacinas do estudo (grupos que receberam vacina contra febre amarela 17DD ou vacina 17D-213/77) e submeter-se a exames de sangue e a entrevistas antes e 30 dias depois da vacinação (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007). Em Brasília-DF os voluntários foram alocados por processo de randomização em grupos com vacinação simultânea ou com um mês de intervalo da vacina tríplice viral, e em grupos que receberam vacina contra febre amarela 17DD ou vacina 17D-213/77 (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007). Dos voluntários que se recusaram ou desistiram de participar, foram registrados em folha de controle especial a idade, sexo, problemas de saúde, antecedentes de vacinação contra febre amarela e o motivo da recusa. Nas amostras de sangue foram dosados anticorpos contra febre amarela (testes de neutralização por redução em placa de lise – PRNT), sarampo (PRNT), rubéola e caxumba (ELISA) (somente naqueles que receberam a vacina triviral) e dengue, sorotipos 1, 2 e 3 (ELISA) (em uma subamostra selecionada para representar as áreas em que houve epidemia de dengue durante o estudo e incluir crianças com diferentes níveis de anticorpos contra febre amarela). Às crianças que não obtiveram nível de anticorpos neutralizantes considerados protetores após a primeira dose da vacina foi oferecida uma segunda dose da vacina antiamarílica 17DD e a possibilidade de nova coleta 15 dias após a revacinação para testagem de anticorpos tipo IgM e IgG (ELISA).

Na randomização foram empregadas a vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos que já é utilizada em campanhas e na rotina de vacinação da rede pública de serviços de saúde em regiões endêmicas, e uma vacina produzida a partir do lote-semente da Organização Mundial da Saúde 17D - 213/77 já utilizada com sucesso em ensaio clínico randomizado controlado com placebo em adultos (Camacho *et al.*, 2004). A distribuição, manipulação e aplicação da vacina seguiram as recomendações do Programa Nacional de Imunizações (PNI) e do fabricante (Ministério da Saúde, 2001).

Os critérios de elegibilidade de voluntários para o estudo foram essencialmente os critérios de aplicação da vacina contra febre amarela do PNI. As orientações de procedimentos na sala de vacina seguiram as normas e rotinas habituais do PNI. Os vacinadores foram selecionados pela experiência em sala de vacina, mas o treinamento nos procedimentos específicos da pesquisa serviu como oportunidade de revisão das normas de conservação e manuseio estabelecidas pelo PNI. Durante o trabalho de campo, o processo de vacinação foi supervisionado por enfermeiro da unidade de vacinação. Os diários das salas de vacinação foram examinados regularmente pelos monitores clínicos. O estudo não interferiu nas demais vacinações de rotina, mas apenas registrou a data da sua aplicação. A aderência ao protocolo foi verificada em visitas de monitoria quando foram observados os procedimentos, verificada a estocagem das vacinas, o preenchimento dos questionários e a coleta e processamento das amostras de sangue. Os relatórios de monitoria foram colocados à disposição de um comitê externo (independente) de monitoramento dos dados.

O tipo de vacina administrado foi ocultado dos participantes, da equipe de campo e do analista de dados (“triplo-cego”), por meio de códigos nos rótulos dos frascos. As vacinas comparadas são idênticas no aspecto, volume, forma de manuseio e administração, e foram envasadas em frascos idênticos rotulados com códigos numéricos distribuídos aleatoriamente por um estatístico e revelados apenas ao responsável pela modificação da rotina de envasamento. As listas de randomização contendo os códigos foram lacradas e mantidas no centro coordenador do estudo (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro) com acesso restrito a pessoas especialmente designadas para tal e não ligadas diretamente à pesquisa. A distribuição dos participantes pelos tipos de vacina, foi randomizada por blocos, na razão de 1:1. A randomização foi estratificada por Estados.

A soroconversão (passagem do estado de não reator para reator à sorologia para anticorpos contra febre amarela) é o desfecho primário de interesse para o estudo. As crianças cujos testes sorológicos não evidenciaram anticorpos em nível protetor contra febre amarela após 30 dias de vacinação (soronegativas) foram revacinadas e foi realizada nova coleta de sangue após 15 dias para determinar o tipo de resposta – primária ou anamnésica – à revacinação. Das mães das crianças menores de 1 ano que concordaram em participar do estudo, foi coletada amostra de sangue para dosagem de anticorpos contra febre amarela.

O desfecho primário do estudo foi definido com base nos exames sorológicos. Os resultados dos testes pré e pós-vacinais foram comparados definindo-se soroconversão (ou viragem sorológica) como soropositividade em indivíduos não reatores à sorologia pré-

vacinal ou quadruplicação dos títulos de anticorpos pré-vacinais (utilizada na análise da coorte completa). A proporção de soroconversão, os títulos médios geométricos e a frequência de eventos adversos foram calculados e intervalos de 95% de confiança foram construídos para as estimativas.

Soropositividade foi definida como título de anticorpos em relação aos níveis pré-vacinais em mUI/ml, obtidos através do uso de um soro referência calibrado por um soro referência internacional. Para determinação de títulos médios geométricos, indivíduos com títulos de anticorpos abaixo do *baseline* do teste sorológico receberam o valor arbitrário correspondente à metade do valor *baseline*.

As análises de imunogenicidade e reatogenicidade foram estratificadas por centro colaborador.

Os grupos de intervenção foram comparados quanto à distribuição das características demográficas e outras características de base, de modo a verificar o sucesso da randomização. O perfil demográfico dos participantes e dos indivíduos que se recusaram a participar também foi comparado para subsidiar considerações sobre a validade externa dos resultados da pesquisa.

Para efeito de análise dos eventos adversos foi considerada a coorte completa composta de indivíduos para os quais havia dados de reatogenicidade, mesmo que tenha havido quebra de protocolo (análise “por intenção de tratamento”). A análise da coorte completa incluiu todos os indivíduos randomizados (mesmo que não tenham recebido a vacina) no grupo em que foram alocados.

Para análise da imunogenicidade, a coorte completa consistiu de todos os indivíduos randomizados que tiverem exames sorológicos pós-vacinais. Uma análise secundária do subconjunto que aderiu ao protocolo desconsiderou aqueles que receberam outras vacinas, soros hiperimunes, ou medicamentos explicitados nos critérios de exclusão e de eliminação, que eram soropositivos à sorologia pré-vacinal, que estavam fora da faixa de idade do estudo, que tiveram sangue coletado para sorologia fora do prazo limite especificado no protocolo, que apresentaram intercorrência clínica considerada capaz de modificar a resposta imunológica à vacinação, que tiveram o cegamento quebrado por qualquer razão. Uma análise da aderência ao protocolo incluiu tabelas de frequência por tipo de violação do protocolo, por centro colaborador e por grupo de alocação.

Em lactentes menores de 1 ano, análises de soroconversão/viragem sorológica foram conduzidas em subgrupos definidos pelo estado sorológico da mãe para a febre amarela.

Foram realizadas análises de soroconversão/viragem sorológica bem como de intensidade da resposta imunológica em subgrupos de indivíduos soropositivos e soronegativos para dengue (cada um dos sorotipos).

A probabilidade de soroconversão das vacinas comparadas foi ajustada para diferenças nos grupos em relação a covariáveis de interesse, em modelo de regressão logística.

As covariáveis de interesse são tipo de vacina, idade, sexo, centro colaborador, soropositividade pré-vacinal, vacinação simultânea com a vacina tríplice viral e intercorrências clínicas. Analogamente, o logaritmo (base 10) do título de anticorpos pós-vacinais foi modelado estatisticamente para as mesmas variáveis.

A frequência, o tempo de início e a duração dos eventos adversos foram tabulados por tipo de evento e por grupo de alocação. Os eventos adversos foram também analisados segundo as categorias: reações conhecidas da vacina, eventos cuja relação com a vacina não é conhecida e eventos considerados não associados à vacina. Para fins de tabulação e análise, os sinais, sintomas e alterações de exames complementares foram grupados em síndromes conhecidas (por exemplo, síndrome gripal), e por órgãos e sistemas. A comparação das frequências dos eventos nos grupos de comparação foi feita independente das associações conhecidas, nos estratos de tempo de aparecimento.

Tamanho de amostra

O número de participantes em cada grupo de comparação foi estimado para alcançar poder estatístico de 80% ($Z\beta = 0,84$), com nível de significância de 95% ($Z\alpha = 1,96$), teste bicaudal, proporção de soroconversão de 90% em um dos grupos (p_1), diferença mínima relevante entre os grupos ($p_1 - p_2$) de 5 pontos percentuais (Fleiss, 1981).

O tamanho de amostra projetado com 20% de correção para perdas foi de 1.740 crianças abaixo de 2 anos (total nos dois grupos de comparação). Com 650 crianças nos dois grupos o estudo teria poder estatístico superior a 80% para detectar diferença tão pequena quanto 0,3 na média dos log10 dos títulos de anticorpos contra febre amarela.

Para eventos adversos com frequência de aproximadamente 2%, as diferenças mínimas detectáveis com uma amostra de 324 indivíduos em cada grupo de comparação serão de 5 pontos percentuais. Para eventos com frequência de 10%, a mesma amostra terá poder para detectar diferenças não menores do que 8 pontos percentuais.

Para alcançar poder de 80% para demonstrar uma diferença mínima de 10 pontos percentuais na soroconversão de 90% em um dos grupos constituído por crianças menores de 2 anos vacinadas simultaneamente contra febre amarela e com a vacina triviral comparado a

outro grupo em que essas duas vacinas são administradas separadamente, seriam necessárias aproximadamente 200 crianças em cada um dos grupos.

A seleção das unidades de saúde que participaram do estudo foi subordinada à logística da investigação e definida em conjunto com as autoridades de saúde locais. Os critérios de seleção incluíram o número de indivíduos elegíveis, instalações (salas de vacina, espaço para coleta de sangue e para entrevistas) com capacidades de acomodar a equipe de trabalho de campo, sem grandes inconvenientes para a rotina da unidade, e interesse e disponibilidade dos funcionários em colaborar no estudo. Uma lista das unidades selecionadas com as características incluindo o número de elegíveis e de recrutados fez parte dos relatórios de progresso da pesquisa. Considerando estes critérios e o caráter estritamente voluntário da participação dos sujeitos da pesquisa, resultou uma amostra não probabilística de indivíduos. Embora sem representatividade estatística, o grupo de estudo assim formado não parece apresentar peculiaridades capazes de afetar a validade interna do estudo. Considerando-se que todos os indivíduos elegíveis têm potencial imunológico para responder à vacinação, não se antecipam limitações importantes à validade externa do estudo.

Entre outubro de 2005 e dezembro de 2006 foram recrutadas 1.966 crianças nos 4 centros colaboradores em que somente houve randomização das vacinas contra febre amarela: os municípios de Ribeirão das Neves e Contagem na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (N=521); municípios de Juiz de Fora, Lima Duarte e Matias Barbosa em Minas Gerais (N=819); município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (N=374) e município de Ribeirão Preto, São Paulo (N=252). Entre fevereiro e outubro de 2006 foram captados 1.943 voluntários em Brasília, Distrito Federal que receberam a vacina combinada contra sarampo, rubéola e caxumba conforme recomendação do Programa Nacional de Imunizações e foram randomizados para receberem as vacinas contra febre amarela simultaneamente ou 30 dias após a vacinação com triviral.

A seleção de uma subamostra (N=626) do ensaio clínico foi realizada nos centros colaboradores onde houve casos de dengue durante o período de realização do estudo e portanto houve maior probabilidade de identificação de indivíduos com soropositividade para dengue. Para tal, foi realizada sorologia para dengue pré-vacinal nas amostras coletadas nos centros colaboradores nos municípios de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (N=374) e Ribeirão Preto, São Paulo (N=252). Apesar de a seleção não ser probabilística, não se acredita que haja nenhum outro determinante que venha influenciar na resposta imunológica dos indivíduos selecionados nesses centros colaboradores. Considerando uma subamostra de

tamanho N=500 em situação de baixa prevalência de sorologias pré-vacinais positivas para dengue (n1=60 em um dos grupos de comparação), um teste bicaudal com nível de significância de 0,05 alcançará poder de 82% para identificar diferenças de proporções de soroconversão entre os grupos de comparação de 72% e 88% (*odds ratio* de 2,85).

Considerações sobre a eticidade do estudo

As questões pendentes sobre a vacinação contra febre amarela em crianças precisam ser respondidas por estudos científicos que apoiem as decisões e estratégias do Programa Nacional de Imunizações (PNI) para controle da endemia de febre amarela. Estudos como o ensaio clínico realizado e a análise de dados secundários de vigilância de eventos adversos pós-vacinais fazem parte de um esforço pela melhoria contínua na segurança e eficácia das vacinas contra febre amarela atualmente em uso e nas definições das estratégias do PNI para controle da doença.

Os estudos de delineamento experimental são considerados no meio científico e pelas autoridades reguladoras de todo o mundo, os mais adequados para produzir a evidência empírica válida de eficácia e efetividade de fármacos, vacinas e outras intervenções em saúde. Características desse estudo, tais como o fato de ser realizado em unidades básicas de saúde, reproduzindo as situações habituais de emprego da vacina contra febre amarela e indicações do PNI, aumentam sua validade externa.

O ensaio clínico descrito foi elaborado e realizado em conformidade com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Parecer CEP-FIOCRUZ: 236A/03) e registro no Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Registro no SISNEP: CAAE - 0038.1.011.000-03). Houve exigência de submissão a comitês de ética locais por alguns centros colaboradores (Brasília-DF e Campo Grande-MS) com aprovação em ambos (Parecer CEP-SES-DF 069/2005 e CEP-UFMS, Protocolo 738/2006). O ensaio clínico está registrado no International Standard Randomised Controlled Trial Number Register (<http://www.controlled-trials.com/isrctn>) sob o número ISRCTN72367932.

A pesquisa foi realizada em regiões em que a vacina contra febre amarela já integra o calendário básico de imunizações a partir dos nove meses de idade. Os voluntários da pesquisa foram crianças que chegaram a unidades de vacinação e tinham indicação para vacinação contra febre amarela conforme recomendação do PNI. A pesquisa modificou a rotina de imunizações pela randomização para aplicação da vacina rotineiramente utilizada no Brasil ou de uma vacina alternativa (subcepa WHO 17D-213/77) e aferindo a resposta imunológica. A eficácia e segurança da vacina WHO-17D-213/77 produzida em Bio-Manguinhos já foi demonstrada em estudo anterior em adultos aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Camacho *et al.*, 2004; Camacho *et al.*, 2005). Em crianças, o

perfil de reatogenicidade das vacinas da cepa 17D é bem conhecido em todo o mundo e faz da vacina contra febre amarela uma das mais seguras em uso atualmente (Monath, 2004). Os benefícios individuais da participação na pesquisa resultam da verificação da soroconversão/viragem sorológica pela vacina e revacinação daqueles que não obtiverem resposta satisfatória. Os benefícios maiores da pesquisa são para a comunidade e para o país, na medida em que os resultados darão subsídios para decisões fundamentais para a produção de vacina contra febre amarela. Esta vacina tem importância estratégica já que os outros produtores não têm volume de produção suficiente para atender às necessidades brasileiras.

Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) cuja cópia ficou em poder do participante, e um cartão do participante na pesquisa também continham indicações sobre como obter esclarecimentos sobre a pesquisa.

O termo de consentimento foi lido em voz alta para o participante, ou lido pelo participante com a assistência do auxiliar de pesquisa. O texto do Termo de Consentimento, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ, se baseia no entendimento de que (1) pesquisas deste tipo são necessárias para responder às questões sobre a imunogenicidade e reatogenicidade de vacinas; (2) esta pesquisa adota as medidas recomendadas para a proteção dos participantes; (3) os resultados dos exames laboratoriais, bem como todas as informações prestadas pelo participante, serão tratados como informação confidencial, de uso exclusivo para a pesquisa; (4) os questionários estão trancados com acesso restrito aos pesquisadores, que se comprometem a não revelar e a não permitir o acesso a fichas ou questionários ou folhas de resultados; (5) o banco de dados computadorizado não conterá os nomes dos participantes; (6) os relatórios de pesquisa e eventuais publicações apresentarão resultados consolidados que não permitem a identificação individual; (7) todos os participantes receberam por escrito os resultados dos seus exames laboratoriais; (8) os participantes poderão ser contactados no futuro para acompanhamento de longo prazo da proteção da vacina; e (9) a participação é estritamente voluntária, sem qualquer vinculação com atendimento na unidade de saúde ou com atividades escolares, e que os indivíduos são livres para retirar-se do estudo em qualquer fase sem que isso implique em restrição futura.

Dos auxiliares de pesquisa foi solicitada assinatura de um documento se comprometendo a não revelar nem permitir que sejam revelados quaisquer dados ou informações sobre os participantes a que tenham acesso através da pesquisa.

Os benefícios dos resultados desse projeto serão para a coletividade, haja visto que fornecerá informações úteis para redefinições das estratégias atuais para vacinação de rotina

contra febre amarela, caxumba, sarampo e rubéola de crianças sob o cenário de vacinação em áreas endêmicas para dengue. A tese contém a análise e discussão de dados sobre reatogenicidade e imunogenicidade das vacinas contra febre amarela e seu emprego na vacinação de rotina em crianças relevantes para as estratégias do PNI. A análise conjunta desses dados e sua relevância para a coletividade e para o programa de imunizações são discutidas nas considerações finais.

Divulgação dos resultados do ensaio clínico

Os dados gerados pelo estudo são de propriedade do conjunto das entidades às quais estão filiados os membros do Grupo Colaborativo para o Estudo da Vacina contra Febre Amarela (Anexo 5), que se configura o autor coletivo dos relatórios, trabalhos para apresentação em congressos e artigos para publicação. Está previsto que o material gerado pela pesquisa poderá ser usado em parte para elaboração de teses e monografias de pós-graduação com a aprovação dos membros do Grupo Colaborativo, desde que prevaleçam o cronograma e os critérios para divulgação acordados pelos componentes do Grupo Colaborativo.

A utilização dos dados do ensaio clínico para fins da realização desse projeto de doutorado foi autorizada pelo Grupo Colaborativo para o Estudo da Vacina contra Febre Amarela. Os artigos previstos nesse projeto de doutorado escritos a partir dos dados do ensaio clínico serão publicados em coautoria com o autor coletivo “Grupo Colaborativo para o Estudo da Vacina contra Febre Amarela”.

Referências

- Ada, G. The Immunology of Vaccination. In: Vaccines. (Plotkin, S. A. & Oresteim, W. A.) 3rd edition, Chapter 3. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.
- Barnett E.D. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44: 850-856
- Belmusto-Worn VE, Sanchez JL, McCarthy K, Nichols R, Bautista CT, Magill AJ. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 72(2):189-197.
- Benenson, A.S. *Control of Communicable Diseases in Man*. 15th Ed. American Public Health Association, Washington, USA, 1990.
- Camacho LA, de Aguiar SG, Freire Mda S, Leal Mda L, do Nascimento JP, Iguchi T, Lozana JA, Farias RH; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Revista de Saúde Pública* 2005; 39(3):413-20.
- Camacho LA, Freire M da S, Leal Mda L, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana J de A, Farias RH; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Revista de Saúde Pública* 2004;38(5):671-8.
- Centers for Disease Control and Prevention. General Recommendations on Immunization. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*, 2006; 55(RR15).
- Chen RT e Orenstein WA. Epidemiologic methods in immunization programs. *Epidemiologic Reviews* 1996; 18(2):99-117.
- Chen, R. T., 1999. Safety of vaccines. In: Vaccines. (Plotkin, S. A. & Oresteim, W. A.) 3rd edition, Chapter 49:1144-1164. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Chen RT, Destefano F, Davis RL, Jackson LA, Thompson RS, Mullooly JP, Black SB, Shinefield HR, Vadheim CM, Ward JI, Marcy SM e The Vaccine Safety Datalink Team. Vaccine Safety Datalink: immunization research in health maintenance organizations in the USA. *Bulletin of the World Health Organization* 2000; 78(2):186-194.
- Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program. *Vaccine* 2007; (25): 3118–3123
- Collet J-P, Macdonald N, Cashman N, Pless R e The Advisory Committee on Causality Assessment. Monitoring signals for vaccine safety: the assessment of individual adverse event reports by an expert advisory committee. *Bulletin of the World Health Organization* 2000; 78(2):178-185.
- Dobler G; Jelinek T; Frösner G; Nothdurft HD; Löscher T. Kreuzreaktivität von Patientenseren mit akutem Dengue-Fieber mit Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Tests. [Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis]. *Wien Med*

Wochenschr; 147(19-20):463-4, 1997.

Farrington, C. P.; Nash, J. & Miller, E., 1996. Case series analysis of adverse reactions to vaccines: a comparative evaluation. *American Journal of Epidemiology*, 143(11):1165-1173.

Fine, P. E. M. & Chen, R. T., 1992. Confounding in studies of adverse reactions to vaccines. *American Journal of Epidemiology*, 136(2):121-135.

Fine, P. E. M., 1995. Methodological issues in the evaluation and monitoring of vaccine safety. Combined vaccines and simultaneous administration – current issues and perspectives. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 759:300-308.

Fox, J.P. & Cabral, S.M. The Duration of Immunity Following Vaccination with the 17D Strain of Yellow Fever Virus. *The American Journal of Hygiene*, 37:93-120, 1943.

Freestone, DS. Yellow Fever Vaccine. In *Vaccines*, Plotkin, S.A. & Mortimer, E.A. (Eds.) 2nd Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1994.

Fritzell B. Detection of adverse events: what are the current sensitivity limits during clinical development? *Vaccine* 2002; 20:S47-S48.

Fernandes GC, Camacho LAB, Carvalho MS, et al. Neurological adverse events temporally associated to mass vaccination against yellow fever in Juiz de Fora, Brazil, 1999–2005. *Vaccine* 2007; 25: 3124–3128

Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina contra Febre Amarela. Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina contra febre amarela. *Ciência & Saúde Coletiva* 2003; 8(Supl. 2):511 (Livro de Resumos II do VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Brasília-DF, agosto de 2003).

Khromava AY, Eidex RB, Weld LH, Kohl KS, Bradshaw RD, Chen RT, Cetron MS; The Yellow Fever Vaccine Safety Working Group. Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine* 2005; 23(25):3256-63.

Lhuillier, M.; Mazzariol, M.J.; Zadi, S. et al. Study of combined vaccination against yellow fever and measles in infants from six to nine months. *Journal of Biological Standardization* 1989;17:9-15.

Lopes OS, Almeida SD e Carvalho R. Studies on yellow fever vaccine. III – dose response in volunteers. *Journal of Biological Standardization* 1988; 16:77-82.

Martin M, Weld LH, Tsai TF, Mootrey GT, Chen RT, Niu M, Cetron MS; GeoSentinel Yellow Fever Working Group. Advanced age a risk factor for illness temporally associated with yellow fever vaccination. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7(6):945-51.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Manual de Procedimentos para Vacinação. 4ª Edição. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/MPV/mpv00.htm>.

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia/Gerência Técnica das Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. Informe Técnico. Febre Amarela. Brasília, Julho de 1999. Mimeo, 5

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia. Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle da Febre Amarela. 2000.

<http://www.funasa.gov.br/epi/fa/fa0.htm>

Monath TP, Nichols R, Archambault WT, Moore L, Marchesani R, Tian J et al. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 66(5):533-541.

Monath TP. *Yellow Fever Vaccine. Expert Review of Vaccines* 2005; 4(4)

Monath TP. *Flaviruses (Yellow Fever, Dengue, Dengue Hemorrhagic Fever, Japanese Encephalitis, St. Louis Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis)*. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin (Editor) 4th edition Churchill Livingstone, 1995.

Monath TP. *Stability of Yellow Fever Vaccine. Developments in Biological Standardization* 1996, 87:219-225.

Monath, T.P. *Yellow Fever*. In Plotkin, SA. & Orenstein WA organizadores. *Vaccine*. Philadelphia. Editora W.B. Saunders 2004. p. 1095-1176.

Mouchon, D.; Pignon, D.; Vicens, R. et al. Étude de la Vaccination Combinée Rougeole-Fièvre Jaune Chez L'Énfant Africaine Agé de 6 a 10 Mois. *Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique* 1990; 83:537-551.

Niedrig M, Lademann M, Emmerich P. & Lafrenz M. *Assessment of Igg antibodies against yellow fever firus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. Tropical Medicine and International Health* 1999; 4(12):867-871.

Poland, J.D.; Calisher, C.H.; Ponath, T.P. et al., *Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17d yellow fever vaccine. Bulletin of the World Health Organization* 1981; 59(6):895-900.

Rodrigues LC e Smith PG. *Use of the case-control approach in vaccine evaluation: efficacy and adverse effects. Epidemiological Reviews* 1999; 21(1):56-72.

Rosenthal S e Chen RT. *The reporting sensitivities of two passive surveillance systems for vaccine adverse events. American Journal of Public Health* 1995; 85(12):1706-1709.

Smith CEG, Turner LH e Armitage P. *Yellow Fever Vaccination in Malaya by Subcutaneous Injection and Multiple Puncture. Bulletin of the World Health Organization* 1962; 27:717-727.

Stefano I, Sato HK, Pannutti CS et al. *Recent immunization against measles does not interferewith the efficacy of yellow fever vaccine. Vaccine* 1999; 17:1042-6.

Vasconcelos PFC. *Febre Amarela. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003; 36(2):275-293.

Vellozzi C, Mitchell T, Miller E, Casey CG, Eidex RB, Hayes EB. *Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease (YEL-AVD) and corticosteroid therapy: eleven United States cases, 1996-2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; 75(2):333-6.

Watson, J.C. & Peter, G. In: *Vaccines*. (Plotkin, S. A. & Orestein, W. A.) 3rd edition, Chapter 5. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1999.

Wisserman CL & Sweet B. *Immunological studies with group B arthropod-borne viruses. III.*

Response of human subjects to revaccination with 17D strain yellow fever vaccine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1962; 11:570.

World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 872, 1998.

World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. The Production and Testing of the WHO Yellow Fever Primary Seed Virus Lot 213/77. Geneva, 12-18 June 1984. WHO/BS/83.1430. Mimeo 45 p.

World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 745, 1987.

World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series No. 594, 1976.

World Health Organization. Global Programme for Vaccines and Immunization / Division of Emerging and Other Communicable Diseases Surveillance and Control. Yellow Fever – Technical Consensus Meeting. Geneva, 2-3 March 1998. Documento WHO/EPI/GEN/98.08.

Artigo 1

Neurological adverse events temporally associated to mass vaccination against yellow fever in Juiz de Fora, Brazil, 1999–2005

Vaccine 2007; (25): 3124–3128

Neurological adverse events temporally associated to mass vaccination against yellow fever in Juiz de Fora, Brazil, 1999–2005

Guilherme Côrtes Fernandes^{a,b,*}, Luiz Antonio Bastos Camacho^b, Marilia Sá Carvalho^b,
Maristela Batista^c, Sonia Maria Rodrigues de Almeida^c

^a Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^b Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Vigilância Epidemiológica, Prefeitura Municipal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

Available online 30 January 2007

Abstract

The identification of adverse events following immunization (AEFI) and their prompt investigation are important to allow a timely and scientifically based response to the users of immunization services. This article presents an analysis of notified AEFI cases between 1999 and 2005 and their temporal association with 2001 yellow fever vaccination campaign, AEFI notification attributed to yellow fever vaccination rose from 0.06 to 1.32 per 100,000 vaccinees in Brazil, between 1998 and 2000. During the 2001 yellow fever mass vaccination campaign held in Juiz de Fora, Brazil, 12 cases of aseptic meningitis were temporally associated to yellow fever vaccination, but clinical and laboratory data were not available to confirm nor deny causality. Epidemiological studies associated to enhanced surveillance and standardized protocols should take advantage of public health interventions like mass vaccination campaigns and implementation of new vaccination strategies in order to assess and investigate vaccine safety.

© 2007 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Yellow fever vaccine; Adverse effects; Adverse events following immunization; Brazil; Mass vaccination campaign

1. Introduction

The perception of risks and benefits involving the use of vaccines does not always follow scientific criteria [1]. Causality has often been inferred from the mere temporal sequence of facts [2]. The greatest limitation of data from surveillance of adverse events following immunization (AEFI) results from the very definition of AEFI cases: signs or symptoms that follow the application of a vaccine and that are believed to be caused by the vaccine. The great challenge to surveillance of AEFI is to distinguish abnormalities caused by vaccines from those associated to unrelated conditions. The investigation must be swift to preserve the public's confidence

and avoid vaccine coverage to be harmed by false alarms or by genuine adverse reactions approached inadequately or untimely.

1.1. Vaccination and surveillance of adverse events in Brazil

In Brazil, the vaccines included in the basic vaccination calendar are available for free in all primary health care units. The yellow fever vaccine is offered exclusively by the public service. Epidemiological surveillance system organized by the Ministry of Health collects and analyzes data on selected infectious diseases. SINAN (the acronym for the national system for notification of diseases) includes meningitis as one of the syndromes of mandatory reporting and investigation. Surveillance of adverse events following immunization (AEFI) has been conducted by the National Immunization Programme (NIP). The AEFI National Surveillance System processes data generated in a standardized form by vaccination teams and healthcare workers.

* Corresponding author at: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480-Sala 820, Manguinhos, 21041-210 Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55 32 3234 7387; fax: +55 21 2598 2630.

E-mail addresses: gcortes@ensp.fiocruz.br,
gcortes@riscobiologico.org (G.C. Fernandes).

1.2. The yellow fever vaccine

The yellow fever vaccine is generally considered safe. Common adverse events are mild and occur 5–7 days after vaccination. Revaccination is even safer with regard to events associated to viremia [3–6]. The vaccine virus' neurovirulence has been demonstrated in animal experiments and in encephalitis reports, mainly in children. The incidence of post-vaccination encephalitis was estimated as 0.5–4.0/1000 in infants less than 6 months old [3,5], and as 1/1,000,000 or less in adults [3,7]. Post-vaccination encephalitis is characterized by the onset, 7–21 days after vaccination, of fever and variable neurological signs (including meningismus, convulsion, obtundation and paresis) associated to altered cerebral spinal fluid tests (100–500 cells and increased protein concentration) [3]. Clinical course is typically brief and recovery generally complete [3]. Although abnormal brain function is the important distinguishing feature between encephalitis and meningitis, this distinction is frequently blurred since some patients may have both a parenchymal and meningeal process with clinical features of both. Acknowledging the overlap, the term *meningoencephalitis* is frequently used for that condition.

Currently, yellow fever vaccine is given to children aged 9 months in endemic areas (Amazon region and parts of other six states). The efforts to avert the reintroduction of yellow fever in urban areas were intensified through yellow fever vaccination for all age groups. Of the 80 million doses applied since 1994, 34 million (43%) were applied in 1999–2001 period. AEFI attributed to yellow fever vaccination rose from 0.06 to 1.32 per 100,000 vaccinees in Brazil, between 1998 and 2000 [4]. In that period three neurological events (0.09 per million) were reported (one encephalitis and two cases of paralysis) [4]. Since introduction of routine yellow fever vaccination in 1999, three yellow fever vaccination campaigns were held in Juiz de Fora, State of Minas Gerais, targeting different age groups: in 1999 children between 9 months and 5 years old; in 2000, people older than 60 years; and in 2001, the entire population. During the 2001 vaccination campaign held between March and April there was a rise in the number of reported neurological manifestations in Juiz de Fora characterised as aseptic meningitis temporally associated to yellow fever vaccination.

This article presents an analysis of notified AEFI cases following yellow fever vaccination held in a municipality where the resources and the challenges of the primary care network to deal with those issues are typical in Brazil. The study sought to expand the analysis of data from AEFI surveillance in the local level, particularly during mass vaccination campaigns. Of special interest is the analysis of aseptic meningitis for which the association with the yellow fever vaccine is still unclear.

2. Materials and method

The study analyzed all AEFI cases attributed to yellow fever vaccine notified in Juiz de Fora city, from January 1999 to December 2005. Juiz de Fora is a 457,000 inhabitants city located in the southeast region of Brazil. The sources of data for the study were (i) AEFI National Surveillance System notification forms; (ii) SINAN investigation forms for meningitis; (iii) records of administered doses of yellow fever vaccine. The case definition for aseptic meningitis considered as AEFI was based on (i) the time interval (up to 30 days) for the occurrence of neurological signs and symptoms following vaccination, (ii) clinical manifestation and abnormalities in cerebrospinal fluid consistent with aseptic meningitis, (iii) notification to the AEFI surveillance system, (iv) notification to the SINAN and (v) aseptic meningitis cases investigated and confirmed by the Epidemiology Department.

Data analysis was performed using the software SPSS Version 9.0. The denominator for estimation of notification rates was the number of doses of yellow fever vaccine in each study period. Neither denominator nor numerator data distinguished between primary and secondary vaccinees. The results were compared to data from the NIP and to published data.

3. Results

Of the 499,714 doses of yellow fever vaccine applied in Juiz de Fora between 1999 and 2005, 62.0% (309,920 doses) were administered during the March–April 2001 vaccination campaign (90.0% of the total of applied doses in 2001). In

Table 1
Annual rate (per 100,000 doses) of adverse events following immunization (AEFI) and aseptic meningitis rate (per 100,000 inhabitants)

Year	AEFI (N)	Doses (N)	Rate during campaign	Annual rate	Aseptic meningitis rate
1999	4	43,685	9.2	9.2	8.5
2000	2	64,068	3.1	3.1	2.6
2001	46	344,195	12.9	13.4	10.1
2002	0	9,843	–	–	6.1
2003	0	12,740	–	–	2.0
2004	2	13,754	–	14.5	5.2
2005	1	11,429	–	8.7	1.1
1999–2005	55	499,714	11.0	11.0	

Juiz de Fora, 1999–2005.

Table 2
Rates of adverse event following immunization by age group

Age group	AEFI (N)	Doses (N)	Rate per 100,000
<1 year old	3	23,492	12.8
1–5 years old	3	51,841	5.8
5–15 years old	9	65,121	13.8
15–59 years old	33	352,490	9.4
>60 years old	3	46,739	6.4
Not informed	4	–	–

Juiz de Fora, 1999–2005.

1999, 92.0% of doses were administered in children under 14 years of age (39,950 doses). In 2000, 62.5% (40,024 doses) of vaccinees were over 60 years of age. In subsequent years, most doses were given in routine immunization of children.

The study analyzed 55 AEFI cases attributed to yellow fever vaccine during the 1999–2005 period. Most AEFI notifications attributed to yellow fever vaccine occurred in 2001 (72.7%, $n=40$) and were concentrated in March and April. The AEFI notification rate reached a peak in 2001, when the annual notification rate was four times higher than the previous year (Table 1). Although most notified AEFI (60.0%) occurred in the 15–59 years age group, the notification rate was similar in that age group (9.4 per 100,000 doses) and those younger than 5 years old (8.0 per 100,000) (Table 2). In 89.1% of all notifications the yellow fever vaccine had been the only vaccine administered. The vaccine had been applied during campaigns in 72.7% of the AEFI reported cases. The vaccines were within their expiration date and the AEFI involved different lot numbers.

There was no statistically significant difference in the distribution of cases by gender (49.1% were women). Systemic events accounted for 87.3% of notifications. Frequent clinical manifestations included fever ($n=44$), vomiting ($n=39$), headache ($n=21$), meningismus ($n=9$), myalgia ($n=10$) and arthralgia ($n=8$). Jaundice was described in two cases, including one with associated abdominal pain. Reports of neurological manifestation were limited to the year 2001. Twenty-four (43.6%) of systemic events received medical assistance in hospitals or emergency rooms.

An increment in the rate of aseptic meningitis (10.1 per 100,000 inhabitants; 3.87 per 100,000 doses) was observed in 2001 during the vaccination campaign period (Table 1 and Fig. 1). Fifty percent of the total notified as aseptic meningitis in SINAN in 2001 ($n=46$) occurred in individuals older than 15 years old (Fig. 1). Of these, 12 were temporally linked to 2001 yellow fever vaccination (being 10 in April) and generated AEFI notification forms at the Epidemiology Department in Juiz de Fora. The median time between vaccination and meningitis was 17.5 days. The time interval for the beginning of fever episodes after yellow fever vaccination varied from 8 hours to 21 days, with a median of 5 days. All aseptic meningitis cases received medical care and were cured without sequelae. None of these notified cases presented fever or other symptoms within 72 hours before vaccination.

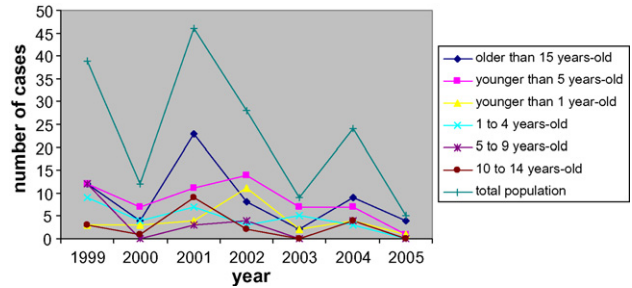


Fig. 1. Distribution by year and age group of aseptic meningitis cases, Juiz de Fora Brazil, 1999–2005.

4. Discussion

Limitations of passive surveillance systems (based on spontaneous reporting) of AEFI include (i) both under-notification and over-notification, (ii) problems inherent to completion of the notification form and data sources, (iii) poorly defined cases and (iv) inaccurate estimation of denominators. Partly filling those gaps a few observational epidemiological studies have investigated adverse events following immunization and estimated their frequency and association with vaccines [5,7–9,3].

In the first 7 years of yellow fever vaccination in Juiz de Fora, the most severe AEFI attributed to this vaccine was aseptic meningitis, and its clustering in time did not appear to have, in the reference period and region, other identifiable determinant factors. The vaccine coverage in the local population was 67.8% during the 2001 vaccination campaign and the cumulative coverage reached 98.8% in that year. With such a high proportion of the population exposed to the yellow fever vaccine, even a coincident outbreak of aseptic meningitis from other causes was likely to be attributed to the vaccine. The investigation of cases, along with available clinical, laboratory and epidemiological data, did not offer sufficient elements to assess the association with yellow fever vaccine. Firstly, many notified events were non-specific and could result from other health disturbances. Besides, vaccination against yellow fever had been recently introduced in the region and by that time, there were general concerns about the vaccine's safety, so that it could represent an easy and convenient explanation for cases with incomplete clinical and laboratory investigation. In the study scenario, the healthcare workers' perception of the existence of an association between yellow fever vaccine and neurological events may have misled both detection and notification of cases.

Temporal association between adverse events and vaccination is necessary, but insufficient to analyze causality [10]. The AEFI definition has low specificity [11] and data from passive notification may bias epidemiological studies [12]. In the present study, notification rates rather than incidence rates were estimated. Besides, the only available information was the occurrence of adverse events among vaccinees (outcome data among exposed individuals), thus hampering the estimation of relative risk [13,14].

The biological plausibility of that association is given by the vaccine virus neurovirulence, by previous reports of post-vaccination encephalitis and other neurologic manifestations and by the observed time between vaccination and symptoms [3]. However, there was not an effective clinical and laboratory investigation of suspected cases to support causality by the vaccine virus, and to make differential diagnosis.

Rates of notified AEFI varied substantially across age groups, but the difference may not be meaningful given that these rare events generated unstable rates (Table 2). The age groups affected by neurological events (older children and adults) were not in the risk age group for encephalitis reported in the literature: infants younger than 9 months and the elderly (no serious AEFI reported) [3,8,15]. The rate of notified AEFI against yellow fever observed in Juiz de Fora during the study period – 11.0/100,000 doses – was much higher than those estimated from NIP data between 1999 and 2001—0.75/100,000 [16] and published data [3,17]. It was even higher (12.9 per 100,000 doses) during the 2001 vaccination campaign period, suggesting that surveillance could have been enhanced in that period. The 12 cases of aseptic meningitis notified in 2001 during the Juiz de Fora mass campaign indicate a notification rate of neurological events much higher (3.87/100,000) than that observed in the rest of the study period (0.0/100,000), for post-vaccination encephalitis in Kenya in 1993 (0.58/100,000) [3], in Ivory Coast during mass campaign vaccination in 2001 (0.0/2,600,000) [7] and for neurotropic events in the United States, based on passive reporting data from 1990 to 2002 (0.4/100,000) [15]. In the Brazilian NIP records there were four cases of aseptic meningitis among 13,715,643 doses applied in 2001 (0.03/100,000) one encephalitis case in 2002 (4,444,393 doses) and no cases in 2003 (4,609,758 doses). In the city of Campinas, Brazil, there was an outbreak of aseptic meningitis temporally associated to the 2000 yellow fever vaccination campaign (unpublished data from Health Secretary from São Paulo). Seven hundred and twenty-three aseptic meningitis cases occurred during the vaccination period when 2,070,000 doses were applied (34.9 per 100,000). The time between vaccination and symptoms varied from 12 to 30 days. The investigation did not find clinical or laboratory evidence of association of cases to the vaccine.

The simultaneous increase in the utilization of yellow fever vaccines and implementation of the AEFI surveillance system may explain the increased detection of AEFI cases attributed to yellow fever vaccine in Brazil in the last few years. Vaccination campaigns and introduction of a new vaccination strategy may also influence the notification profiles. The higher incidence of notifications in mass campaigns may be due to an actual increase of AEFI incidence, to a change in perception of AEFIs or to coincidence of other diseases. In addition to the rate of AEFI, vaccination in mass campaign, which included all age groups, might have influenced the type of events attributed to the vaccine.

The investigation of possible AEFI outbreaks, even if supported or conducted by State or Federal officers, depends mainly on the ability to detect and analyze data locally [18]. Consolidated data for states and the whole country may be of limited use to identify AEFI related to local vaccination campaigns, since their effects are diluted in large data sets. Besides, information generated by analysis at a central level may not reach local level with the needed detail and swiftness to allow decision-making.

Identification of AEFI through notification of meningitis to SINAN enhanced the surveillance system's sensitivity. This finding associated to the notification of a vaccine related case of jaundice and abdominal pain in Juiz de Fora showed the preparedness for detecting AEFI from morbidity data (aseptic meningitis and viscerotropic disease).

The analysis presented indicated opportunities to improve data quality, mainly regarding the development of a standardized procedures protocol before implementation of a new vaccination strategy. In addition to the improvement of well-established routine AEFI surveillance, sentinel surveillance analogous to the protocol developed in Brazil for visceralization may provide clinical evidence strong in itself to support causality and to contribute to epidemiological studies. There is also room for improvement on aspects regarding data gathering and analysis: (i) baseline AEFI notification rates using data from routine vaccination; (ii) integrated analysis with infectious diseases surveillance data, AEFI passive surveillance system data and number of applied doses; (iii) local, regional and national data analysis, considering vaccination strategy and lot number used in different regions; (iv) clinical and laboratory investigation of suspected AEFI cases; (v) development of a standardized procedures protocol before implementation of a new vaccination strategy.

Yellow fever vaccine coverage has been suboptimal in Juiz de Fora city since 2001, because of safety concerns both from local population and from healthcare workers. The investigation has not preserved the public's confidence and has not avoided vaccine coverage to be harmed by false alarms or by genuine adverse reactions approached inadequately or untimely. The major challenge of AEFI surveillance systems is to address, based on epidemiological and clinical investigations, questions and hypotheses raised during daily activities of health services. The putative association of aseptic meningitis is a recurrent issue and should be targeted in future studies taking advantage of mass vaccination campaigns or using a case-control approach. Epidemiological studies should be routinely performed in order to: (i) assess public health interventions and health policies; (ii) help decision-making process; (iii) ensure public health interventions based on scientific criteria. Taking advantage of public health interventions (like mass vaccination campaigns or introduction of a new vaccination strategy), may provide larger datasets and the possibility to design epidemiological studies (e.g. case-control approach) and to link morbidity data and AEFI data.

References

- [1] Spier RE. Perception of risk of vaccine adverse events: a historical perspective. *Vaccine* 2002;20:S78–84.
- [2] Fine PEM, Chen RT. Confounding in studies of adverse reactions to vaccines. *Am J Epidemiol* 1992;136(2):121–35.
- [3] Monath TP. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 4th ed. Philadelphia, WB: Saunders Company; 2004. p. 1095–176.
- [4] Brasil Ministério da Saúde FUNASA. Eventos adversos sérios associados com a vacina 17D contra a febre amarela.
- [5] CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Notice to readers: fever, jaundice, and multiple organ system failure associated with 17D-derived yellow fever vaccination, 1996–2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50(30):643–5.
- [6] Camacho LAB, Aguiar SG, Freire MS, Leal ML, Nascimento JP, Igushi T, et al. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomised, placebo-controlled trial. *Rev Saúde Públ* 2005;39(3):413–20.
- [7] Fitzner J, Coulibaly D, Kouadio DE, Yavo JC, Loukou YG, Koudou PO, et al. Safety of yellow fever vaccine during the September 2001 mass vaccination campaign in Abidjan, Ivory Coast. *Vaccine* 2004;23:156–62.
- [8] Martin M, Weld LH, Tsai TF, Mootrey GT, Chen RT, Niu M, et al. Advanced age as risk factor for illness temporally associated with yellow fever vaccination. *Emerg Infect Dis* 2001;7(6):945–51.
- [9] Struchiner CJ, Luz PM, Dourado I, Sato HK, Aguiar SG, Ribeiro JG, et al. Risk of fatal adverse events associated with 17DD yellow fever vaccine. *Epidemiol Infect* 2004;132:939–46.
- [10] Rosenthal S, Chen RT. The reporting sensitivities of two passive surveillance systems for vaccine adverse events. *Am J Public Health* 1995;85(12):1706–9.
- [11] Fine PEM. Methodological issues in the evaluation and monitoring of vaccine safety. Combined vaccines and simultaneous administration—current issues and perspectives. *Ann NY Acad Sci* 1995;759:300–8.
- [12] Farrington CP, Nash J, Miller E. Case series analysis of adverse reactions to vaccines: a comparative evaluation. *Am J Epidemiol* 1996;143(11):1165–73.
- [13] Chen RT, Orenstein WA. Epidemiologic methods in immunization programs. *Epidemiol Rev* 1996;18(2):99–117.
- [14] Chen RT, Pool V, Takahashi H, Weniger BG, Patel B. Combination vaccines: postlicensure safety evaluation. *Clin Infect Dis* 2001;33(Suppl 4):S327–33.
- [15] Khromava AY, Eidex RB, Weld LH, Kohl KS, Bradshaw RD, Chen RT, et al. Yellow fever vaccine: an update assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine* 2005;23:3256–63.
- [16] Brasil Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde CD-rom Encontro do PNI. Brasília, Centro Nacional de Epidemiologia/Coordenação Geral do PNI, 2003.
- [17] CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Adverse events associated with 17D-derived yellow fever vaccination—United States, 2001–2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002 51(44):989–93.
- [18] Fernandes GC, Camacho LAB, Carvalho MS. Surveillance system of vaccine adverse events and local data analysis—the experience in a middle sized city in Brazil, 1999–2001. *Vaccine* 2005;23:2349–53.

Artigo 2

Imunogenicidade e reatogenicidade da vacinação contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade em área endêmica de dengue.

Imunogenicidade e reatogenicidade da vacinação contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade em área endêmica de dengue.

Guilherme Côrtes Fernandes^{1,3}, Luiz Antonio Bastos Camacho¹, Rita Maria Ribeiro Nogueira² e Grupo Colaborativo de estudos com vacinas contra febre amarela

¹ *Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz – ENSP/FIOCRUZ*

² *Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ*

³ *Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora*

Resumo: A vacina contra febre amarela é aplicada na rotina de vacinação de crianças brasileiras aos 9 meses de idade em muitas regiões em que a dengue é endêmica e tem causado epidemias. O objetivo desse estudo foi analisar a interação entre a presença de anticorpos contra dengue e a imunogenicidade e reatogenicidade da vacinação contra febre amarela em crianças. A relevância desta análise está nas possíveis implicações para as estratégias de vacinação contra febre amarela em áreas endêmicas para dengue. Voluntários de um ensaio clínico multicêntrico, duplo-cego, randomizado realizado para investigar a imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela dos centros colaboradores onde houve detecção de transmissão de dengue durante o período do estudo (N=626) foram selecionados para análise. Foram dosados anticorpos contra febre amarela (PRNT) em amostras coletadas antes e 30 dias ou mais após a administração da vacina antiamarílica e anticorpos da classe IgG contra dengue, sorotipos 1, 2 e 3 (ELISA) nas amostras coletadas antes da vacinação antiamarílica. A idade média no dia da vacinação foi de 9,6 meses (desvio padrão: 1,4 meses). A proporção de duplicação de nível de anticorpos contra febre amarela após a vacinação foi de 87,6% e a proporção de quadruplicação foi de 80,4%. Não houve diferença estatisticamente significativa na proporção de duplicação ($p=0,624$) e quadruplicação ($p=0,965$) de anticorpos contra febre amarela segundo nível de anticorpos contra dengue. A presença de anticorpos contra dengue (13,6%) também não influenciou a soropositividade pós-vacinal contra febre amarela ($p=0,334$). Não foram detectados eventos adversos graves. A proporção de eventos adversos leves (como febre e dor no local de aplicação da vacina) foi inversamente proporcional ao nível de anticorpos contra dengue totalizando 19,8% no total de crianças. Não foi observada associação entre nível de anticorpos contra dengue ($p=0,128$) e imunogenicidade das vacinas contra febre amarela nos modelos de regressão linear. A presença de anticorpos contra dengue, independentemente de seu título, não interferiu na imunogenicidade ou no padrão de reatogenicidade das vacinas contra febre amarela (17D e 17DD) aplicadas em crianças residentes em áreas endêmicas.

Introdução

No Brasil, os flavivírus endêmicos e de maior importância para a saúde pública são os vírus da dengue e da febre amarela, ambos pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (Vasconcelos, 2003). A febre amarela é transmitida por vetores hematófagos da família *Culicidae*, especialmente dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus*. A dengue é transmitida pelo vetor responsável pela transmissão da febre amarela urbana (*Aedes aegypti*), sendo uma doença endêmica em todo Brasil com epidemias sazonais com os sorotipos 1, 2 e 3. Embora não se registrem casos de febre amarela urbana no Brasil desde 1942, a utilização da vacina contra febre amarela tem aumentado no Brasil como estratégia de intervenção em resposta à expansão da área endêmica e à ocorrência de epidemias de febre amarela silvestre próximas a grandes centros urbanos (Ministério da Saúde, 2000). A vacinação contra febre amarela atualmente é aplicada na rotina de vacinação de crianças aos nove meses de idade em diversas regiões brasileiras que são também endêmicas para a transmissão do vírus da dengue. Em um estudo observacional realizado no Brasil com a vacina 17DD, foi demonstrada soroconversão de 97% em indivíduos com idades de 10 anos ou mais, 94% nas crianças de 2 a 9 anos, 88% nas crianças de 12 a 23 meses, 72% nas de 9-11 meses e 82% nas de 6-8 meses. Nos lactentes de 9 a 11 meses a soroconversão foi de 67% (Grupo Colaborativo, 2003). As implicações de uma menor soroconversão em crianças, independentemente de seus determinantes, são enormes para o controle da endemia.

Apesar de evidência prévia em dois estudos (Pengsa et al., 2003, 2006) ter indicado baixa prevalência de anticorpos maternos contra dengue em crianças aos nove meses de idade (respectivamente 20% e 13%), estudo recente (Simmons et al., 2007) indicou que a meia vida dos anticorpos contra dengue transferidos via placentária é semelhante a dos anticorpos contra sarampo e que ainda foram detectados anticorpos IgG em 84% das crianças aos 9 meses de idade. Embora não haja até o momento indicações de que a imunogenicidade e reatogenicidade da vacina contra febre amarela sejam afetadas pela presença de anticorpos contra dengue (infecção prévia por dengue ou pela presença de anticorpos maternos), os dados ainda são inconclusivos. A investigação da interferência de anticorpos contra dengue na resposta vacinal contra febre amarela é da maior importância no momento em que se intensificam esforços para ampliar a cobertura vacinal como estratégia para evitar a reurbanização da febre amarela.

A hipótese de interferência se baseia na semelhança antigênica do vírus da febre amarela e outros membros da família *Flaviviridae*. A imunidade cruzada entre flavivírus poderia resultar em variações de imunogenicidade e reatogenicidade às vacinas contra febre

amarela em indivíduos previamente expostos aos demais flavivírus (Monath, 2005). Há evidências experimentais de que a resposta imunológica aos vírus das vacinas contra febre amarela pode ser modificada pela infecção por outros vírus da mesma família (Henderson *et al.*, 1970; Theiler & Anderson, 1975), porém dados sobre interferência dos vírus da dengue e da cepa 17D do vírus da febre amarela em humanos ainda são conflitantes (Smith *et al.*, 1962; Fabiyi & MacNamara, 1962; Belmusto-Worn *et al.*, 2005). Henderson *et al.* (1970) e Theiler & Anderson (1975) observaram viremia mais baixa após infecção por febre amarela, em macacos imunizados anteriormente com outros flavivírus. Indivíduos previamente vacinados com vacina 17D e posteriormente vacinados contra encefalite do carrapato (TBE – *tick borne encephalitis*) apresentam elevação de anticorpos mais precocemente e em níveis mais elevados (Monath, 2005). Também há a possibilidade de infecção prévia por um flavivírus e consequente presença de anticorpos heterólogos causar imunidade cruzada e interferir na resposta da vacina contra febre amarela: estudos experimentais com macacos sugeriram proteção cruzada entre alguns flavivírus como dengue, Wesselsbron e Zika e o vírus selvagem da febre amarela (Monath, 2005; Smith *et al.*, 1962).

Em adultos da Malásia, a intensidade na resposta com anticorpos neutralizantes após a injeção subcutânea de vacina 17D, foi maior entre os indivíduos que não tinham anticorpos heterólogos, embora as taxas de soroconversão não fossem substancialmente diferentes. Fabiyi & MacNamara (1962) mostraram que a presença de anticorpos fixadores de complemento contra vírus sorologicamente relacionados à febre amarela interferiam na resposta imunológica à vacina contra febre amarela 17D. Belmusto-Worn (2005) observaram taxas de soroconversão para febre amarela semelhantes em crianças com e sem anticorpos neutralizantes para qualquer dos sorotipos de dengue antes da vacinação contra febre amarela no grupo que recebeu a vacina Arilvax® da subcepa 17D (93,6% e 94,4%, respectivamente). No entanto, no grupo que recebeu a vacina YF-VAX® da subcepa 17D, as crianças com imunidade prévia ao dengue apresentaram maior taxa de soroconversão (92,0% *versus* 82,7%) quando comparadas às crianças sem anticorpos neutralizantes. Em dados de um estudo com vacina experimental tetravalente contra dengue, foi observada tendência a aumento de título médio de anticorpos contra dengue no grupo que recebeu previamente vacinação contra febre amarela (vacina 17D) (Poo *et al.*, 2009). Apesar desses dados, se considera que a resposta à vacina 17D com anticorpos neutralizantes é altamente específica (Wisseman *et al.*, 1962). Não há evidências de que imunidade prévia contra outros flavivírus exacerbe a resposta imune ao vírus vacinal (Monath, 2004) ou interfira no padrão de reatogenicidade à vacina 17DD aplicada em áreas endêmicas (Monath, 2005).

Um outro fator que deve ser considerado na análise e interpretação dos dados é a possibilidade de reação cruzada entre testes sorológicos para arboviroses (Bancroft *et al.*, 1984; Eckels *et al.*, 1985; Shope *et al.*, 1997). Diferentes métodos, com diferentes sensibilidades são utilizados para aferição de anticorpos neutralizantes. Testes para detecção de anticorpos neutralizantes têm sido utilizados em estudos clínicos desde a década de 1930 (Monath, 2004). Os testes PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*) têm sensibilidade que variam de 50% a 90% (Spector e Tauraso, 1968, 1969) e têm sido utilizados em muitos estudos clínicos (Monath *et al.*, 2008). Essa diferença de sensibilidade, além da variabilidade entre testes PRNT e a falta de padronização e definição de um limiar com correlação de proteção nos testes explicam parte das diferenças de título médio geométrico de anticorpos observados em diferentes estudos, apesar de não ter sido observada a mesma tendência de diferenças nas proporções de soroconversão (superior a 90%) encontradas nos estudos (Monath *et al.*, 2008). Reações cruzadas por infecções de outros flavivírus podem ocorrer nos diferentes métodos sorológicos para diagnóstico de imunidade contra febre amarela disponíveis e complicam o diagnóstico de infecções por febre amarela ou de outros flavivírus, principalmente em áreas onde há circulação de outros flavivírus (Monath *et al.*, 2008).

Apesar da resposta primária a vacina 17D ser considerada muito específica, caracterizada por nenhuma ou pouca elevação de anticorpos contra outros flavivírus (Wisseman *et al.*, 1962), o fenômeno de “*original antigenic sin*” complica as investigações sorológicas dos flavivírus (Monath *et al.*, 2008). Indivíduos com infecção prévia por outros flavivírus, quando vacinados contra febre amarela, apresentam elevação da resposta sorológica tanto a infecção primária quanto a vacina (Wisseman *et al.*, 1962; Monath *et al.*, 1971, 1980). De forma similar, indivíduos que tenham imunidade por vacinação prévia contra febre amarela respondem a uma infecção por flavivírus com resposta imunológica não somente a nova exposição antigênica mas também com elevação na detecção de anticorpos contra febre amarela (Monath *et al.*, 2008). Em um estudo foi observada reação cruzada em 10,7% dos testes com soro com anticorpos contra dengue testados com IgM ELISA utilizando antígeno de febre amarela (Vazquez *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou que 68,1% de indivíduos com dengue testados por MAC ELISA apresentaram positividade ao antígeno de febre amarela (Nogueira *et al.*, 1992). Em um estudo com vacina experimental tetravalente contra dengue, foi observada tendência de aumento do título médio de anticorpos contra dengue (PRNT) no grupo que recebeu previamente vacinação contra febre amarela (Poo *et al.*, 2009). Os testes IgG ELISA para dengue são pouco específicos em indivíduos vacinados contra febre amarela, quando reações cruzadas com detecção de IgG contra dengue por

ELISA podem ocorrer em até 44% dos indivíduos vacinados contra febre amarela (Schwartz *et al.*, 2000).

A compreensão sobre a natureza da interferência imunológica entre flavivírus e sua influência na vacinação contra febre amarela talvez possa ser ampliada pela investigação de possível imunidade cruzada em nível celular. No entanto, os dados sobre resposta imune celular à vacinação ou à infecção natural ainda são escassos.

O objetivo deste estudo é analisar a interação da presença de anticorpos contra dengue detectados em amostras pré-vacinais e a imunogenicidade e reatogenicidade da vacinação contra febre amarela em crianças. A relevância desta análise está nas possíveis implicações nas estratégias de vacinação contra febre amarela em áreas endêmicas para dengue, haja visto que a identificação de menor imunogenicidade em indivíduos com anticorpos contra dengue ou alteração no padrão de reatogenicidade vacinal poderá acarretar a necessidade de revisão nas estratégias de vacinação contra febre amarela em áreas endêmicas para dengue.

Método

Um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, foi realizado para investigar a imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela (17D213/77 e 17DD) em crianças (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007) e identificar seus determinantes. Por ter sido realizado em períodos de epidemia de dengue, representou uma oportunidade de investigação da possível associação entre resposta imunológica humoral a vacina contra febre amarela e a situação sorológica para dengue. As análises foram baseadas em comparações de grupos não randomizados.

O ensaio clínico teve caráter multicêntrico e envolveu regiões onde a vacinação contra febre amarela está prevista no calendário básico de imunizações do Ministério da Saúde, sendo parte das atividades de rotina das unidades básicas de saúde. O Centro Coordenador do Estudo foi sediado na Assessoria Clínica do Instituto de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da FIOCRUZ.

Foram convidados a participar do estudo indivíduos com menos de 2 anos de idade, sem história de vacinação contra febre amarela, que não apresentavam contraindicações à vacinação e que se apresentaram espontaneamente para vacinação em centros de saúde da rede pública. Os critérios de elegibilidade para a vacinação e os procedimentos na sala de vacina seguiram as normas do Programa Nacional de Imunizações. Para proteção dos voluntários, o protocolo da pesquisa foi elaborado em conformidade com as Resoluções 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Os responsáveis legais pelos indivíduos elegíveis para vacinação foram informados dos objetivos

e métodos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Parecer CEP-FIOCRUZ: 236A/03) e Campo Grande-MS (CEP-UFMS, Protocolo 738/2006). O projeto foi registrado no SISNEP (Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Registro no SISNEP: CAAE - 0038.1.011.000-03). O ensaio clínico está registrado no International Standard Randomised Controlled Trial Number Register (<http://www.controlled-trials.com/isrctn>) sob o número ISRCTN 72367932.

Entre outubro de 2005 e dezembro de 2006 foram recrutadas 1.966 crianças em 4 centros colaboradores: os municípios de Ribeirão das Neves e Contagem na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (N=521); municípios de Juiz de Fora, Lima Duarte e Matias Barbosa em Minas Gerais (N=819); município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (N=374) e município de Ribeirão Preto, São Paulo (N=252).

Foi selecionada uma subamostra (N=626) para testagem de presença de anticorpos contra dengue em todas as amostras sorológicas de indivíduos randomizados nos centros colaboradores onde foi detectada transmissão de dengue durante o período de realização do estudo (Campo Grande, n=374; Ribeirão Preto, n=252). Considerando uma amostra de tamanho N=500 em situação de baixa prevalência de sorologias pré-vacinais positivas para dengue (N1=60 em um dos grupos de comparação), um teste bicaudal com nível de significância de 0,05 teria poder de 82% para identificar diferenças de proporções de soroconversão para febre amarela entre os grupos de comparação de 72% e 88% (*odds ratio* de 2,85). Com o objetivo de aferir a homogeneidade da subamostra, dada sua característica não probabilística, foram construídos histogramas e curvas de distribuição das variáveis demográficas e sorológicas, assim como medidas para estimativas de variabilidade da amostra segundo centro colaborador e grupo de randomização.

Os voluntários do ensaio clínico foram randomizados para receberem uma das vacinas do estudo e serem submetidos a exames de sangue e entrevistas antes e 30 dias depois da vacinação. Duas subcepas vacinais foram comparadas: (i) vacina 17DD produzida em Bio-Manguinhos, FIOCRUZ e em uso pelo Programa Nacional de Imunizações em áreas endêmicas; e (ii) uma vacina produzida em Bio-Manguinhos a partir do lote-semente WHO 17D-213/77, somente para pesquisa, e utilizada previamente em estudo controlado e randomizado em adultos (Camacho *et al.*, 2004). A distribuição, o manuseio e a aplicação das vacinas seguiram as recomendações do fabricante (Biomanguinhos/ FIOCRUZ) e do Programa Nacional de Imunizações (Ministério da Saúde, 2001).

Métodos laboratoriais

Foram dosados anticorpos contra febre amarela (testes de neutralização por redução em placa de lise – PRNT) (Spector e Tauraso, 1968) no Laboratório de Tecnologias Virais de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ em amostras coletadas antes e 30 dias ou mais após a administração da vacina anti-amarela. O soro das mães coletado no dia da vacinação da criança foi usado para dosagem de anticorpos contra febre amarela. A imunogenicidade das vacinas contra febre amarela foi estimada através da duplicação e quadruplicação de títulos de anticorpos contra febre amarela ou soropositividade, definida como elevação dos títulos de anticorpos neutralizantes igual ou maior a 500mUI/ml - $2,7\log_{10}$. Os testes para detecção de anticorpos da classe IgG contra dengue, sorotipos 1, 2 e 3 (ELISA) foram realizados no Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz em amostras coletadas, antes da vacinação contra febre amarela, de todas as crianças recrutadas nos centros colaboradores de Campo Grande-MS e Ribeirão Preto-SP. Soropositividade contra dengue foi definida como título de anticorpos igual ou maior do que 1:40.

Análise de dados

Para análise dos títulos de anticorpos contra febre amarela (mUI/ml) foi feita transformação logarítmica (base 10) e estimadas as médias geométricas. A análise estatística dos dados incluiu: (i) comparação das proporções de soropositividade e de soroconversão nos subgrupos definidos pela soropositividade para dengue, com significância estatística avaliada pelo teste *qui-quadrado*; (ii) comparação de médias de títulos de anticorpos contra febre amarela nos subgrupos definidos pela soropositividade para dengue, usando o teste *t*; (iii) análise multivariada (regressão linear) dos títulos de anticorpos contra febre amarela (\log_{10}) e (regressão logística) da soroconversão para febre amarela como função dos títulos para dengue ajustando para as covariáveis de interesse. A razão dos títulos pós e pré-vacinais foi calculada pela diferença dos logaritmos dos títulos. Em todas as análises o nível de significância definido foi de 0,05 com construção de intervalos de confiança de 95% para as estimativas.

Resultados

Foram analisadas 611 amostras de sangue coletadas das 626 crianças dos municípios de Campo Grande (n = 374; 59,7%) e Ribeirão Preto (n = 252; 40,3%) que participaram do ensaio clínico. Em 15 crianças (2,4%) não havia soro disponível para realizar a dosagem de anticorpos contra dengue.

A idade média foi de 9,6 meses (desvio padrão: 1,4 meses), com mediana de 9,0 meses. 51,1% das crianças selecionadas foram do sexo masculino e 48,9% feminino. O peso

médio das crianças no dia da aplicação da vacina foi de 9.074 g (desvio padrão: 1.307 g) e mediana de 9.000 g. Nos dois centros colaboradores a distribuição das crianças foi equilibrada para aquelas variáveis e para os tipos de vacina contra febre amarela (Tabela 1).

Quase metade das crianças testadas (48,8%) apresentava título de anticorpos pré-vacinais contra dengue de 40 e 30,8% (n=188) apresentavam títulos iguais ou acima de 160. A soroprevalência para dengue, o nível médio de anticorpos contra febre amarela, pré-vacinais e pós-vacinais, e a proporção mães soropositivas para febre amarela, foram semelhantes nos grupos randomizados (dados não mostrados). A frequência de títulos elevados de anticorpos contra dengue foi maior nas crianças de Campo Grande (Tabela 2).

A proporção de crianças soropositivas para febre amarela (título de anticorpos superior a 500 mUI/mL, $2,7\log_{10}$) antes e depois da vacinação, bem como a média geométrica dos títulos de anticorpos antes e depois da vacinação foram maiores nos lactentes de Campo Grande-MS (Tabela 2). A proporção de soroconversão (duplicação ou quadruplicação dos títulos de anticorpos) foi semelhante nos dois centros colaboradores (Tabela 2).

Houve registro de ocorrência de eventos adversos pós-vacinais nos 30 dias subsequentes à vacinação em 19,8% das crianças, sendo febre o evento mais comumente referido entre os vacinados (14,7%). Não houve nenhum caso detectado de evento adverso grave.

Tabela 1: Características dos lactentes e distribuição por tipo de vacina aplicada nos centros colaboradores

	<i>Campo Grande</i>	<i>Ribeirão Preto</i>	<i>Total</i>
Idade (meses) média	9,7	9,3	9,6
Desvio-padrão	1,6	1,0	1,4
Peso (gramas) média	9.201	8.943	9.075
Desvio-padrão	1.404	1.187	1.307
Sexo Masculino (%)	182 (50,0)	130 (52,6)	312 (51,1)
Tipo de vacina			
<i>WHO-17D-213/77</i>	183	123	306
<i>17DD</i>	181	124	305

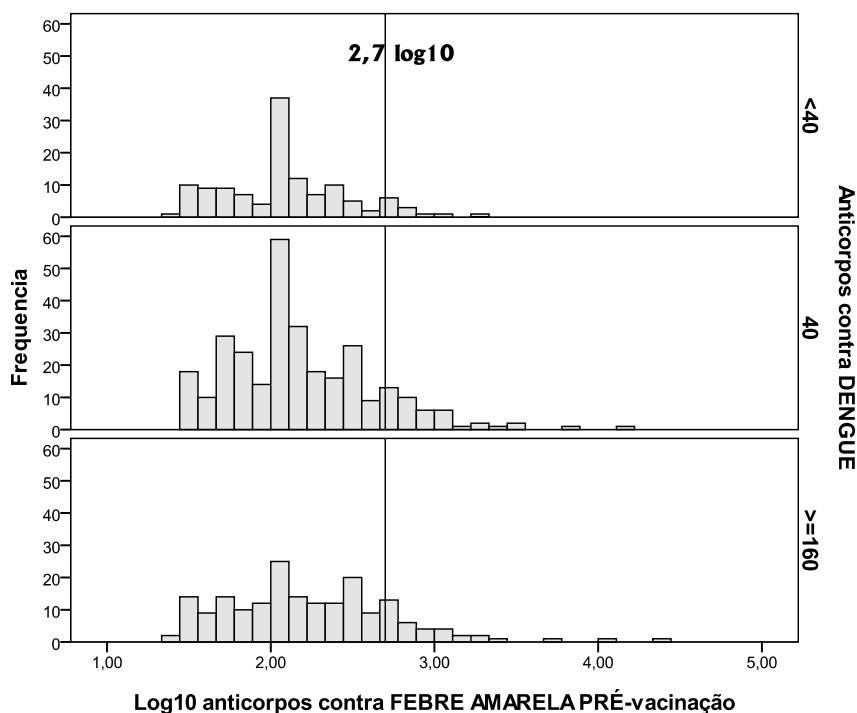
Após a vacinação os títulos de anticorpos contra febre amarela e a proporção de soropositividade sofreram expressivo aumento em relação aos títulos antes da vacinação (Tabela 2). O título médio de anticorpos pré-vacinais contra febre amarela foi tanto maior quanto maior o título de anticorpos contra dengue (respectivamente, 119,0 mUI/ml e 191,1 mUI/ml para indivíduos com título sorológico contra dengue menor que 40 e maior que 640 Figura 1-a; $p=0,004$). Essa tendência também foi observada, porém de forma mais discreta para o título médio de anticorpos pós-vacinais contra febre amarela, respectivamente 2.197,7 mUI/ml e 3.326,7 mUI/ml para indivíduos com título sorológico contra dengue menor que 40 e maior que 640 (Figura 1-b; $p=0,07$).

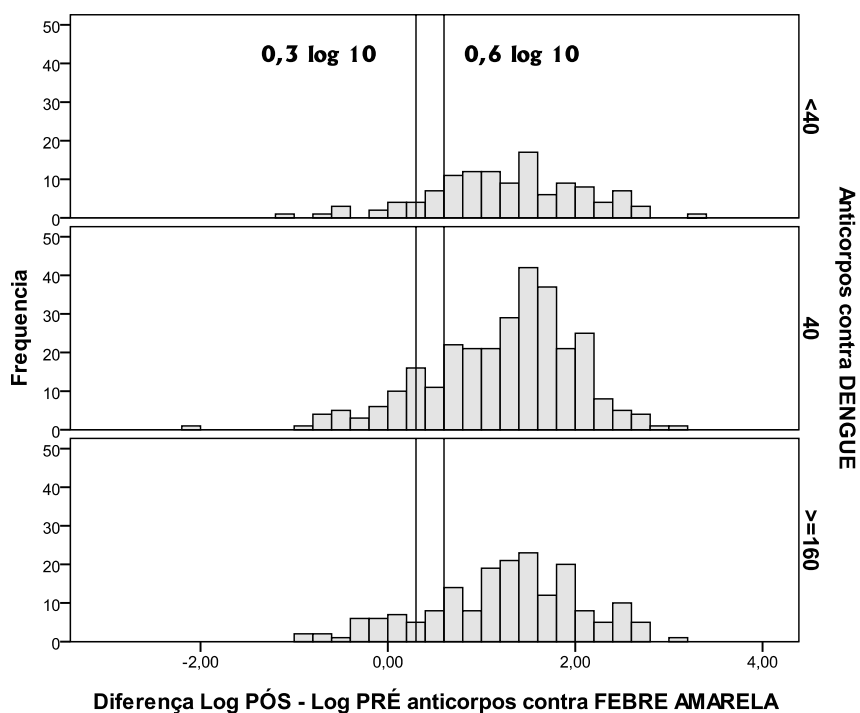
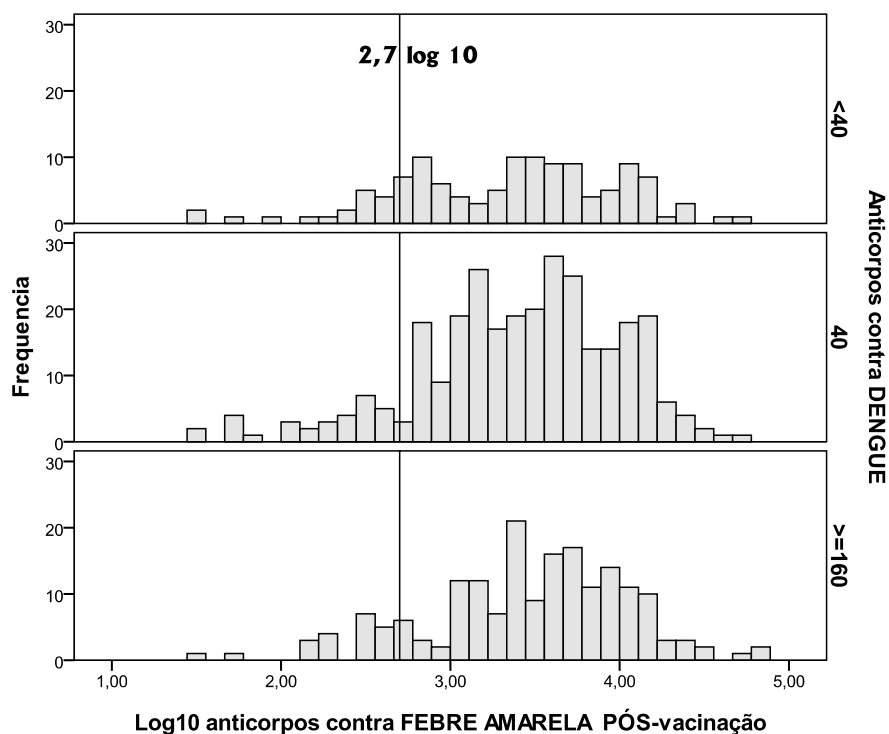
Tabela 2: Proporção de soropositividade e médias de títulos de anticorpos contra febre amarela e dengue segundo centro colaborador

	<i>Campo Grande</i>	<i>Ribeirão Preto</i>	<i>Total</i>
Febre amarela	n (%)	n (%)	N (%)
<i>Soropositividade pré-vacinal</i>	73 (20,1)	10 (4,0)	83 (13,6)
<i>Soropositividade pós-vacinal</i>	325 (90,5)	198 (82,8)	523(87,5)
<i>Soropositividade nas mães</i>	336 (93,1)	193 (82,1)	529 (88,8)
<i>Duplicação do título de anticorpos</i>	311 (86,6)	213 (89,1)	524(87,6)
<i>Quadruplicação do título de anticorpos</i>	288 (80,2)	193 (80,8)	481(80,4)
	mUI/mL	mUI/mL	mUI/mL
<i>Título médio geométrico pré-vacinal*</i>	161,2	130,3	147,9
<i>Título médio geométrico pós-vacinal*</i>	3.049,5	2.022,5	2.587,9
<i>Título médio geométrico nas mães*</i>	2.165,4	1.839,9	2.030,7
Sorologia Dengue **	n (%)	n (%)	N (%)
Recíproca da Diluição			
< 40	53 (14,6)	72 (29,1)	125 (20,5)
40	181 (49,7)	117 (47,4)	298 (48,8)
160-640	115 (31,6)	51 (20,6)	166 (27,2)
>640	15 (4,1)	7 (2,8)	22 (3,6)
<i>Não testado</i>	10 (2,7)	5 (2,0)	15 (2,4)

* mUI/mL; ** recíproca da diluição

Figura 1: Histogramas de distribuição de nível de anticorpos neutralizantes (PRNT) específicos antes (a) e após (b) a vacinação contra febre amarela e da diferença do logaritmo (c) do nível de anticorpos neutralizantes (PRNT) antes e após a vacinação contra febre amarela.





A razão pós/pré-vacinal dos títulos de anticorpos contra febre amarela não mostrou correlação com os títulos de anticorpos contra dengue (Figura 1-c). A Tabela 3 mostra que há redução pequena e sem significância estatística na proporção de lactentes com duplicação ou quadruplicação (diferença de 0,3 ou de 0,6 log₁₀, respectivamente) do título de anticorpos após a vacinação (soroconversão) nas categorias de nível de anticorpos contra dengue. A

proporção de eventos adversos foi inversamente proporcional ao nível de anticorpos pré-vacinais contra dengue totalizando 19,8% no total de crianças.

Ajustando o efeito recíproco de múltiplas covariáveis nos modelos de regressão linear observamos que os níveis de anticorpos para dengue e de anticorpos maternos para febre amarela representam contribuições independentes na variação dos níveis de anticorpos pré-vacinais nas crianças (Tabela 4).

Na tabela 5, observa-se que no modelo multivariado a intensidade da resposta imune à vacinação contra febre amarela foi diretamente correlacionada ao peso do lactente e inversamente relacionada ao nível de anticorpos contra febre amarela nas mães. O nível de anticorpos contra dengue não se mostrou uma variável explanatória significativa neste modelo (Tabela 5). A análise gráfica de resíduos do modelo linear multivariado não demonstrou nenhum padrão de distribuição relevante.

Tabela 3: Frequência de duplicação e quadruplicação de anticorpos contra febre amarela (PRNT) segundo título de anticorpos contra dengue

<i>ELISA Dengue*</i>	<i>Duplicação PRNT febre amarela**</i>		<i>Quadruplicação PRNT febre amarela***</i>	
	N	(%)	n	(%)
< 40	109	(90,1)	98	(81,0)
40	258	(87,8)	237	(80,6)
160-640	140	(86,8)	130	(80,2)
>640	17	(81,0)	16	(76,2)
Total	524	(87,6)	481	(80,4)

* recíproca da diluição; ** p-valor 0,624; *** p-valor 0,965; † tendência linear, p-valor)

Tabela 4: Modelos de regressão linear multivariada para variável dependente sorologia pré-vacinal contra febre amarela (logPRNT)

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Bruto</i>			<i>Ajustado</i>		
	<i>Beta</i>	<i>P valor</i>	<i>IC 95%</i>	<i>Beta</i>	<i>P valor</i>	<i>IC 95%</i>
<i>Idade</i>	-0,015	0,27	-0,042 – 0,012	-	-	-
<i>Peso</i>	-0,037	0,017	- 0,068 – -0,007	-0,035	0,022	-0,066 – -0,005
<i>Anticorpos contra Dengue</i>	0,107	0,004	0,034 – 0,181	0,119	0,004	0,039 – 0,199
<i>Anticorpos contra febre amarela nas mães</i>	0,141	0,000	0,075 – 0,207	0,145	0,000	0,075 – 0,215
<i>Centro colaborador**</i>	-0,092	0,015	-0,167 – -0,018	-0,042	0,301	-0,123 – 0,038

*WHO-17D-213/77 e 17DD; **Campo Grande/Ribeirão Preto

Tabela 5: Modelo de regressão linear para variável dependente sorologia pós-vacinal contra febre amarela (logPRNT)

Variável independente	Bruto			Ajustado		
	Beta	P valor	IC 95%	Beta	P valor	IC 95%
<i>Idade</i>	0,006	0,745	-0,03 – 0,041	-	-	-
<i>Peso</i>	0,058	0,007	0,016 – 0,10	0,044	0,044	0,001 – 0,086
<i>Anticorpos contra Dengue</i>	0,076	0,128	-0,022 – 0,175	-	-	-
<i>Anticorpos contra febre amarela nas mães</i>	-0,111	0,013	-0,20 – -0,023	-0,102	0,043	-0,200 – -0,003
<i>Anticorpos pré-vacinais contra febre amarela</i>	-0,120	0,027	-0,226 – -0,014	-0,108	0,087	-0,232 – 0,016
<i>Tipo de vacina*</i>	0,032	0,525	-0,066 – 0,129	-	-	-
<i>Centro colaborador**</i>	-0,178	0,000	-0,277 – -0,080	-0,171	0,002	-0,282 – -0,061

*WHO-17D-213/77 e 17DD; **Campo Grande/Ribeirão Preto

Discussão

A distinção entre uma interferência genuína dos antecedentes de infecção por dengue e a resposta à vacinação contra febre amarela é dificultada pela possibilidade de reações sorológicas cruzadas. O PRNT para febre amarela tem sido considerado o teste sorológico mais específico. O ELISA usado na dosagem do IgG contra dengue tem melhor sensibilidade do que especificidade. A coincidência de um surto de dengue com o trabalho de campo da pesquisa com a vacina contra febre amarela criou uma oportunidade para analisar a questão. De fato, uma proporção substancial de lactentes apresentava níveis de anticorpos contra dengue compatíveis com infecção (títulos iguais ou superiores a 160), mas quase a metade tinha títulos de 40, que podem indicar infecções naturais, presença de anticorpos maternos contra dengue ou reações cruzadas a anticorpos maternos contra febre amarela. A associação da soropositividade para febre amarela e para dengue poderia resultar de reações cruzadas de ambos os testes, ou seja, infecções por dengue afetando os resultados do PRNT para febre amarela e anticorpos maternos contra febre amarela produzindo resultados falso-positivos nos testes IgG ELISA para dengue.

A prevalência de anticorpos contra dengue detectada nas crianças foi maior do que a encontrada em outros estudos (Pengsaa *et al.*, 2003, 2006) que evidenciaram a presença de anticorpos maternos contra dengue em 13% a 20% das crianças aos 9 meses de vida. Porém esteve de acordo com outros dados (Simmons *et al.*, 2007) que sugerem a presença de anticorpos em 84% das crianças aos 9 meses de vida. A presença de anticorpos contra dengue nas amostras pré-vacinais das crianças do estudo pode ter sido tanto devido (*i*) à transferência

de anticorpos maternos contra dengue; (ii) à infecção natural nos primeiros meses de vida; (iii) a resultados falso positivos por reação sorológica cruzada com anticorpos maternos contra febre amarela. Os níveis baixos de anticorpos contra dengue identificados por ELISA (40) têm maior chance de representarem resultados falso-positivos e podem ser decorrentes de reação cruzada a anticorpos maternos contra febre amarela. Dados como os encontrados por Schwartz *et al.*, que observou que a especificidade do teste IgG ELISA para dengue era menor em indivíduos vacinados e que resultados falso positivos com títulos baixos podem estar presentes em até 44% dos indivíduos previamente vacinados contra febre amarela, sustentam essa hipótese. Do ponto de vista de programa de saúde pública e da avaliação de efetividade vacinal em áreas endêmicas para dengue, a variável de interesse considerada foi a presença de anticorpos contra dengue nos diferentes estratos de titulação sorológica, entendendo no processo de categorização da variável que títulos sorológicos mais elevados (≥ 160) teriam menor probabilidade de serem resultados falso-positivos. Portanto, para fins de análise, considerou-se presença de anticorpos independentemente da sua origem (transplacentária ou infecção natural), mas nos diferentes níveis de titulação, dado que elevada soroprevalência contra dengue com diferentes níveis de anticorpos detectáveis é um cenário esperado nas crianças residentes em áreas endêmicas de dengue onde a vacinação contra febre amarela é recomendada.

A soropositividade para febre amarela anterior à vacinação pode ser explicada por anticorpos maternos, por reações cruzadas ao vírus da dengue ou por infecções naturais. Esta última é altamente improvável nas duas regiões urbanas onde residiam os lactentes analisados. Foi observada nesse estudo elevada soroprevalência pré-vacinal contra febre amarela. É possível que a meia-vida dos anticorpos maternos contra febre amarela seja mais longa do que observada previamente em um estudo (Suzano *et al.*, 2006) que evidenciou 7% de soropositividade contra febre amarela por PRNT em crianças aos 12 meses de idade e semelhante à observada por Simmons *et al.*, 2007 para anticorpos maternos contra dengue. Além disso, deve-se considerar a diferença de definições do limiar de positividade do teste. Houve uma tendência do título médio de anticorpos pré-vacinais contra febre amarela aumentar diretamente com o nível de anticorpos contra dengue ($p < 0,005$). Possíveis determinantes para a elevada soroprevalência contra febre amarela em crianças não vacinadas são: (i) transmissão de anticorpos maternos contra febre amarela; (ii) resultados falsos positivos para febre amarela devido a reação cruzada com anticorpos contra dengue, (iii) variabilidade intrínseca do teste PRNT. A análise multivariada indicou que parte da variação no título de anticorpos pré-vacinais contra febre amarela observada no estudo foi explicada pela presença de anticorpos contra dengue e pela presença de anticorpos contra febre amarela

nas mães. Nos lactentes soronegativos para dengue (títulos de anticorpos <40) os títulos de anticorpos contra febre amarela pré-vacinais provavelmente representam anticorpos específicos contra febre amarela de origem materna ou mesmo a resultados falsos positivos decorrente da variabilidade esperada pelo método PRNT. Por outro lado, as reações duvidosas para dengue (títulos de anticorpos = 40) poderiam resultar tanto de reação cruzada a anticorpos maternos contra febre amarela como pela detecção de títulos residuais de anticorpos maternos contra dengue. Nas crianças com títulos de anticorpos contra dengue em níveis iguais ou superiores a 40, o nível de anticorpos contra dengue contribuiu diretamente para a variação no título médio geométrico de anticorpos neutralizantes contra febre amarela, independentemente da presença de anticorpos específicos contra febre amarela nas mães. Estudos futuros são necessários para avaliar e quantificar a possibilidade de resposta cruzada entre testes sorológicos para os diferentes sorotipos de dengue e febre amarela, respondendo especificamente essa questão. Da mesma forma, são necessários estudos objetivando melhor definição da meia vida dos anticorpos contra febre amarela e dengue transferidos por via placentária.

A resposta imunológica à vacina contra febre amarela é melhor estimada pela soroconversão dada a variabilidade dos títulos pós-vacinais pelo método PRNT realizado nos diferentes estudos clínicos. A presença de anticorpos pré-vacinais contra dengue não influenciou a proporção de soroconversão (duplicação e quadruplicação no título de anticorpos) ou soropositividade pós-vacinal (título >500 mUI/ml) contra febre amarela. Não houve variação estatisticamente significativa no título médio de anticorpos neutralizantes após vacinação contra febre amarela nas diferentes categorias de título sorológico contra dengue, apesar de ter sido observada uma tendência de maior nível médio de anticorpos contra febre amarela nos grupos de indivíduos com título mais elevado de anticorpos contra dengue. Apesar da ausência de significância estatística, esse dado, associado ao fato de a razão pós/pré-vacinal não ter sofrido alteração nas diferentes categorias de anticorpos contra dengue, pode reforçar a hipótese de reação cruzada do teste PRNT à presença de anticorpos circulantes contra dengue nos dados observados nas sorologias pré-vacinais contra febre amarela. Estas reações podem constituir parte da moda em torno de $2 \log_{10}$ da distribuição com títulos de anticorpos neutralizantes (Figura 3). Esse padrão não foi observado nos histogramas de razão de títulos pós-vacinais. O modelo de regressão identificou que a presença de anticorpos específicos contra febre amarela nas mães explica parte da variação de título de anticorpos pós-vacinais contra febre amarela, anticorpos contra dengue não entraram no modelo como variável explanatória. Aparentemente a detecção de anticorpos pós-vacinais contra febre amarela em níveis baixos pode ser devida a (*i*) presença de anticorpos maternos

mesmo em níveis não detectáveis na sorologia pré-vacinal; (ii) presença de anticorpos contra dengue, apesar dessa variável não ter sido responsável pela soropositividade pós-vacinal observada no estudo pois o padrão é mais evidente nos indivíduos com título de anticorpos contra dengue igual ou superior a 40; (iii) variabilidade nos níveis de anticorpos neutralizantes detectados por PRNT, haja visto que o padrão bimodal não foi observado nos histogramas de soroconversão.

Apesar de a proporção de soroconversão após vacinação contra febre amarela ter ocorrido semelhantemente nos dois centros colaboradores, os títulos médios geométricos de anticorpos contra febre amarela dosados antes e após a vacinação contra febre amarela e também nas mães foram maiores em Campo Grande-MS do que em Ribeirão Preto-SP. Da mesma forma, os percentuais de crianças soropositivas para dengue e para febre amarela nas amostras pré-vacinais e pós-vacinais e de mães soropositivas para febre amarela foram maiores em Campo Grande-MS. Na análise univariada de regressão para as variáveis dependentes soropositividade pré-vacinal e soropositividade pós-vacinal, a variável centro colaborador explica parte das soropositividade pré-vacinal. Porém, quando são incluídas no modelo multivariado a presença de anticorpos contra dengue nas crianças e contra febre amarela nas mães como variáveis explanatórias, a variável centro colaborador deixa de ter significância estatística como variável explanatória para soropositividade pré-vacinal. Já nos modelos de regressão multivariada para soropositividade pós-vacinal, a variável centro colaborador permanece como uma variável explanatória para parte da variação de títulos de anticorpos neutralizantes alcançados após vacinação contra febre amarela. A variável centro colaborador mantém elevada significância estatística mesmo com a inclusão no modelo das variáveis presença de anticorpos contra dengue e de anticorpos neutralizantes contra febre amarela nas amostras pré-vacinais e nas amostras das mães. O fato do centro colaborador permanecer uma variável explanatória no modelo multivariado para soropositividade pós-vacinal traz a possibilidade da variabilidade do teste PRNT, que apesar de ter sido realizado no mesmo laboratório, foi realizado em diferentes momentos, ser o responsável em parte pela permanência do centro colaborador no modelo multivariado, haja visto que o estudo foi conduzido em períodos diferentes nos dois centros colaboradores.

A frequência de eventos adversos observada neste estudo não diferiu do padrão observado na análise conjunta dos dados do ensaio clínico dos demais centros colaboradores. Não houve associação entre a presença de anticorpos contra dengue, em seus diferentes níveis de titulação e a ocorrência de eventos adversos após vacinação contra febre amarela.

A população estudada foi constituída por crianças sadias que se apresentaram espontaneamente e preencheram os critérios para vacinação de rotina em unidades básicas de

saúde. Não há razões para supor que tivessem características que as diferenciavam em relação à exposição à infecção pelo dengue ou à capacidade de responder à vacina e afetar a validade externa dos resultados encontrados.

Conclusão

A presença de anticorpos contra dengue, independentemente de seu título, não interfere na imunogenicidade ou no padrão de reatogenicidade das vacinas contra febre amarela (17D e 17DD) aplicadas em crianças residentes em áreas endêmicas.

Referências

Bancroft WH, Scott RM, Eckels KH *et al.* Dengue Virus Type 2 Vaccine: Reactogenicity and Immunogenicity in Soldiers. *The Journal of Infectious Diseases* 1984; 149(6)

Belmusto-Worn VE, Sanchez JL, McCarthy K, Nichols R, Bautista CT, Magill AJ *et al.* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 72(2):189-197.

Camacho LA, Freire M da S, Leal Mda L, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana J de A, Farias RH; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Revista de Saúde Pública* 2004; 38 (5):671-8.

Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program. *Vaccine* 2007; 25: 3118–3123

Eckels KH, Kliks SC, Dubois DT *et al.* The association of enhancing antibodies with seroconversion in humans receiving a dengue-2 live-virus vaccine. *Journal of Immunology* 1985; 135(6):4201-3.

Fabiyi A & MacNamara FN. The effect of heterologous antibodies on the serological conversion rate after 17D yellow fever vaccination. *American Journal of Tropical Medicine* 1962; 11:817-21.

Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina contra Febre Amarela. Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina contra febre amarela. *Ciência & Saúde Coletiva* 2003; 8(Supl. 2):511 (Livro de Resumos II do VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Brasília-DF, agosto de 2003).

Henderson BE, Cheshire PP, Kirya GB & Lule M. Immunologic Studies with Yellow Fever and Selected African Group B Arboviruses in Rhesus and Vervet Monkeys. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1970;19(1):110-118.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Manual de Procedimentos para Vacinação. 4ª Edição. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/MPV/mpv00.htm>.

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia. Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle da Febre Amarela. 2000. <http://www.funasa.gov.br/epi/fa/fa0.htm>

Monath TP: Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. *American Journal of Epidemiology* 1971; 93(2):122-129.

Monath TP, Craven RB, Muth DJ, *et al.*: Limitations of the complement-fixation test for distinguishing naturally acquired from vaccine-induced yellow fever infection in flavivirus-hyperendemic areas. *American Journal of Tropical Medical and Hygiene* 1980; 29(4):624-634.

- Monath TP. Yellow Fever Vaccine Expert Review of Vaccines 2005; 4(4)
- Monath, TP, Cetron MS, Teuwen DE. Yellow Fever Vaccine. Chapter 36. In Plotkin, SA. & Orenstein WA organizadores. Vaccine. Philadelphia. Editora W.B. Saunders 2008
- Nogueira, RMR, Schatzmayr, HG, Miagostovich, MP *et al.* Use of MAC-ELISA for evaluation of yellow fever vaccination. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 1992; 34 (5): 447-450
- Pengsaa K, Luxemburger C, Sabchareon A *et al.* Dengue Virus Infections in the First 2 years of Life and kinetics of transplacentally transferred dengue neutralizing antibodies in Thai children. The Journal of Infectious Diseases 2006; 194: 1570-1576
- Pengsaa K, Yoksan S, Limkittikul K, *et al.* Maternally transferred neutralizing dengue antibodies in Thai infants: a pilot study. Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health 2003; 23 (3): 159-165
- Poo J, Galan F, Qiao M *et al.* Tetravalent dengue vaccine humoral immune response: boosting effect of previous administration of yellow fever vaccine. (Abstract, poster presentation) 47th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, 2009
- Schwartz E, Mileguir F, Grossman Z, Mendelson E. Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. Journal of Clinical Virology 2000; (19): 169–173
- Shope RE & Meegan JM. Arboviruses. In Viral infections of Humans. Epidemiology and Control. Alfred Evans & Richard A. Kaslow (eds.). 4th Edition, 1997. New York and London: Plenum Medical Book Company.
- Simmons CP, Chau TNB, Thuy TT *et al.* Maternal Antibody and Viral Factors in the Pathogenesis of dengue virus in infants. The Journal of Infectious Diseases 2007; 196: 416-424
- Smith CEG, Turner LH & Armitage P. Yellow Fever Vaccination in Malaya by Subcutaneous Injection and Multiple Puncture. Bulletin of the World Health Organization 1962; 27:717-727.
- Spector S, Tauraso NM: Yellow fever virus. I. Development and evaluation of a plaque neutralization test. Applied Microbiology 1968; 16(11):1770-1775.
- Spector SL, Tauraso NM: Yellow fever virus. II. Factors affecting the plaque neutralization test. Applied Microbiology 1969; 18(5):736-743.
- Theiler M & Anderson CR. The Relative Resistance of Dengue-Immune Monkeys to Yellow Fever Virus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1975; 24(1):115-117.
- Vasconcelos PFC. Febre amarela. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2003; 36(2):275-293.
- Vazquez S, Valdes O, Pupo M, *et al.* MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. Journal of Virological Methods 2003; 110(2):179-184.

Wisseman CL, Jr Sweet B, Kitaoka M *et al.* Immunological studies with group B arthropod-borne viruses. I. Broadened neutralizing antibody spectrum induced by strain 17D yellow fever vaccine in human subjects previously infected with Japanese encephalitis virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1962; 11:550-.

Artigo 3

Resposta humoral a revacinação com a vacina contra febre amarela 17DD em crianças menores de 2 anos de idade.

Resposta humoral a revacinação com a vacina contra febre amarela 17DD em crianças menores de 2 anos de idade

Guilherme Côrtes Fernandes^{1,3}, Rita Maria Ribeiro Nogueira², Luiz Antonio Bastos Camacho¹ e Grupo Colaborativo de estudos com vacinas contra febre amarela

¹ *Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz – ENSP/FIOCRUZ*

² *Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ*

³ *Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora*

Resumo: A investigação dos fatores associados à ausência de resposta humoral a primeira dose da vacina contra febre amarela assim com a investigação do tipo de resposta imunológica humoral após a segunda dose da vacina contra febre amarela em crianças é da maior importância no momento em que se intensificam esforços para ampliar a cobertura vacinal anti-amarela. Foram analisados dados das crianças soronegativas que participaram do ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego realizado para investigar a imunogenicidade e reatogenicidade de duas vacinas contra febre amarela (subcepas WHO-17D-213/77 e 17DD) (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007). 85,3% das 3.764 crianças vacinadas apresentaram níveis de anticorpos neutralizantes protetores após a vacinação contra febre amarela (superiores a 500 mUI/ml). 46,83% (n=237) das 553 crianças soronegativas que foram revacinadas com a vacina 17DD tiveram nova coleta de sangue 15 dias ou mais após a revacinação para avaliação do tipo de resposta imunológica humoral obtida (produção de anticorpos tipo IgM ou IgG) após a segunda dose vacinal. Das 259 crianças revacinadas, 237 (91,5%) apresentaram produção de anticorpos específicos contra febre amarela (detecção de anticorpos tipo IgM ou IgG) após a segunda dose da vacina. 62,9% (163/259) das crianças revacinadas apresentaram resposta humoral tipo anamnésica, com detecção exclusiva de anticorpos tipo IgG após a segunda dose da vacina. 28,6% (74/259) das crianças revacinadas apresentaram resposta humoral primária, com produção de anticorpos tipo IgM após a segunda dose da vacina. 8,5% das crianças revacinadas (22/259) não apresentaram níveis de IgM ou IgG detectáveis por ELISA após a segunda dose da vacina contra febre amarela. O título médio geométrico após a primeira dose da vacina contra febre amarela foi maior entre as crianças que apresentaram resposta tipo anamnésica do que entre as crianças que apresentaram resposta primária na revacinação (p=0,01). 52,6% das crianças com 9 meses apresentaram falha vacinal a primo-vacinação, apresentando resposta primária com detecção de IgM após a revacinação. A maioria das crianças com 12 meses de idade (82,2%) apresentou resposta anamnésica após a revacinação. 83,3% das crianças soronegativas após receberem simultaneamente a vacina contra febre amarela e triviral apresentaram resposta tipo anamnésica após revacinação. Considerando os resultados observados, a proporção estimada de soropositividade após uma única dose da vacina contra febre amarela em crianças menores de 2 anos seria de 90,76% e a proporção estimada de soronegatividade após duas doses de vacina contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade seria de 1,25%.

Introdução

O Programa Nacional de Imunizações tem como objetivo o controle de doenças imunopreveníveis, pela proteção conferida por amplas coberturas por vacinas contra as doenças abrangidas pelo programa, em subgrupos da população suscetíveis às doenças alvo do programa (Ministério da Saúde, 2001). As recomendações relativas à idade e ao cronograma de vacinação fundamentam-se em fatores que incluem o risco de adquirir a doença, o risco de desfechos desfavoráveis, a imunogenicidade das vacinas disponíveis e duração dessa imunidade e o cronograma de visitas ao serviço de saúde para outras ações. Em termos ideais, uma vacina é recomendada para a menor faixa etária em risco, que seja capaz de apresentar resposta imunológica à vacina e para quem a eficácia e segurança da intervenção tenha sido comprovada (Centers of Diseases Control, 2006; Watson & Peter, 1999; Plotkin, 2008). Trata-se, porém, de um processo dinâmico que impõe reavaliações frequentes nas estratégias do programa de imunização.

Uma característica importante das vacinas é a capacidade de indução de resposta imunológica que confere proteção duradoura (Ada, 1999), porém a ativação do sistema imunológico envolve complexos mecanismos e pode sofrer influência de diferentes fatores. Após o primeiro contato com o antígeno vacinal há indução de resposta imunológica primária pela ativação das respostas humoral e celular. Após a resposta primária, as células B e T de memória podem ser agilmente ativadas quando o indivíduo é novamente exposto ao antígeno. Após a inoculação de vacinas com vírus vivo atenuado, há replicação e apresentação de partículas virais seguida de ativação do sistema imunológico, semelhantemente ao que ocorre na infecção natural. Células dendríticas são ativadas, resultando na ativação de células B e T. Com a ativação das células T, segue a proliferação de células B antígeno-específicas que se diferenciam em células secretoras de anticorpos. A proteção duradoura depende da persistência de anticorpos induzidos pela vacina ou a possibilidade de gerar células de memória capazes de induzir reativação rápida de anticorpos após exposição ao agente infeccioso (Siegrist, 2008). Uma característica da reativação de células B de memória é a indução de rápida resposta, com elevação rápida no nível de anticorpos específicos. A resposta decorrente da ativação de células B e T de memória tende a ser mais rápida e potente do que a resposta imunológica primária (Ada, 1999). Os principais determinantes da resposta primária a vacinação são relativos à natureza do antígeno vacinal e sua imunogenicidade, que depende da dose vacinal e de características inatas do antígeno e do indivíduo. Vacinas com vírus vivos habitualmente apresentam melhores respostas primárias. Apesar de ser esperada a elevação de anticorpos a níveis considerados protetores, pode haver proteção parcial mesmo sem uma resposta vacinal ideal (Siegrist, 2008).

A recomendação atual é de que a vacinação contra febre amarela seja feita em dose única, com reforço a cada 10 anos, apesar da persistência de anticorpos neutralizantes após 10 anos de vacinação (Monath, 2005; Poland *et al.*, 1981). A Organização Mundial da Saúde recomenda a vacinação contra febre amarela para crianças aos nove meses de idade, concomitantemente à vacinação anti-sarampo, por ser estratégia de custo-efetividade maior do que a vacinação por campanhas para controle de surtos (WHO, 1998; Monath *et al.*, 2008).

Testes para detecção de anticorpos neutralizantes têm sido utilizados em estudos clínicos desde a década de 1930 (Monath *et al.*, 2008). O teste de neutralização com redução em placa de lise (*Plaque Reduction Neutralization Test*, PRNT), considerado o melhor atualmente disponível, tem sensibilidade que varia de 50% a 90% (Spector e Tauraso, 1968, 1969).

A variação no desempenho do PRNT (Monath *et al.*, 2008) e a falta de padronização e definição de um limiar de positividade nos resultados dos testes correlacionado à proteção explicam parte das diferenças de título médio geométrico de anticorpos observados em diferentes estudos, apesar de não ter sido observada a mesma tendência de diferenças nas proporções de soroconversão (superior a 90%) encontradas nos estudos. A sensibilidade do ELISA para detecção de IgM é semelhante ao PRNT (Vazquez *et al.*, 2003 e Monath *et al.*, 2008). A especificidade do ELISA para detecção de IgM é considerada alta para infecções primárias (Lhuillier e Sarthou, 1983), porém houve reação cruzada em 10,7% dos testes com soro com anticorpos contra dengue testados com IgM ELISA utilizando antígeno de febre amarela (Monath *et al.*, 2008). Em outro estudo com IgM ELISA foi observada concordância com os resultados obtidos por PRNT em 97% dos casos, além da capacidade de detectar anticorpos em níveis baixos e que não haviam sido detectados por PRNT (Nogueira *et al.*, 1992). O IgG ELISA tem menor sensibilidade para detecção de soroconversão pela vacina 17D do que o teste de neutralização (Niedrig *et al.*, 1999).

A resposta primária à vacinação contra febre amarela é caracterizada pela detecção de anticorpos IgM entre o 4^o e 7^o dias após a vacinação (Monath, 1971). Anticorpos IgM foram detectados 2 semanas após a primeira dose vacinal em 83% dos vacinados em um estudo (Reinhardt *et al.*, 1998) e em 94% de outro estudo (Monath *et al.*, 2008). A revacinação não está associada com incremento de IgM quando o intervalo entre vacinação e revacinação for curto (até 2 anos) devido à presença de células B de memória (Monath, 2005), porém a revacinação após 10 anos pode acarretar no reaparecimento de anticorpos tipo IgM, o que sugere que parte das células B de memória podem envelhecer (Monath, 2005). Como a maioria dos indivíduos revacinados tem anticorpos neutralizantes, mesmo com títulos prévios baixos de anticorpos, uma resposta tipo *booster* é a mais esperada. Na presença de anticorpos

neutralizantes em níveis elevados é esperada menor resposta ao vírus vacinal (Monath, 2005; Monath *et al.*, 2008).

Em um estudo observacional com a vacina 17DD, foi demonstrada soroconversão de 97% em indivíduos com idades de 10 anos ou mais, 94% nas crianças de 2 a 9 anos, 88% nas crianças de 12 a 23 meses, 72% nas de 9-11 meses e 82% nas de 6-8 meses. Nos lactentes de 9 a 11 meses, em São Paulo, a soroconversão foi de 67% (Grupo Colaborativo, 2003). Um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, foi realizado para investigar a imunogenicidade e reatogenicidade de duas vacinas contra febre amarela (subcepas WHO-17D-213/77 e 17DD) em crianças e identificar seus determinantes (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007), sendo que 85,3% das crianças vacinadas apresentaram níveis de anticorpos contra febre amarela superiores a 500 mUI/ml e 88,3% apresentaram duplicação de nível de anticorpos neutralizantes após a primeira dose da vacina contra febre amarela. A ausência de obtenção de anticorpos pós-vacinais em níveis considerados protetores após a primeira dose da vacina contra febre amarela preconizada no calendário básico de vacinação trás questões a serem investigadas sobre a efetividade da estratégia atual para controle da doença. A soronegatividade pós-vacinal observada pode ter ocorrido devido à: (i) resposta primária com indução de células de memória e produção de anticorpos específicos em níveis inferiores ao limiar de positividade do teste sorológico; (ii) ausência de resposta primária à exposição antigênica. A determinação do tipo de resposta imunológica humoral (primária ou anamnésica) após uma segunda exposição antigênica nas crianças classificadas como não respondedoras à primeira dose da vacina contra febre amarela permite avaliar o nível de proteção alcançada e possivelmente, contribuir na definição da necessidade de doses adicionais antes do intervalo de 10 anos preconizado.

O objetivo deste estudo é determinar o tipo de resposta imunológica humoral (primária ou anamnésica) induzida pela segunda dose de vacina contra febre amarela aplicada nas crianças classificadas como não respondedoras à primeira dose vacinal. Serão analisadas as proporções de (i) imunidade de memória induzida pela primeira dose da vacina contra febre amarela em crianças que não alcançaram altos níveis de anticorpos; (ii) de crianças que permaneceram soronegativas após duas doses da vacina contra febre amarela. Ao possibilitar uma avaliação mais precisa da imunogenicidade da vacina, esta análise poderá ter implicações nas estratégias de vacinação contra febre amarela, definindo a necessidade de doses de reforço.

Método

Um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, foi realizado para investigar a imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela (subcepas 17D213/77 e 17DD produzidas por Bio-Manguinhos, FIOCRUZ) em crianças e identificar seus determinantes (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007). As crianças classificadas como não-respondedoras à vacinação contra febre amarela foram convidadas a receber uma segunda dose da vacina 17DD, disponibilizada pelo Programa Nacional de Imunizações para administração de rotina nas unidades de vacinação. Foi realizada nova coleta de sangue 15 dias ou mais após a revacinação e avaliado o tipo de resposta imunológica humoral conferida (produção de anticorpos tipo IgM ou IgG). Em uma subamostra dessas crianças foi feita a retestagem do nível de anticorpos neutralizantes nos soros coletados após a primeira dose da vacina, revelando 29 crianças com nível de anticorpos neutralizantes igual ou superior a 500 mUI/mL, ou seja, que haviam respondido à primovacinação, mas cujos dados foram considerados para fins da análise proposta.

O ensaio clínico que originou o estudo que é objeto deste artigo teve caráter multicêntrico e envolveu regiões onde a vacinação contra febre amarela está prevista no calendário básico de imunizações do Ministério da Saúde, sendo parte das atividades da rotina das unidades básicas de saúde. O Centro Coordenador do Estudo foi sediado na Assessoria Clínica do Instituto de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da FIOCRUZ. O ensaio clínico consistiu em administrar, após randomização, uma das vacinas do estudo e submeter-se a exames de sangue e a entrevistas antes e 30 dias depois da vacinação. As vacinas utilizadas foram (i) vacina da subcepa 17DD produzida em Bio-Manguinhos, FIOCRUZ e em uso pelo Programa Nacional de Imunizações para residentes e viajantes para áreas endêmicas; e (ii) uma vacina produzida em Bio-Manguinhos a partir do lote-semente WHO 17D-213/77, e utilizada previamente em estudo controlado e randomizado em adultos (Camacho *et al.*, 2004, 2005). A distribuição, manuseio e aplicação das vacinas seguiram as recomendações do fabricante (Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ) e do Programa Nacional de Imunizações (Ministério da Saúde, 2000).

Foram convidados a participar do estudo crianças com menos de 2 anos de idade, sem história de vacinação contra febre amarela, que não apresentavam contraindicações à vacinação e que se apresentaram espontaneamente para vacinação em centros de saúde da rede pública. Os critérios de elegibilidade de voluntários para o estudo, assim como os procedimentos na sala de vacina seguiram as normas, rotinas e critérios do Programa Nacional de Imunizações. Os responsáveis legais pelos indivíduos elegíveis para vacinação foram informados dos objetivos e métodos do estudo e assinaram um Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo foi elaborado em conformidade com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Parecer CEP-FIOCRUZ: 236A/03), Brasília-DF (Parecer CEP-SES-DF 069/2005) e Campo Grande-MS (CEP-UFMS, Protocolo 738/2006). O projeto foi registrado no SISNEP (Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos) sob o registro CAAE - 0038.1.011.000-03. O ensaio clínico está registrado no International Standard Randomised Controlled Trial Number Register (<http://www.controlled-trials.com/isrctn>) sob o número ISRCTN 72367932.

Métodos laboratoriais

Foram dosados anticorpos contra febre amarela (método de neutralização por redução em placa de lise – PRNT) (Spector e Tauraso, 1968) em amostras coletadas antes e 30 dias ou mais após a administração da vacina antiamarílica. O soro das mães coletado no dia da vacinação da criança foi usado para dosagem de anticorpos contra febre amarela. A imunogenicidade das vacinas contra febre amarela foi estimada pela duplicação e quadruplicação de títulos de anticorpos contra febre amarela ou soropositividade, definida como elevação dos títulos de anticorpos neutralizantes igual ou maior a 500 miliUnidades Internacionais por mL ($2,7\log_{10}$ mUI/mL). Anticorpos da classe IgM e IgG contra febre amarela foram dosados pelo ELISA em amostras de soro coletadas 15 dias ou mais após a segunda dose da vacina contra febre amarela. A dosagem de anticorpos IgG foi quantitativa e de anticorpos IgM foi qualitativa. Soropositividade contra febre amarela pelo método de IgG-ELISA foi definida como título de anticorpos maior ou igual a 40.

Análise de dados

As análises são baseadas em comparações de grupos não randomizados. Para análise dos títulos de anticorpos contra febre amarela foi feita transformação logarítmica (base 10) e estimadas as médias geométricas. A análise estatística dos dados incluiu: (i) comparação das proporções de soropositividade segundo tipo de resposta humoral à revacinação contra febre amarela, com significância estatística das diferenças avaliada pelo teste *qui-quadrado*; (ii) comparação de médias de títulos de anticorpos contra febre amarela nos subgrupos definidos pela soropositividade para febre amarela e tipo de resposta humoral após a segunda dose vacinal (anamnética ou primária), usando o teste *t*; (iii) análise multivariada (regressão linear) da soropositividade para febre amarela como função do tipo de resposta humoral ou sua ausência ajustando para as covariáveis de interesse. Em todas as análises o nível de significância definido foi de 0,05 com construção de intervalos de confiança de 95% para as

estimativas. Para fins de análise, indivíduos que apresentaram anticorpos tipo IgM detectados nas amostras coletadas após a revacinação (tendo apresentado ou não anticorpos tipo IgG) foram classificados como tendo apresentado resposta humoral primária à revacinação, independentemente da detecção simultânea de anticorpos tipo IgG. Aqueles indivíduos que apresentaram detecção somente de anticorpos da classe IgG, sem detecção de anticorpos tipo IgM, foram classificados como tendo apresentado resposta tipo anamnésica, independentemente do título de anticorpos IgG obtidos. Os indivíduos que não apresentaram detecção de nenhum tipo de anticorpos (IgM ou IgG) após a segunda dose da vacina foram classificados como não tendo apresentado resposta imunológica humoral após duas doses da vacina contra febre amarela.

Resultados

Foram recrutadas durante o ensaio clínico 3.909 crianças em 5 centros colaboradores: Belo Horizonte (N=521) e Juiz de Fora (N=819) no estado de Minas Gerais; Campo Grande (N=374) no estado do Mato Grosso do Sul; Ribeirão Preto (N=252) no estado de São Paulo e Brasília (N=1.943) no Distrito Federal. Houve perda de seguimento em 3,71% das crianças randomizadas, totalizando 3.764 voluntários com dados sorológicos disponíveis para análise.

85,3% das 3.764 amostras disponíveis apresentavam níveis de anticorpos específicos contra febre amarela superiores a 500 mUI/mL após a aplicação da primeira dose da vacina. O título médio geométrico de anticorpos pós-vacinais foi de 3.411,7 mUI/mL entre as crianças que responderam a primeira dose da vacina e de 214,9 mUI/mL entre as 553 crianças classificadas como soronegativas. Todas as crianças soronegativas a primovacinação (n=553) foram revacinadas com a vacina 17DD contra febre amarela. Dessas crianças, 46,8% (259/553) foram submetidas a nova coleta de sangue 15 dias ou mais após receberem a segunda dose da vacina.

A idade média no dia da primeira dose da vacina contra febre amarela das crianças revacinadas e submetidas à dosagem de anticorpos tipo IgM e IgG foi de 10,3 meses (desvio padrão 1,8 meses) com mediana de 9 meses e das crianças soronegativas que não foram submetidas a dosagem de anticorpos IgM e IgG foi de 11,6 meses (desvio padrão 1,6 meses) com mediana de 12 meses ($p < 0,001$). A distribuição por peso ao nascer ($p = 0,47$), por peso no dia da primeira dose da vacina ($p = 0,029$), por sexo ($p = 0,11$) e segundo subcepa vacinal administrada ($p = 0,339$) foram semelhantes nos grupos de crianças soronegativas que realizaram dosagem de IgM e IgG e que não realizaram essa dosagem após a segunda dose da vacina. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o nível médio geométrico de anticorpos neutralizantes detectados antes ($p = 0,699$) ou após ($p = 0,431$) a primeira dose da

vacinação contra febre amarela entre as crianças soronegativas que tiveram anticorpos IgG e IgM dosados após revacinação ou não.

Das 259 crianças revacinadas, 237 (91,5%) apresentaram produção de anticorpos específicos contra febre amarela (detecção de anticorpos tipo IgM ou IgG) após a segunda dose da vacina. 62,9% (163/259) das crianças revacinadas apresentaram resposta humoral tipo anamnésica, com detecção exclusiva de anticorpos tipo IgG após a segunda dose da vacina. Das 29 crianças que haviam apresentado nível de anticorpos neutralizantes acima de 500 mUI/mL em retestagem de soro coletado após a primovacinação, 26 (90,0%) apresentaram resposta humoral tipo anamnésica. 28,6% (74/259) das crianças revacinadas apresentaram resposta humoral primária, com produção de anticorpos tipo IgM após a segunda dose da vacina. Duas dessas crianças que obtiveram resposta humoral tipo IgM, tiveram níveis de anticorpos neutralizantes superiores a 500 mUI/mL após a primovacinação. 8,5% das crianças revacinadas (22/259) não apresentaram níveis de IgM ou IgG detectáveis por ELISA após a segunda dose da vacina contra febre amarela. Uma dessas crianças soronegativas por ELISA após 2 doses vacinais, havia apresentado, no entanto, anticorpos neutralizantes em nível superior a 500 mUI/mL no soro coletado após a primovacinação.

Nas crianças com respostas anamnésica e primária à revacinação, a distribuição por peso ao nascer ($p=0,58$), por peso no dia da primeira dose da vacina ($p=0,282$), por sexo ($p=0,487$) e segundo subcepa vacinal administrada ($p=0,784$) foram semelhantes. Porém a idade média no dia da aplicação da primeira dose da vacina contra febre amarela foi menor nas crianças que apresentaram resposta primária após a segunda dose da vacina (média 9,4 meses, desvio padrão 1,2 e mediana de 9 meses) ou que não apresentaram nenhuma resposta humoral após a segunda dose (média 10,6 meses, desvio padrão 1,9 e mediana 9,5 meses) do que entre as crianças que apresentaram resposta tipo anamnésica à revacinação (média 10,8 meses, desvio padrão 1,9 e mediana de 11 meses,) ($p<0,001$). Imunidade contra dengue ($p=0,278$), nível de anticorpos neutralizantes contra febre amarela superior a 500 mUI/mL nas mães ($p=0,229$) e nas crianças em amostras coletadas antes da primeira vacinação ($p=0,085$) não apresentaram associação com o tipo de resposta humoral obtida após a segunda dose da vacina.

Não houve diferença no título médio geométrico de anticorpos neutralizantes nas amostras pré-vacinais entre as crianças soronegativas que apresentaram diferentes respostas humorais à segunda dose da vacina contra febre amarela (Figura 1). Porém o título médio geométrico de anticorpos neutralizantes (PRNT) após a primeira dose da vacina contra febre amarela foi maior entre as crianças que apresentaram resposta tipo anamnésica após a revacinação quando comparado às crianças que apresentaram resposta primária com detecção

de anticorpos específicos tipo IgM ou sem resposta humoral a revacinação ($p=0,01$) (Figura 1). O título de anticorpos neutralizantes tende a se aproximar do limiar de positividade do PRNT ($2,7\log_{10}$) após a primovacinação das crianças soronegativas que apresentaram resposta tipo anamnésica à revacinação, apresentando aumento no nível de anticorpos neutralizantes após a primovacinação porém em níveis considerados não protetores (Figura 1). Esse padrão de resposta à primovacinação não é observado entre as crianças que apresentaram resposta primária ou que não apresentaram resposta humoral após a segunda dose da vacina. O nível de anticorpos neutralizantes na amostra realizada após a primeira dose vacinal esteve associado ao tipo de resposta humoral obtida com a revacinação ($p=0,007$): 16,0% das crianças que apresentavam resposta tipo IgG após a segunda dose da vacina, apresentaram nível de anticorpos neutralizantes superior a 500 mUI/mL na retestagem da amostra sorológica coletada após a primeira dose da vacina antiamarílica contra 2,7% entre aquelas que obtiveram resposta tipo IgM.

A proporção de resposta primária (produção de anticorpos tipo IgM) na revacinação foi maior nas crianças menores (8 e 9 meses; respectivamente 46,2% e 44,1%) e diminuiu progressivamente em crianças maiores de 11 meses de idade ($p=0,002$), sendo respectivamente de 8,2% e 6,7% em crianças aos 12 meses e maiores de 1 ano de idade (Tabela 1). Crianças soronegativas após a primovacinação que foram vacinadas simultaneamente com as vacinas antiamarílica e triviral apresentaram predominantemente (83,3%) resposta humoral tipo anamnésica à revacinação (Tabela 2).

Tabela 1: Tipo de resposta humoral após a segunda dose da vacina contra febre amarela segundo faixa etária

	<i>Anamnésica</i>	<i>Primária</i>	<i>Ausência IgM e IgG</i>	<i>Total</i>
Idade (meses)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
8 meses	6 (46,2)	6 (46,2)	1 (7,7)	13 (100,0)
9 meses	56 (47,5)	52 (44,1)	10 (8,5)	118 (100,0)
10 meses	12 (63,2)	6 (31,6)	1 (5,3)	19 (100,0)
11 meses	17 (81,0)	3 (14,3)	1 (4,8)	21 (100,0)
12 meses	60 (82,2)	6 (8,2)	7 (9,6)	73 (100,0)
> 12 meses	12 (80,0)	1 (6,7)	2 (13,3)	15 (100,0)

tendência linear: $p=0,001$

Figura 1: Distribuição de nível de anticorpos neutralizantes (logPRNT) contra febre amarela antes e após a primovacinação segundo resposta humoral após a segunda dose da vacina antiamarílica

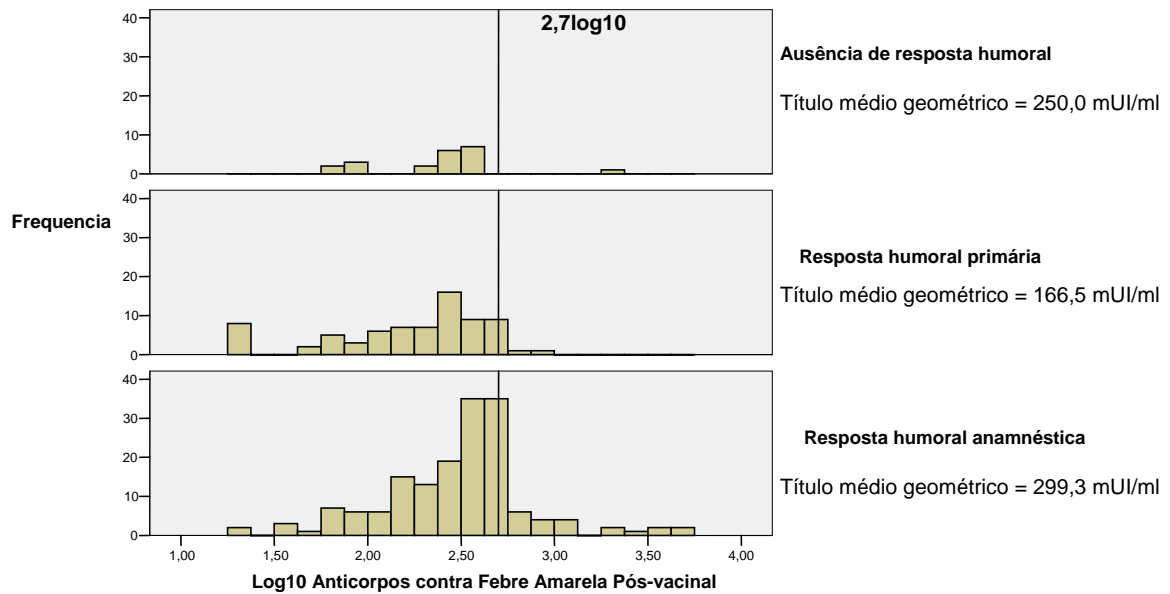
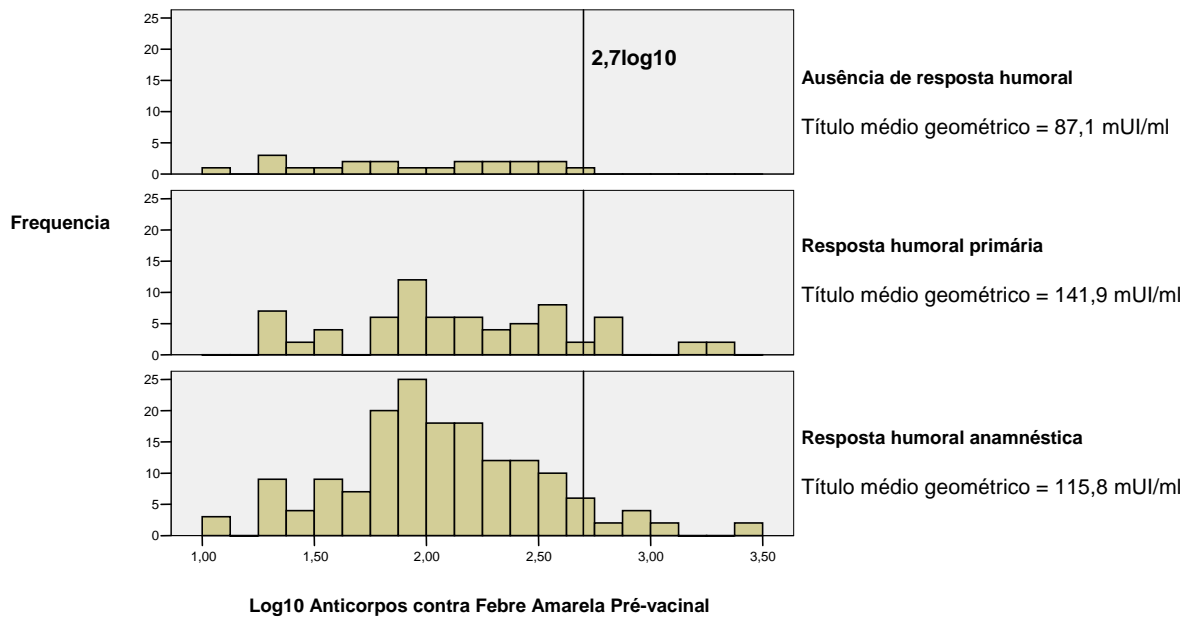


Tabela 2: Tipo de resposta humoral após a segunda dose da vacina contra febre amarela em crianças vacinadas simultaneamente com as vacinas contra febre amarela e triviral (sarampo, caxumba, rubéola).

	<i>Anamnésica</i>	<i>Primária</i>	<i>Ausência de IgM e IgG</i>	<i>Total</i>
<i>Vacinação simultânea triviral</i>	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Sim	40 (83,3)	4 (8,3)	4 (8,3)	48 (100,0)
Não	123 (58,3)	70 (33,2)	18 (8,5)	211 (100,0)

$X^2 = 0,002$

Discussão

A variabilidade esperada dos resultados do PRNT (Monath *et al.*, 2008), ou mesmo a pouca padronização do limiar de positividade do teste, provavelmente justifica parte dos achados de respostas tipo anamnésica na dosagem de IgG pelo método ELISA entre as crianças soronegativas revacinadas, assim como a reclassificação de algumas crianças que foram retestadas por PRNT, uma vez que foram classificadas como soronegativas tendo nível de anticorpos neutralizantes próximos do valor definido para soropositividade. O fato de um paciente que não apresentou resposta humoral (detecção de anticorpos IgG ou IgM por ELISA) após a segunda dose da vacina antiamarilica ter obtido nível de anticorpos neutralizantes (PRNT) superior a 500m UI/ml na retestagem por PRNT da amostra coletada após a primovacinação sugere a possibilidade de ser este um resultado IgG ELISA falso negativo em um indivíduo com resposta imune à primovacinação, o que é esperado já que se trata de um teste considerado de menor sensibilidade (Niedrig *et al.*, 1999). Já o fato de o título médio geométrico de anticorpos neutralizantes após a primeira dose da vacina contra febre amarela ter sido maior entre as crianças que apresentaram resposta humoral tipo anamnésica reforça a hipótese de variabilidade do teste, apesar de a produção de anticorpos em níveis não protetores em crianças poder ser uma característica real de uma resposta humoral menos intensa à primeira exposição vacinal. Essas crianças apresentavam título médio geométrico próximo ao limiar de positividade estabelecido de 2,7log, o que poderia representar resultados falso-negativos ou nível de anticorpos neutralizantes em níveis que não se sabe se conferiria proteção parcial ou total à infecção pelo vírus da febre amarela. Provavelmente a variabilidade do teste não explica a totalidade dos casos, há ainda a questão da falta de dados para estabelecer correlação entre nível de anticorpos neutralizantes e proteção contra infecção por febre amarela, isto é, a possibilidade de o nível de anticorpos neutralizantes um pouco abaixo do limiar de positividade estabelecido no estudo ser suficiente

para conferir proteção ou o limiar de positividade estabelecido no estudo ter sido elevado. Por outro lado, correlação de proteção contra febre amarela é definida pela presença de anticorpos neutralizantes e, apesar de não haver um limiar de positividade bem definido, níveis mais elevados de anticorpos estão mais fortemente associados com proteção duradoura (Hepburn *et al.*, 2006)._A principal limitação deste estudo foi a não realização de testes de ELISA após a primovacinação, nem testes PRNT depois da revacinação, que poderiam informar sobre a variação no estado imune sob as diferentes perspectivas que estes testes têm, além de poder fornecer mais dados sobre a intensidade de resposta tipo anamnésica obtida após a segunda dose vacinal. Além disso, algumas crianças tiveram a coleta de sangue após a segunda dose superior a 14 dias, não sendo possível precisar o número nem a duração do atraso, porém acreditamos que a classificação em resposta primária e anamnésica não tenha sido prejudicada. Um percentual das crianças que não respondeu a duas doses da vacina em testagem 15 dias após a segunda dose, poderia ainda não ter apresentado anticorpos IgG no período de seguimento, o que poderia ocorrer mais tardiamente em alguns casos. Considerando ainda a possibilidade de falso-negativo no ELISA IgG (Niedrig *et al.*, 1999), a realização de PRNT nesses casos poderia contribuir para maior sensibilidade de detecção de resposta humoral tipo anamnésica a revacinação. Por outro lado, dado que a sensibilidade do ELISA para detecção de IgM é semelhante ao PRNT (Vazquez *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 1992), talvez a realização de PRNT não aumentaria muito a sensibilidade de detecção de respostas tipo primárias a revacinação.

A proporção de soroconversão e soropositividade pós-vacinal contra febre amarela em crianças aos 9 e 12 meses de idade observada no ensaio clínico foi menor do que a observada previamente em ensaio clínico em adultos (Camacho *et al.*, 2004). Os dados do ensaio clínico evidenciam que a proporção de soroconversão e soropositividade após vacinação contra febre amarela é inferior à de adultos, assim como a intensidade de resposta humoral para as duas idades previstas no calendário vacinal da infância em áreas em que há vacinação de rotina contra febre amarela (9 e 12 meses de idade).

A falha primária da vacina (caracterizada pela resposta primária a revacinação, com detecção de anticorpos tipo IgM) se deu principalmente em crianças menores, o que pode ter sido tanto devido à presença de anticorpos maternos (90% das mães eram soropositivas para febre amarela) quanto à imaturidade do sistema imunológico das crianças menores de 12 meses. Nas crianças com 12 meses ou mais, a soronegatividade após a primovacinação com obtenção de títulos mais baixo de anticorpos neutralizantes (porém próximos ao limiar de positividade) pode estar associada a: vacinação simultânea, presença residual de anticorpos maternos ou questões de definições do limiar de positividade do teste e correlação entre nível

de anticorpos neutralizantes e proteção contra infecção. De qualquer forma, a maioria dessas crianças teve indução imunológica com uma única dose da vacina anti-amarela e apresentaram resposta anamnésica à revacinação. O grupo de crianças menores (mediana 9 meses) apresentou maior probabilidade de apresentar falha primária, com ausência de resposta à primeira dose da vacinação do que no grupo de crianças com mediana de 12 meses ($p < 0,001$). A maioria das crianças que não respondeu à primovacinação obteve resposta humoral após a segunda dose da vacina. Crianças menores (8 e 9 meses de idade) apresentaram predominantemente resposta humoral primária à revacinação, enquanto crianças maiores, com mediana de 11 meses que eram soronegativas após a primovacinação apresentaram resposta tipo anamnésica, sugerindo que já apresentavam resposta imunológica à primeira dose vacinal, apesar da produção de anticorpos em níveis considerados não protetores. A hipótese da influência de anticorpos maternos residuais ou de imaturidade imunológica é reforçada pela diminuição gradual de falha primária à revacinação com aumento da idade e de simultâneo aumento gradual da proporção de resposta anamnésica, com tendência de associação linear ($p = 0,001$). Estudo anterior evidenciou que 7% das crianças nascidas de mães vacinadas contra febre amarela apresentam anticorpos neutralizantes no PRNT aos 12 meses de idade (Suzano *et al.*, 2006). Crianças vacinadas simultaneamente aos 12 meses contra febre amarela e triviral que não responderam à primovacinação apresentaram resposta humoral tipo anamnésica à revacinação. Esse fato sugere que a vacinação simultânea foi capaz de induzir resposta imunológica em um percentual maior de indivíduos do que observado inicialmente, porém com produção de anticorpos neutralizantes em níveis inferiores ao considerado protetor. Aparentemente a idade é um fator mais determinante de ausência de resposta imunológica a primovacinação do que a vacinação simultânea. Esses dados sugerem maior efetividade de uma dose da vacina contra febre amarela quando aplicada em crianças maiores de 12 meses de idade do que em crianças aos 9 meses de idade. Além disso, um percentual importante das crianças de 12 meses de idade classificadas como soronegativas e que haviam sido vacinadas simultaneamente com a vacina triviral apresentaram níveis mais baixos de anticorpos neutralizantes porém com aparente resposta a primovacinação, o que é justificado pelo tipo de resposta humoral observada nessas crianças.

A imunogenicidade observada após 2 doses da vacina contra febre amarela foi semelhante à observada em adultos após uma única dose vacinal. A proporção de resposta tipo anamnésica a segunda dose vacinal (62,93%), com detecção apenas de anticorpos tipo IgG representa que essa fração de crianças classificadas inicialmente como não respondedora a primeira dose vacinal havia obtido resposta imune primária após a primeira dose vacinal.

Um dado que sustenta essa hipótese está no achado de títulos médios geométricos de anticorpos neutralizantes (PRNT) após a primeira dose da vacina contra febre amarela maiores entre as crianças que apresentaram resposta tipo anamnésica após a revacinação ($p=0,01$). Se for considerado que essas crianças provavelmente já teriam proteção após a primeira dose da vacina, apesar de em níveis mais baixos de anticorpos neutralizantes, a proporção de soropositividade estimada após a primeira dose da vacina passaria de 85,3% para 90,76%. Considerando ainda que 91,5% das crianças que foram inicialmente classificadas como não reatoras apresentaram algum tipo de resposta humoral (detecção de anticorpos tipo IgG ou IgM) após a segunda exposição vacinal, a proporção de soronegatividade em crianças menores de 2 anos de idade que receberam duas doses da vacina contra febre amarela seria de apenas 1,25%. A administração de uma segunda dose da vacina contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade, além de resultar num percentual residual de indivíduos soronegativos com aumento importante da imunogenicidade do esquema vacinal, serviria como oportunidade para o aumento da cobertura vacinal contra febre amarela nas crianças menores de 2 anos de idade. A manutenção da primeira dose da vacina contra febre amarela aos 9 meses de idade com a segunda dose prevista para ser aplicada ainda no segundo ano de vida, não simultânea à vacina tríplice viral poderia ser uma estratégia efetiva para aumentar a imunogenicidade do esquema vacinal contra febre amarela em crianças e garantir a proteção de uma proporção significativa de crianças menores de 1 ano de idade a infecção natural por febre amarela em áreas endêmicas. Apesar da falta de evidência que sustente que a produção de anticorpos neutralizantes contra febre amarela em níveis considerados não protetores seja suficiente para proteção contra a doença, o fato das crianças soronegativas após a vacinação simultânea terem apresentado resposta anamnésica a revacinação associado a chance de aumento de cobertura vacinal com essa estratégia, indica que a vacinação simultânea com a vacina triviral poderia ainda ser uma opção durante campanhas de vacinação.

Conclusão

Uma proporção substancial das crianças soronegativas 30 dias ou mais depois da primovacinação contra febre amarela apresentou respostas tipo anamnésica 15 dias ou mais após a revacinação, indicando possivelmente que o critério de soropositividade tinha sido pouco sensível para níveis de anticorpos que, embora baixos, correspondiam à memória imunológica. A proporção de falha primária foi maior em crianças aos 9 meses do que aos 12 meses de idade. Essa proporção não trivial de crianças com respostas primárias à revacinação sugere que a primovacinação aos 9 meses de idade deixa desprotegidas crianças por

imaturidade imunológica ou pela presença de anticorpos maternos. Além disso, a resposta tipo anamnésica observada em crianças com 12 meses ou mais ressalta a possibilidade da vacinação triviral inibir a produção de anticorpos e que apesar da indução imunológica conferida, impossibilita a produção de níveis elevados de anticorpos neutralizantes. A proporção “residual” que permanece soronegativa após duas doses se aproxima da proporção de adultos com resposta imune não detectável pelo teste de neutralização com redução em placas de lise. Além disso o provável incremento de nível de anticorpos neutralizantes conferidos após duas doses da vacina contra febre amarela apesar de não conferir maior soroproteção, poderia contribuir para maior durabilidade da proteção. De todas as formas, as observações em crianças revacinadas são coerentes com observações anteriores de que a vacinação em lactentes induz respostas de intensidade inferior à dos adultos e crianças acima de 2 anos de idade. Realizar duas doses da vacina contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade é uma estratégia segura e efetiva para elevar a soroprevalência pós-vacinal contra febre amarela.

Referências

Ada, G. The Immunology of Vaccination. In: Vaccines. (Plotkin, S. A. & Orestein, W. A.) 3rd edition, Chapter 3. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.

Centers for Disease Control and Prevention. General Recommendations on Immunization. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR, 2006; 55(RR15).

Camacho LA, Freire M da S, Leal Mda L, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana J de A, Farias RH; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Revista de Saúde Pública* 2004;38(5):671-8

Camacho LA, Aguiar SG, Freire M da S, Leal Mda L, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana J de A, Farias RH; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Revista de Saúde Pública* 2005; 39(3): 413-420

Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program. *Vaccine* 2007; 25: 3118–3123

Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina contra Febre Amarela. Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina contra febre amarela. *Ciência & Saúde Coletiva* 2003; 8(Supl. 2):511 (Livro de Resumos II do VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Brasília-DF, agosto de 2003).

Hepburn MJ, Kortepeter MG, Pittman PR, Boudreau EF, Mangiafico JA, Buck PA, Norris SL, Anderson EL. Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17d yellow fever vaccine. *Vaccine* 2006; 24: 2843–2849

Lhuillier M, Sarthou JL. Interet des IgM antiamariles dans le diagnostic et la surveillance epidemiologique de la fievre jaune. *Annales de Virologie (Institute Pasteur)* 1983; 134E:349.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Manual de Procedimentos para Vacinação. 4ª Edição. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/MPV/mpv00.htm>.

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia. Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle da Febre Amarela. 2000. <http://www.funasa.gov.br/epi/fa/fa0.htm>

Monath TP. Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. *American Journal of Epidemiology* 1971; 93(2):122-129.

Monath, T.P., Cetron MS, Teuwen DE. Yellow Fever Vaccine. Chapter 36. In Plotkin, SA. & Orenstein WA organizadores. *Vaccine*. Philadelphia. Editora W.B. Saunders 2008

Monath TP. Yellow Fever Vaccine. *Expert Review of Vaccines* 2005; 4(4)

Niedrig M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against

yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Tropical Medicine International Health* 1999; 4(12):867-871.

Nogueira, RMR, Schatzmayr, HG, Miagostovich, MP *et al.* Use of MAC-ELISA for evaluation of yellow fever vaccination. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1992; 34 (5): 447-450.

Plotkin SL, Plotkin SA. A short history of vaccination. Chapter 1. In Plotkin, SA. & Orenstein WA organizadores. *Vaccine*. Philadelphia. Editora W.B. Saunders 2008

Poland JD, Calisher CH, Monath TP, *et al.* Persistence of neutralizing antibody 30–35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 1981; 59(6):895-900.

Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, *et al.* Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *Journal of Medical Virology* 1998; 56(2):159-167

Siegrist CA. *Vaccine Immunology*. Chapter 2 In Plotkin, SA. & Orenstein WA organizadores. *Vaccine*. Philadelphia. Editora W.B. Saunders 2008.

Spector S, Tauraso NM: Yellow fever virus. I. Development and evaluation of a plaque neutralization test. *Applied Microbiology* 1968; 16(11):1770-1775.

Spector SL, Tauraso NM: Yellow fever virus. II. Factors affecting the plaque neutralization test. *Applied Microbiology* 1969; 18(5):736-743.

Suzano CES, E. Amaral E, Sato HK *et al.* The effects of yellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy during a mass campaign in Brazil. *Vaccine* 2006; 24 (9): 1421-1426

Vazquez S, Valdes O, Pupo M, *et al.* MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *Journal of Virological Methods* 2003; 110(2):179-184.

Watson, J.C. & Peter, G. In: *Vaccines*. (Plotkin, S. A. & Orestein, W. A.) 3rd edition, Chapter 5. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.

World Health Organization. Global Programme for Vaccines and Immunization / Division of Emerging and Other Communicable Diseases Suveillance and Control. Yellow Fever – Technical Consensus Meeting. Geneva, 2-3 March 1998. Documento WHO/EPI/GEN/98.08.

Considerações finais

Recomendações sobre a vacinação contra febre amarela revisitadas: implicações dos resultados dos estudos com duas vacinas contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade para as estratégias do Programa Nacional de Imunizações.

Recomendações sobre a vacinação contra febre amarela revisitadas: implicações dos resultados dos estudos com duas vacinas contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade para as estratégias do Programa Nacional de Imunizações.

Guilherme Côrtes Fernandes^{1,2}, Luiz Antonio Bastos Camacho¹ and Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccines

¹ *Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ*

² *Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora*

Resumo: Um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, foi realizado para investigar a imunogenicidade e reatogenicidade de duas vacinas contra febre amarela (subcepas WHO-17D-213/77 e 17DD) em crianças (*Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007*). A relevância deste estudo está na capacidade de responder questões relativas às estratégias do Programa Nacional de Imunizações necessárias para a definição das políticas públicas para controle da doença. As seguintes variáveis foram analisadas: (1) imunogenicidade das vacinas contra febre amarela (17D e 17DD) em crianças menores de 12 meses; (2) idade da criança no dia da vacinação; (3) presença de imunidade contra febre amarela nas mães; (4) administração simultânea da vacina tríplice viral; (5) presença de anticorpos contra dengue nas crianças vacinadas; (6) o tipo de resposta imunológica humoral à revacinação de crianças que não responderam a primeira dose vacinal e proporção de soronegatividade após 2 doses da vacina antiamarilica. A proporção de soroconversão e soropositividade pós-vacinal contra febre amarela em crianças aos 9 e 12 meses de idade foi menor do que a observada previamente em ensaio clínico em adultos. Não houve diferença na imunogenicidade ou reatogenicidade das subcepas de vacinas contra febre amarela testadas (17D e 17DD). A situação sorológica das mães não foi um fator determinante de menor soroconversão em crianças menores de 12 meses de idade, porém a presença de anticorpos pré-vacinais contra febre amarela em crianças menores de 12 meses está associada a menor soroconversão. A proporção estimada de soronegatividade após duas doses de vacina contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade foi de apenas 1,25%. A vacinação simultânea contra febre amarela e tríplice viral afeta substancialmente a resposta imunológica para rubéola e febre amarela, mas não à vacina contra sarampo, o que pode influenciar de forma relevante as estratégias para controle da febre amarela e rubéola. A presença de anticorpos contra dengue, independentemente de seu título, não interfere na imunogenicidade ou no padrão de reatogenicidade das vacinas contra febre amarela aplicadas em crianças residentes em áreas endêmicas. A ocorrência de casos esporádicos e surtos não permite que a idade recomendada para a primovacinação seja deslocada para idades em que a vacina mostrou maior imunogenicidade. Uma alternativa seria alterar o esquema primário de vacinação contra febre amarela para duas doses: mantendo a primeira dose aos 9 meses e aplicando uma segunda dose após 12 meses de vida. A aplicação da segunda dose aos 18 meses de idade seria conveniente para não coincidir com outras vacinas do calendário de imunizações. A primeira dose aos 9 meses seria mantida para proteger indivíduos de zonas endêmicas, o mais cedo possível. A segunda dose permitiria (1) imunizar um número adicional de crianças que não tinham respondido à primovacinação (falha primária), (2) reforçar respostas à primovacinação, e (3) ampliar as oportunidades de vacinar aqueles que não haviam recebido a primovacinação aos 9 meses.

Introdução

As recomendações relativas à idade e ao cronograma de vacinação fundamentam-se em diversos fatores que incluem a epidemiologia, os riscos de adquirir a doença, os riscos de complicação, a imunogenicidade, a duração dessa imunidade e o cronograma de visitas ao serviço de saúde. Em termos ideais, uma vacina é recomendada para a menor faixa etária em risco que seja capaz de apresentar resposta imunológica à vacina e para quem a eficácia e segurança da intervenção tenha sido comprovada (Centers of Diseases Control, 2006; Watson & Peter, 1999; Plotkin, 2008). Trata-se porém de um processo dinâmico que impõe frequentes reavaliações de estratégias do programa de imunização, que levem em conta elementos programáticos de todas as vacinas do cardápio oferecido na rede pública de serviços básicos de saúde.

Estima-se que para a prevenção da febre amarela urbana e redução de casos gerados pelo ciclo silvestre da doença, a cobertura vacinal deveria ser de 100%. A Organização Mundial da Saúde recomenda a vacinação contra febre amarela para crianças aos nove meses de idade, concomitantemente à vacinação anti-sarampo, por ser estratégia de custo-efetividade maior do que a vacinação por campanhas para controle de surtos (WHO, 1998; Monath *et al.*, 2008). No Brasil, a recomendação é de emprego da vacina contra febre amarela aos 9 meses e revacinação contra febre amarela a cada 10 anos. Crianças com 12 ou mais meses de idade que não tenham recebido as vacinas contra febre amarela e triviral (contra sarampo, rubéola e caxumba) são elegíveis para aplicação simultânea das duas vacinas para que não se perca a oportunidade de vacinação.

As vacinas recomendadas atualmente pela Organização Mundial de Saúde são originárias das subcepas 17DD e 17D-204 (WHO, 1976; Monath, 2004). Essas subcepas apresentam pequenas diferenças na sequência de nucleotídeos (dos Santos *et al.*, 1995) que poderiam representar variações na imunogenicidade e reatogenicidade vacinais. A análise de dados comparativos sobre o perfil de imunogenicidade e reatogenicidade das subcepas 17D e 17DD na população alvo de vacinação em áreas endêmicas (crianças menores de 1 ano) é de extrema relevância para a definição das políticas públicas para controle da doença. Além disso, é importante para o produtor da vacina e para os organismos internacionais que credenciam produtores de vacinas contra febre amarela (Organização Mundial da Saúde) ou que adquirem a vacina para uso em outros países (UNICEF) documentar o desempenho comparativo das vacinas contra febre amarela de diferentes subcepas.

Em um estudo sorológico multicêntrico com a vacina da subcepa 17DD, foi demonstrada soroconversão de 97% dos indivíduos com idades de 10 anos ou mais, 94% das crianças de 2 a 9 anos, 88% das crianças de 12 a 23 meses, 72% das de 9-11 meses e 82% das

de 6-8 meses. Nos lactentes de 9 a 11 meses, em São Paulo, a soroconversão foi de 67% (Grupo Colaborativo, 2003). Os dados indicaram associação da baixa soroconversão e da menor intensidade da resposta imunológica com aplicação simultânea da vacina de sarampo. A história de vacinação das mães daquelas crianças não mostrou associação com soroconversão nem com intensidade da resposta imunológica, mas dados sobre antecedentes de vacinação materna foram baseados em entrevista. O desempenho da vacina nos lactentes no estudo multicêntrico (Grupo Colaborativo, 2003) contrariou os achados de estudos anteriores com vacinas das subcepas 17DD (Stephano *et al.*, 1999) e 17D (Lhuillier *et al.*, 1989; Mouchon *et al.*, 1990), em que a proteção de lactentes vacinados simultaneamente contra sarampo e febre amarela não foi afetada. Por outro lado, Belmusto-Worn (2005) observou 86,5% de soroconversão em crianças de 18 a 36 meses de idade no Peru. A mesma vacina (YF-VAX[®], subcepa 17D) havia soroconvertido 99,3% dos adultos em estudo anterior nos EUA (Monath *et al.*, 2002).

A presença de anticorpos maternos tipo IgG em crianças pode interferir na imunogenicidade de algumas vacinas de vírus vivo. A idade de aplicação da vacina contra sarampo no calendário básico de vacinação foi alterada pela permanência de anticorpos maternos até os 11 meses de vida e de ocorrência de casos de sarampo em crianças vacinadas antes dos 12 meses (Strebel *et al.*, 2008). Em relação à febre amarela, há evidência da transferência placentária de anticorpos neutralizantes humanos, sendo que anticorpos neutralizantes foram identificados em 7% de crianças aos 12 meses de idade filhas de mães vacinadas no início da gestação (Suzano *et al.*, 2006). A avaliação da influência de anticorpos maternos contra febre amarela em crianças se justifica tendo como base o modelo do sarampo e a ausência de estudos com as vacinas contra febre amarela que esclareçam de forma inequívoca se há influência na resposta vacinal de crianças menores de 1 ano de idade.

A administração de vários agentes imunizantes em um mesmo atendimento é conduta indicada pelo Ministério da Saúde por se considerar que além de facilitar a efetivação do esquema, permite, em reduzido número de visitas ao serviço de saúde, vacinar contra o maior número possível de doenças (Ministério da Saúde, 2001). Um estudo conduzido durante um surto de sarampo demonstrou que aproximadamente um terço dos casos de sarampo em crianças em idade pré-escolar não vacinadas, porém com indicação de vacinação, poderia ter sido evitado caso a vacina tríplice viral (contra sarampo, rubéola e caxumba) tivesse sido aplicada simultaneamente a outra vacina (Centers of Diseases Control, 2006; Hutchins *et al.*, 1989). A administração de rotina e simultânea de todas as doses apropriadas para a idade é recomendada para crianças que não tenham contra-indicações específicas no momento da consulta (Centers of Diseases Control, 2006).

Evidências experimentais somadas à experiência clínica fornecem o embasamento para a administração simultânea de vacinas (ou seja, durante a mesma consulta, não combinadas na mesma seringa) que aumenta a probabilidade de uma criança receber a vacinação completa na idade adequada (The National Vaccine Advisory Committee, 2003). A administração simultânea de algumas vacinas induz taxas de soroconversão e de reações adversas semelhantes às observadas quando as vacinas são administradas separadamente (Deforest *et al.* 1988; King & Hadler, 1994), porém pode haver alteração da efetividade vacinal com a vacinação simultânea (Verstraeten *et al.* 2003). A resposta imunológica a uma vacina com vírus vivo pode ser prejudicada caso seja administrada em menos de 30 dias da administração de outra vacina com vírus vivo, aparentemente devido à produção de interferon pela primeira vacinação (Centers of Diseases Control, 2006; Watson & Peter, 1999).

Em relação à vacina contra febre amarela, há a recomendação de que seja aplicada simultaneamente ou com intervalo de duas semanas das outras vacinas de vírus vivo (Ministério da Saúde, 2001). De qualquer forma, a questão da interferência entre vacinas com vírus vivos ainda precisa ser reexaminada para cada combinação, tanto no que diz respeito às razões biológicas quanto à imunogenicidade e à reatogenicidade da aplicação simultânea de vacinas. A vacina contra febre amarela tem sido aplicada simultaneamente ou combinada com as vacinas contra varíola, difteria-pertussis-tétano (Ruben *et al.*, 1973), sarampo (Ruben *et al.*, 1973; Lhullier *et al.*, 1989; Mouchon *et al.*, 1990; Soula *et al.*, 1991; Adu *et al.*, 1996; Stefano *et al.*, 1999), hepatite A (Dumas *et al.*, 1997), hepatite B (Yvonnet *et al.*, 1986; Coursaget, *et al.* 1991; Gil *et al.*, 1996), febre tifóide (Ambrosch, *et al.*, 1994), poliomielite (Coursaget, *et al.* 1995), sem interferências na imunização ou na segurança das vacinas. O aumento da gravidade ou incidência de reações adversas não foi observado após a administração simultânea das vacinas de maior uso (Watson & Peter, 1999). Faltam dados que justifiquem de forma inequívoca o uso simultâneo da vacina antiamarílica com a vacina tríplice viral.

O vírus da febre amarela tem determinantes antigênicos comuns a outros membros da família *Flaviviridae*. Há evidências experimentais de que a resposta imunológica ao vírus da vacina contra febre amarela pode ser modificada pela infecção por outros vírus da mesma família (Henderson *et al.*, 1970; Theiler & Anderson, 1975). Os dados sobre interferência dos vírus da dengue e da cepa 17D do vírus da febre amarela em humanos são conflitantes (Smith *et al.*, 1962; Fabiyi & MacNamara, 1962; Belmusto-Worn, 2005). A imunidade cruzada entre o vírus da febre amarela e outros flavivírus pode resultar em variações de imunogenicidade e reatogenicidade às vacinas contra febre amarela em indivíduos previamente expostos a flavivírus (Monath, 2005). A investigação da possibilidade de interferência de anticorpos contra dengue na resposta vacinal contra febre amarela e no padrão de reatogenicidade da

vacina aplicada em áreas endêmicas de dengue é da maior importância num momento em que se intensificam esforços para ampliar a cobertura vacinal em regiões de transmissão de dengue.

Apesar da correlação entre presença de anticorpos neutralizantes e imunidade conferida pela vacina contra febre amarela ter sido definida, o nível de anticorpos neutralizantes necessários para conferir proteção não é conhecido (Hepburn *et al.*, 2006). É esperado que alguns indivíduos vacinados contra febre amarela não desenvolvam anticorpos neutralizantes em níveis definidos como protetores e dessa forma sejam considerados não respondedores à primeira dose da vacina, o que pode ter ocorrido devido a: (i) resposta primária com produção de anticorpos em níveis baixos, não detectáveis ao teste, porém possivelmente com indução de células B de memória; (ii) ausência de indução de resposta imunológica à exposição antigênica primária a dose vacinal. Determinar o tipo de resposta imunológica humoral (primária ou anamnésica) que ocorre após uma segunda exposição antigênica nas crianças classificadas como não respondedoras à primeira dose vacinal é importante para avaliação do nível de proteção alcançada pelo esquema vacinal atual e definição quanto à necessidade de doses de reforço da vacina contra febre amarela.

As implicações de uma menor soroconversão em crianças, independentemente de seus determinantes, são enormes para o controle da epidemia. Apesar de ocorrerem em menor incidência, casos de febre amarela têm sido relatados em crianças menores de 11 anos de idade (Monath *et al.*, 2008). Além disso, relatos de epidemias de febre amarela urbana na África associadas a baixa cobertura vacinal em crianças com acometimento de crianças e taxas de letalidade maiores que as observadas em adultos (Monath *et al.*, 2008) reforçam a preocupação de conferir ampla imunização contra febre amarela em crianças. Antes da revacinação recomendada após 10 anos, poderia se constituir uma coorte de suscetíveis acrescida de indivíduos em que a vacina não conferiu proteção plena. Apesar de níveis mais elevados de anticorpos neutralizantes não ter sido associado a maior proteção, a obtenção de níveis mais elevados de anticorpos está associado a maior durabilidade da presença de anticorpos detectáveis (Hepburn *et al.*, 2006). A obtenção de dados sobre a imunogenicidade e a reatogenicidade das vacinas contra febre amarela em suas atuais recomendações em crianças, assim como a identificação de seus determinantes (subtipo vacinal, vacinações simultâneas, idade vacinal, presença de anticorpos maternos, presença de anticorpos contra dengue) é de extrema relevância para definição das estratégias do Programa Nacional de Imunizações para o controle da doença. As recomendações atuais de vacinação contra febre amarela aos 9 meses e de revacinação somente após 10 anos podem ser revistas, considerando os resultados de soronegatividade pós-vacinais e análise de seus determinantes. O objetivo

deste artigo é revisar algumas das recomendações vigentes para a vacinação contra febre amarela à luz de evidências geradas por estudos mais recentes, particularmente do estudo randomizado comparando duas vacinas contra febre amarela de diferentes subcepas em lactentes e em associação com a vacina combinada contra sarampo, rubéola e caxumba.

Bases da evidência

Um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, foi realizado para investigar a imunogenicidade e a reatogenicidade das vacinas contra febre amarela (17D213/77 e 17DD) em crianças com métodos descritos anteriormente (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007). Serão sumarizados neste artigo apenas os elementos fundamentais para a discussão proposta. O objetivo daquele estudo foi: (i) comparar a soroconversão obtida com as subcepas 17DD e OMS 17D-213/77 da vacina contra febre amarela em indivíduos entre 9-23 meses de idade; (ii) comparar a soroconversão e o nível de anticorpos neutralizantes obtidos com as vacinas 17D e 17DD contra febre amarela e a vacina triviral em subgrupos de crianças vacinadas simultaneamente e com intervalo de 30 dias (realizado somente em Brasília-DF); (iii) comparar a soroconversão e o nível de anticorpos neutralizantes obtidos com as vacinas 17D e 17DD contra febre amarela em crianças abaixo de um ano de idade com mães soropositivas e soronegativas para febre amarela; (iv) investigar a influência da presença de anticorpos contra febre amarela nas amostras pré-vacinais na soroconversão e o nível de anticorpos neutralizantes obtidos após a vacina contra febre amarela; (v) comparar a frequência de eventos adversos até 30 dias após a vacinação; (vi) investigar a influência da presença de anticorpos contra dengue na imunogenicidade e na reatogenicidade das vacinas contra febre amarela; (vii) determinar o tipo de resposta imunológica induzida pela segunda dose da vacina contra febre amarela em crianças não respondedoras a primovacinação.

O estudo envolveu 5 centros colaboradores em regiões onde a vacinação contra febre amarela é parte das atividades de imunização de rotina das unidades básicas de saúde. Foram recrutadas crianças com 9 a 23 meses de idade, sem história de vacinação contra febre amarela, que não apresentavam contraindicações à vacinação e que se apresentaram espontaneamente para vacinação em centros de saúde da rede pública selecionados para participar no estudo. Os critérios de elegibilidade para a vacinação e os procedimentos na sala de vacina seguiram as normas do Programa Nacional de Imunizações. Para proteção dos voluntários, o protocolo da pesquisa foi elaborado em conformidade com as Resoluções 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Os

responsáveis legais pelos indivíduos elegíveis para vacinação foram informados dos objetivos e métodos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela em crianças aos 9 e 12 meses de idade

Foram recrutadas 1.966 crianças nos 4 centros colaboradores (Campo Grande, Ribeirão Preto, Juiz de Fora e Belo Horizonte) que foram randomizadas para receberem um dos tipos de vacina contra febre amarela da pesquisa (17D-213/77 ou 17DD). Em Brasília, 1.943 crianças foram randomizadas para receberem uma das vacinas contra febre amarela, simultaneamente ou 30 dias após a vacina tríplice viral.

A média de idade no dia da aplicação da vacina foi de 9,4 (desvio padrão 1,4) e mediana de 9 meses para Campo Grande, Ribeirão Preto, Juiz de Fora e Belo Horizonte e de 12,2 (desvio padrão 0,9) e mediana de 12 meses entre as crianças randomizadas em Brasília que receberam a vacina tríplice viral com 30 dias de intervalo.

Os títulos de anticorpos pré-vacinais nas crianças mostraram distribuição e média geométrica semelhantes nos grupos de vacinação (17D e 17DD) e nos diferentes centros colaboradores. Não houve diferença entre o padrão de reatogenicidade vacinal das duas vacinas contra febre amarela ($p>0,05$) (da Silva e Camacho, 2008).

Não houve correlação entre os títulos de anticorpos das amostras sorológicas das mães e a proporção de soroconversão, soropositividade ou título médio de anticorpos após a vacinação contra febre amarela nas crianças com mediana de 9 meses. O título médio geométrico pré-vacinal foi maior em crianças com mediana de idade de 9 meses (130,3 mUI/ml) do que em crianças com mediana de 12 meses (116,6 mUI/ml) ($p=0,001$). Apesar de o título médio geométrico pós-vacinal ter sido maior no grupo de crianças com mediana de 9 meses (2.617,3 mUI/ml) do que em crianças com mediana de 12 meses (1.994,1 mUI/ml) que não receberam a vacina tríplice viral simultaneamente ($p<0,001$), as proporções de duplicação de anticorpos neutralizantes (88,8% e 91,2%; $p=0,06$) e de soropositividade pós-vacinal (86,7% e 84,2%; $p=0,08$) foram semelhantes nas coortes de crianças com mediana de 9 meses e de 12 meses de idade. As crianças que apresentavam níveis de anticorpos neutralizantes contra febre amarela maiores que 2,7log nas amostras pré-vacinais apresentaram menor proporção de soroconversão do que as crianças que apresentaram níveis de anticorpos inferiores a 2,7log (53,1% e 92,4%; $p<0,001$). Não foi observada associação entre a presença de anticorpos neutralizantes nas amostras pré-vacinais e o nível de anticorpos neutralizantes das amostras maternas (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007; Camacho e Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2008). Os dados

confirmam que a imunogenicidade das vacinas contra febre amarela é inferior em crianças menores de 2 anos de idade do que em adultos (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007).

Resposta imunológica de febre amarela, sarampo, rubéola e caxumba na vacinação simultânea e com intervalo de 30 dias das vacinas contra febre amarela (17D e 17DD) e tríplice viral (componentes sarampo, rubéola e caxumba)

Nas crianças vacinadas após 12 meses de idade, a proporção de soroconversão foi de 81,4% entre as crianças que receberam a vacina 17DD e de 77,2% entre as crianças que receberam a vacina 17D ($p= 0,063$) (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007). Foi observada menor proporção de soroconversão de nível de anticorpos pós-vacinais entre as crianças que foram vacinadas simultaneamente com a vacina tríplice viral (63%) quando comparada à vacinação com intervalo de 30 dias (82%) (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007). O título médio geométrico de anticorpos neutralizantes contra febre amarela foi maior entre as crianças que receberam a vacina antiamarílica 30 dias após a vacina tríplice viral quando comparado com as crianças vacinadas simultaneamente ($p<0,001$) (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007; Camacho e Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2008). As soroconversões contra rubéola e caxumba também foram maiores quando as vacinas foram administradas com intervalo de 30 dias, respectivamente 97% vs 90% e 66% vs 62%. Os títulos médios geométricos de anticorpos contra rubéola foram 2,5 vezes menores nas crianças vacinadas simultaneamente (da Silva e Camacho, 2008). Já a proporção de soroconversão contra sarampo foi de 98% independentemente do intervalo de administração das vacinas tríplice viral e antiamarílica (Camacho e Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2008).

A frequência de eventos adversos observada (presença de qualquer sinal ou sintomas nos 30 dias subsequentes à vacinação) foi de 23% para a coorte. Os eventos adversos mais comuns foram febre (14,2%), vômitos (1,9%), irritabilidade (3,3%), dor no local de aplicação da vacina (2,8%) e vermelhidão no local de aplicação da vacina (1,5%). A proporção de ocorrência de qualquer evento adverso pós-vacinal foi maior nas crianças que receberam as vacinas simultaneamente em comparação às que receberam a vacina contra febre amarela 30 dias após a vacina tríplice viral (27,3% e 18,8%; $p=0,02$), febre foi o único sintoma isolado que apresentou significância estatística (16,6% e 11,8% $p=0,001$) (da Silva e Camacho, 2008).

Resposta imunológica segundo presença de anticorpos contra dengue

Antes da primovacinação contra febre amarela, 626 crianças dos centros colaboradores de Campo Grande e Ribeirão Preto tiveram suas amostras coletadas e submetidas a dosagem de anticorpos contra dengue. A idade média no dia da vacinação foi de 9,6 meses (desvio padrão: 1,4 meses). A proporção de duplicação de nível de anticorpos contra febre amarela após a vacinação foi de 87,6% e a proporção de quadruplicação foi de 80,4%. Não houve diferença estatisticamente significativa na proporção de duplicação ($p=0,624$) e quadruplicação ($p=0,965$) de anticorpos contra febre amarela segundo nível de anticorpos contra dengue. A presença de anticorpos contra dengue (13,6%) também não influenciou a soropositividade pós-vacinal contra febre amarela ($p=0,334$). A proporção de eventos adversos foi inversamente proporcional ao nível de anticorpos contra dengue totalizando 19,8% no total de crianças. Não foi observada associação entre o nível de anticorpos contra dengue e imunogenicidade das vacinas contra febre amarela nos modelos de regressão linear. A presença de anticorpos contra dengue, independentemente de seu título, não interfere na imunogenicidade ou no padrão de reatogenicidade das vacinas contra febre amarela (17D e 17DD) aplicadas em crianças residentes em áreas endêmicas.

Resposta imunológica humoral a vacinação de não-respondedores a primeira dose de vacinação contra febre amarela

Indivíduos classificados como não-respondedores à primeira dose de vacinação contra febre amarela foram convidados a receber uma segunda dose da vacina contra febre amarela. Foi realizada nova coleta de sangue 15 dias ou mais após a revacinação e avaliado o tipo de resposta imunológica (detecção de anticorpos tipo IgM ou IgG por ELISA). 85,3% das 3.764 crianças vacinadas apresentaram níveis de anticorpos neutralizantes protetores (superiores a 500 mUI/mL) após a vacinação contra febre amarela. 46,8% ($n=237$) das 553 crianças soronegativas que foram revacinadas com a vacina 17DD tiveram nova coleta de sangue 15 dias ou mais após a revacinação para avaliação do tipo de resposta imunológica humoral obtida (produção de anticorpos tipo IgM ou IgG) após a segunda dose vacinal. Das 259 crianças revacinadas, 237 (91,5%) apresentaram produção de anticorpos específicos contra febre amarela (detecção de anticorpos tipo IgM ou IgG) após a segunda dose da vacina. 62,9% (163/259) das crianças revacinadas apresentaram resposta humoral tipo anamnésica, com detecção exclusiva de anticorpos tipo IgG. 28,6% (74/259) das crianças revacinadas apresentaram resposta humoral primária, com detecção de anticorpos tipo IgM. 8,5% das crianças revacinadas (22/259) não apresentaram níveis de IgM ou IgG detectáveis por ELISA após a segunda dose da vacina contra febre amarela. O título médio geométrico após a

primeira dose da vacina contra febre amarela foi maior entre as crianças que apresentaram resposta tipo anamnésica à segunda dose da vacina do que entre as crianças que apresentaram resposta primária somente após a segunda dose vacinal ($p=0,01$). A proporção de resposta primária somente após a segunda dose da vacina antiamarílica (falha primária a primovacinação) foi maior nas crianças menores (8 e 9 meses; respectivamente 46,2% e 44,1%) e diminuiu progressivamente em crianças maiores de 11 meses de idade ($p=0,002$), sendo respectivamente de 8,2% e 6,7% em crianças aos 12 meses e maiores de 1 ano de idade. Crianças soronegativas à primovacinação contra febre amarela e que foram vacinadas simultaneamente com a vacina triviral apresentaram predominantemente (83,3%) resposta humoral tipo anamnésica à revacinação. Considerando os resultados observados, a proporção estimada de soropositividade após uma única dose da vacina contra febre amarela em crianças menores de 2 anos seria de 90,8% e a proporção estimada de soronegatividade após duas doses de vacina contra febre amarela em crianças menores de 2 anos de idade seria de 1,2%.

Discussão

A vacina contra febre amarela é uma das mais antigas disponíveis. Ao longo de mais de 70 anos de utilização a vacina tem passado por aperfeiçoamentos nos seus métodos de produção, primariamente dirigidos à melhora do perfil de reatogenicidade. No entanto, é nas questões de segurança da vacinação que residem os maiores desafios para a vacina contra febre amarela. Os múltiplos eventos adversos graves identificados em sistemas de vigilância de eventos adversos pós-vacinais e com associação causal demonstrada clínica e laboratorialmente colocam desafios para os programas de saúde porque o controle do vetor não é viável no ciclo silvestre, é muito difícil no ciclo urbano e não há alternativa para prevenção da doença, que não dispõe de tratamento específico e tem alta letalidade. Na década de 1990, a rápida disseminação por quase todos os municípios brasileiros do *Aedes aegypti* – vetor da febre amarela no seu ciclo urbano – trouxe de volta a ameaça de reurbanização da doença e representou um dilema para a vigilância em saúde. Iniciativas como a redução da concentração de vírus por dose, teste de outras vias de administração, como a intradérmica, e desenvolvimento de vacina inativada parecem as mais promissoras a curto e médio prazo.

A eficácia e a efetividade das vacinas contra febre amarela têm sido aferidas indiretamente pelo sucesso das ações de vacinação em muitos países das Américas, onde a vacina contribuiu para a eliminação da febre amarela urbana, controle de surtos em áreas endêmicas e redução do número de casos esporádicos e em muitos países da África, onde a vacina é o único recurso para controlar a febre amarela urbana. A ocorrência da doença em

casos esporádicos e em surtos localizados em áreas mais remotas e mais pobres da África e das Américas talvez explique porque a vacina dirigida a uma das doenças alvo do Regulamento Sanitário Internacional, com vacinação exigida aos viajantes de e para áreas endêmicas, não tenha merecido investimento tecnológico compatível com seu *status*. A revacinação é recomendada a cada 10 anos, baseada em dados escassos nos quais as crianças estão subrepresentadas. Também não se conhece o correlato sorológico de proteção em seres humanos e a soropositividade após a vacinação é considerada como indicativo de proteção, qualquer que seja o título de anticorpos. Em que pese o sucesso das ações de vacinação no controle da doença, as questões pendentes sobre a imunogenicidade e a eficácia das vacinas disponíveis seguem sendo relevantes para as ações básicas de imunização na infância. Alguns dos pressupostos básicos do programa de vacinação – aplicação simultânea de vacinas de vírus vivos não afeta a imunogenicidade das vacinas, eficácia da vacina em lactentes – precisam ser revistos à luz das evidências trazidas pelos estudos apresentados.

Mudanças no calendário de imunizações de um país exigem análise cuidadosa das evidências científicas disponíveis, da epidemiologia da doença e das implicações operacionais, particularmente em um país tão extenso e heterogêneo como o Brasil. A definição de estratégias para o emprego de vacinas em populações depende de dados de efetividade habitualmente não disponibilizados em ensaios clínicos para licenciamento de vacinas, dada a limitada validade externa dos dados. Há questões pertinentes às estratégias e políticas do Programa de Imunizações (como questões de estratégias do calendário de vacinação) que geram hipóteses que precisam ser testadas e possibilitam a obtenção de evidência científica que defina efetividade do uso das vacinas nas populações.

Estudos prospectivos e controlados são considerados o padrão-ouro da investigação epidemiológica, sendo a principal ferramenta para estimativas sobre a eficácia de intervenções em saúde. A randomização e o cegamento dos estudos minimizam a introdução de viés e confundimento. Os ensaios clínicos tendem a apresentar limitações para validade externa dos dados devido às estratégias metodológicas utilizadas para garantir a consistência interna dos dados. Os ensaios clínicos chamados de pragmáticos tendem a buscar maior validade externa nos seus resultados, apesar da tendência de perda de consistência interna do estudo por dar maior importância à obtenção de dados mais próximos da estimativa de efetividade da intervenção. Ensaios clínicos pragmáticos são considerados ferramentas úteis para investigação da efetividade de intervenções em saúde pública realizadas em unidades básicas de saúde (Gerdine *et al.*, 2007; Godwin *et al.*, 2003).

Os estudos clínicos para licenciamento de vacinas têm como objetivos demonstrar a eficácia e segurança das vacinas assim como avaliar os efeitos da vacinação simultânea com

outras vacinas licenciadas. A eficácia deve ser demonstrada em estudos randomizados, controlados e com cegamento. Os desfechos de eficácia são específicos para cada vacina e podem ser avaliados tanto através da resposta clínica quanto resposta imunológica, sendo esta definida como *surrogate marker* caso haja correlação estabelecida entre resposta imunológica e proteção, o que não é bem estabelecido no caso da vacina contra febre amarela. Além das questões pertinentes à efetividade vacinal, há questões metodológicas que limitam a capacidade de um estudo clínico detectar eventos adversos pós-vacinais raros (devido a questões amostrais), que depende necessariamente de estudos observacionais de seguimento mais longo e acúmulo amostral que permita a identificação de eventos adversos pouco frequentes durante o emprego da vacina em populações heterogêneas e em diferentes cenários sociais e epidemiológicos. A segurança clínica e a efetividade das vacinas empregadas devem ser recorrentemente avaliadas, principalmente no contexto de modificações de uso como em novas estratégias vacinais e emprego em populações com características diferentes dos voluntários dos estudos.

Para responder algumas questões pertinentes às estratégias atuais do PNI para vacinação de crianças contra febre amarela, sarampo, rubéola e caxumba, foi desenhado o ensaio clínico multicêntrico duplo-cego randomizado realizado em unidades básicas de vacinação de 4 estados brasileiros (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007). A realização do estudo em voluntários selecionados com os mesmos critérios utilizados na vacinação de rotina e em unidades básicas de vacinação aumenta sua validade externa. Os critérios utilizados na monitoria clínica e na sistematização dos procedimentos de coleta e análise de dados garantiram o rigor metodológico do estudo e maximizaram sua validade interna. Os resultados deste estudo respondem a questões de interesse científico e prático, que afetam a efetividade do Programa Nacional de Imunizações.

Os vacinadores foram selecionados pela experiência em sala de vacina, mas o treinamento nos procedimentos específicos da pesquisa serviu como oportunidade de revisão das normas de conservação e manuseio estabelecidas pelo PNI. Durante o trabalho de campo, o processo de vacinação foi supervisionado por enfermeiro da unidade de vacinação. Os diários das salas de vacinação foram examinados regularmente pelos monitores clínicos. O estudo não interferiu nas demais vacinações de rotina quando indicadas pelos critérios do PNI, mas foram registradas as datas de aplicação para análise. O ensaio clínico possibilitou a inserção da rotina de pesquisa clínica em unidades de saúde e na rotina de profissionais que previamente somente vislumbravam a atividade assistencial. A percepção de estarem incluídos no processo de produção de conhecimento relevante para a sociedade foi um dos aspectos relevantes mencionados pelos profissionais envolvidos na pesquisa.

A estruturação das unidades de saúde e serviços de saúde local (salas de vacinação, ambulatórios, coordenação de programa de imunização, laboratório e hospitais) para realização de pesquisa clínica foi também um ponto importante do estudo. As visitas de monitoria clínica foram realizadas periodicamente. Nessas visitas era realizada avaliação da aderência ao protocolo e aos procedimentos do estudo, assim como verificação da estocagem das vacinas, do preenchimento de questionários, e da coleta e processamento das amostras de sangue. Os relatórios de monitoria foram colocados à disposição de um comitê externo (independente) de monitoramento dos dados. O desfecho do estudo foi a imunogenicidade vacinal (soroconversão), que é correlacionada à proteção pela vacina em alguns estudos clínicos. Porém, o fato de o estudo ter sido conduzido em unidades básicas de vacinação, seguindo as indicações habituais do PNI, aumentou a validade externa do estudo, sendo nesse contexto, a soroconversão um marcador de efetividade e não de eficácia vacinal (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine, 2007).

Os resultados desse estudo permitem rever algumas das estratégias do programa de imunização, especialmente contra a febre amarela. A vacinação simultânea com a vacina tríplice viral e a presença de anticorpos contra dengue permitiram conhecer o desempenho da vacina em situações em que há menos informações. A comparação da imunogenicidade e reatogenicidade de vacinas contra febre amarela de subcepas 17D e 17DD aplicadas nas idades previstas para vacinação (9 e 12 meses de idade) em áreas endêmicas e o tipo de resposta humoral obtida com uma segunda dose vacinal nas crianças classificadas como não respondedoras, forneceram informações complementares para revisão do calendário vacinal. Algumas questões podem influenciar nos resultados, como o nível de anticorpos neutralizantes nas mães, a eficiência do transporte transplacentário e o tempo de permanência desses anticorpos maternos nas crianças. Além disso, uma questão que deve ser considerada na análise dos dados diz respeito à imaturidade do sistema imune nas crianças menores de 1 ano de idade, que pode resultar em respostas imunológicas menos intensas e menos duradouras (Siegrist, 2008).

A proporção de soroconversão e soropositividade pós-vacinal contra febre amarela em crianças aos 9 e 12 meses de idade foi menor do que a observada previamente em ensaio clínico em adultos (Camacho *et al.*, 2004), mas foi semelhante à observada em estudo multicêntrico de soroconversão (Grupo Colaborativo, 2003). A situação sorológica das mães não pareceu um fator determinante de menor soroconversão em crianças menores de 12 meses de idade, mas a homogeneidade das mulheres neste aspecto (90% das mães eram soropositivas) pode ter limitado a detecção de associação. No entanto, a proporção de duplicação de anticorpos foi significativamente maior nas crianças que apresentavam níveis

de anticorpos neutralizantes pré-vacinais inferiores a 500 mUI/ml. Assim, o título médio geométrico de anticorpos neutralizantes detectados nas amostras pré-vacinais mais alto no grupo de crianças com idade mediana de 9 meses do que entre as crianças com idade mediana de 12 meses é coerente com a ideia de que se tratava de anticorpos maternos. O fato de crianças com mediana de 12 meses com títulos de anticorpos pré-vacinais contra febre amarela mais elevados terem apresentado menor soroconversão reforça a ideia da presença de anticorpos maternos ser uma das justificativas para a menor intensidade de resposta vacinal observada nas crianças menores de 12 meses de idade.

Crianças aos 12 meses de idade, que receberam vacinação simultânea com a vacina tríplice viral (sarampo, rubéola e caxumba), apresentaram menor imunogenicidade vacinal contra febre amarela, independentemente da subcepa vacinal. Dados do centro colaborador (Brasília, DF) onde o intervalo de tempo entre a vacinação contra febre amarela e tríplice viral foi controlado evidenciaram que a vacinação simultânea dessas vacinas afeta substancialmente a resposta imunológica para rubéola e febre amarela, mas não para sarampo, o que pode influenciar de forma relevante as estratégias para controle da febre amarela e da rubéola.

O grupo de crianças menores (mediana 9 meses) apresentou maior probabilidade de apresentar falha primária, com ausência de resposta humoral à primeira dose da vacinação do que no grupo de crianças com mediana de 12 meses ($p < 0,001$). A maioria das crianças que não responderam à primovacinação obtiveram resposta humoral após a segunda dose da vacina. Crianças menores (9 meses de idade) apresentaram predominantemente resposta humoral primária à segunda dose da vacina, enquanto crianças maiores, com mediana de 11 meses que eram soronegativas após a primovacinação apresentaram resposta tipo anamnésica à revacinação, sugerindo que já apresentavam resposta imunológica à primeira dose vacinal, apesar da produção de anticorpos em níveis considerados não protetores. Crianças vacinadas simultaneamente aos 12 meses contra febre amarela e triviral que não responderam à primovacinação apresentaram resposta humoral tipo anamnésica à revacinação. Esse fato sugere que a vacinação simultânea foi capaz de induzir resposta imunológica em um percentual maior de indivíduos do que observado inicialmente, porém com produção de anticorpos neutralizantes em níveis inferiores ao considerado soropositividade.

Não há correlatos sorológicos de proteção estabelecidos em seres humanos e a definição de soropositividade para títulos iguais ou maiores que $2,7 \log_{10}$ mUI/mL é mais sensível e possivelmente menos específica do que a utilizada em outros estudos. Mesmo assim, os achados do estudo de revacinação indicaram que uma proporção substancial de crianças revacinadas tinha sorologia falso-negativa, já que apresentaram resposta anamnésica

à revacinação. Esses resultados são coerentes com estudos anteriores que mostraram menor intensidade da resposta imune à vacinação em crianças abaixo de 2 anos. Outros estudos estão em curso para rever a acurácia do PRNT.

Uma questão adicional avaliada neste estudo diz respeito à ausência de interferência da presença de anticorpos contra dengue na imunogenicidade e padrão de reatogenicidade das vacinas contra febre amarela aplicadas em crianças em áreas endêmicas. A reatogenicidade das vacinas estudadas nos 30 dias subsequentes à vacinação foi compatível com o observado em outros estudos e não diferiu substancialmente entre as duas subcepas vacinais, idade de vacinação, vacinação simultânea com a vacina tríplice viral, presença de anticorpos contra dengue ou revacinação das crianças soronegativas.

Recomendações para definição da idade de vacinação devem considerar fatores como a menor idade para obtenção de elevadas taxas de soroconversão e a faixa etária com maior risco de infecção em áreas endêmicas, além de considerações pertinentes à reatogenicidade vacinal, objetivando otimizar a proteção induzida pela vacinação e minimizar o risco de infecção ou eventos adversos. Questões particulares dos programas de imunização em áreas endêmicas podem justificar as diferenças encontradas na cobertura vacinal em diferentes países (Clark e Sanderson, 2009) e devem ser consideradas localmente para definição da melhor estratégia para obtenção da cobertura vacinal necessária em cada faixa etária para controle da doença. Considerando questões relativas a segurança da vacina, não foram observadas diferenças na incidência de eventos adversos entre crianças aos 9 meses ou 12 meses de vida. Ao considerarmos a imunogenicidade vacinal, observamos que apesar da maior soropositividade conferida com a vacinação aos 12 meses de idade (quando não aplicada simultaneamente a vacina tríplice viral) do que conferida com a vacinação aos 9 meses de idade, a soropositividade nesta faixa etária confere proteção na maioria das crianças vacinadas que estariam sob risco de infecção em áreas endêmicas. Apesar de a vacinação simultânea ser estratégia para melhorar a cobertura vacinal, o caso particular da vacinação simultânea de tríplice viral e vacina contra febre amarela em crianças pode resultar em taxas de soroconversão baixas tanto para febre amarela como para componentes da vacina triviral. Estabelecer uma segunda visita para vacinação exclusiva com a primeira dose da vacina contra febre amarela após 12 meses de idade, apesar de garantir melhor imunogenicidade, poderia por outro lado acarretar queda da cobertura vacinal, além de manter a criança sob risco de adoecimento em áreas endêmicas após provável queda da proteção conferida por anticorpos maternos. Os dados resultantes da análise da soroconversão em crianças aos 9 meses de idade, da vacinação simultânea com a vacina tríplice viral e da revacinação dos não-respondedores reforçam a ideia da necessidade de realização de uma segunda dose da vacina

antiamarílica após o primeiro ano de vida e de forma não simultânea a outras vacinas objetivando obter imunogenicidade semelhante à conferida à população adulta.

Apesar de a recomendação atual de vacinação contra febre amarela fazer parte do calendário básico vacinal em áreas endêmicas, a realização de campanhas vacinais provavelmente continuará sendo uma estratégia válida para aumentar a cobertura vacinal e a efetividade de controle da doença. A vacinação simultânea (triviral e febre amarela) pode ainda ser uma opção em regiões onde a cobertura vacinal e a adesão ao programa de imunização sejam baixas, haja visto que o benefício da oportunidade de vacinação simultânea poderia compensar a menor imunogenicidade dos componentes rubéola e febre amarela. A revacinação pode ter ocorrido em algumas regiões do Brasil devido a repetidas campanhas de vacinação contra febre amarela em áreas endêmicas, não havendo evidência de aumento de eventos adversos após a revacinação.

O perfil de reatogenicidade vacinal também não foi alterado na vacinação simultânea ou com a revacinação, favorecendo a estratégia de revacinação, com o benefício de aumento de cobertura vacinal suplantando a menor taxa de soroconversão pela vacinação simultânea. A administração simultânea das vacinas triviral e febre amarela não constitui um problema para as estratégias de controle do sarampo, porém certamente representa uma questão a ser considerada para o controle da febre amarela, rubéola e caxumba. Um fato que deve ser considerado na possibilidade de realização de vacinação simultânea é a evidência de indução de resposta imunológica contra febre amarela, apesar de em níveis menos elevados de anticorpos neutralizantes, nos indivíduos classificados como soronegativos que haviam sido primovacinados simultaneamente com a vacina tríplice viral.

A ocorrência de casos esporádicos e surtos epidêmicos e epizooticos de febre amarela e a expansão das áreas em que a vacinação regular está recomendada não permite que a idade indicada para a primovacinação seja deslocada para idades em que a vacina mostrou maior imunogenicidade. A aplicação de duas doses da vacina contra febre amarela, com a primeira aplicada isoladamente aos 9 meses de idade, como previsto atualmente e uma segunda dose aos 15 ou aos 18 meses talvez seja uma opção para manter proteção conferida antes dos 12 meses de vida e com posterior aumento da proporção de soroconversores com a aplicação de uma segunda dose em uma idade em que já se espera maior imunogenicidade vacinal. A aplicação da segunda dose aos 18 meses seria alternativa para não coincidir com outras vacinas do calendário de imunizações. A primeira dose seria mantida aos 9 meses por ser conveniente do ponto de vista epidemiológico (necessidade de proteger indivíduos de zonas endêmicas, o mais cedo possível) e imunológico (segurança e imunogenicidade da vacina são menores abaixo dos 9 meses). A segunda dose permitiria (1) imunizar um número adicional

de crianças que não tinham respondido à primovacinação (falha primária), (2) reforçar respostas à primovacinação, e (3) ampliar as oportunidades de vacinar aqueles que não haviam recebido a primovacinação aos 9 meses. Como a reatogenicidade da vacina contra febre amarela é menor após a revacinação e a frequência de eventos adversos graves após a primovacinação é menor em crianças, não se espera que a segunda dose no segundo ano de vida afete substancialmente a reatogenicidade da vacina. Esta estratégia tem a mesma fundamentação da revacinação contra sarampo no segundo ano de vida, que era recomendada no Brasil e em outros países que faziam a primovacinação no primeiro ano de vida: aumentar a cobertura vacinal com pelo menos uma dose e reduzir a proporção de falhas primárias e secundárias da vacina (Strebel *et al.*, 2008). Na eventualidade de detecção de circulação viral, seja em epizootias ou casos humanos esporádicos, as áreas em que vigorasse o esquema proposto de duas doses necessitariam de ações complementares e localizadas de vacinação. Outras estratégias, objetivando maior soropositividade contra febre amarela, seria uma única dose após 12 meses de idade (aos 15 ou 18 meses de vida) com reforços a cada dez anos. As limitações dessas estratégias seriam (i) a provável coincidência no calendário com a vacina tríplice viral (no caso da aplicação aos 12 meses de idade), o que acarretaria menor soropositividade contra febre amarela, rubéola e caxumba; (ii) diminuição de cobertura vacinal contra febre amarela com instituição de visita exclusiva para essa vacina após o primeiro ano de vida (aos 15 ou 18 meses de vida); (iii) assim como o adiamento da proteção contra a doença.

O ensaio clínico foi executado na infraestrutura de atenção básica à saúde utilizada pelo Programa Nacional de Imunizações para vacinação de rotina e dessa forma foi possível avaliar as intervenções atualmente preconizadas para controle da febre amarela. Os dados produzidos por esse ensaio clínico são úteis para que novas decisões do programa possam ser refeitas com forte embasamento científico. Os resultados divulgados sugerem mudanças nas recomendações do calendário básico de vacinação e reforçam a necessidade de ampliação do número de doses e da cobertura vacinal para obtenção de elevada imunogenicidade vacinal semelhante à observada na população adulta, objetivando o controle da febre amarela. Todavia, a ampliação da vacinação, semelhante ao observado em 2001 durante campanha vacinal em Juiz de Fora, pode resultar em modificações da percepção da segurança da vacina, com impacto negativo na cobertura vacinal devido à ocorrência de eventos adversos pós-vacinais e ao aumento do número de notificações de eventos adversos pós-vacinais. A divulgação de dados oriundos de estudos epidemiológicos e clínicos que sustentem as decisões de saúde pública e estratégias vacinais tendem a preservar a confiança pública e evitar impacto negativo na cobertura vacinal. As diferentes estratégias e intervenções

adotadas no programa de vacinação geram hipóteses, além de oportunidades, de execução de novos estudos epidemiológicos para responder questões relativas ao emprego de vacinas em diferentes cenários. A identificação de eventos adversos pós-vacinais através da junção de dados oriundos do SINAN aumentou a sensibilidade do sistema de vigilância de eventos adversos pós-vacinais. A análise do sistema de notificação de eventos adversos em Juiz de Fora indica a importância de desenvolvimento de protocolos padronizados para coleta de dados e vigilância de eventos adversos pós-vacinais antes da implementação de uma nova estratégia vacinal, garantindo dados de evidência clínica que consigam definir causalidade e contribuir para a realização de estudos epidemiológicos. Estudos epidemiológicos precisam ser rotineiramente realizados para: *(i)* avaliar continuamente as diferentes intervenções e estratégias de saúde pública; *(ii)* responder questões pertinentes à efetividade do emprego de vacinas em populações; e *(iii)* assegurar que as intervenções em saúde pública sejam baseadas em critérios científicos.

Conclusão

A vacinação contra febre amarela no primeiro ano de vida deverá ser mantida, dadas a gravidade da doença e a conveniência do ponto de vista programático de vacinação. Uma segunda dose no segundo ano de vida pode ser necessária para reduzir falhas primárias (ausência de soroconversão) e secundárias (redução dos anticorpos a níveis abaixo dos protetores) da vacina contra febre amarela. A administração simultânea de vacina contra febre amarela e vacina tríplice viral não parece recomendada como rotina, mas poderia ser uma alternativa nos casos em que for realizada para que não se perca a oportunidade de vacinação em crianças com atraso no calendário vacinal.

Referências

Clark A, Sanderson C. Timing of children's vaccinations in 45 low-income and middle-income countries: an analysis of survey data. *Lancet* 2009; 373: 1543–49

Ada, G. The Immunology of Vaccination. In: *Vaccines*. (Plotkin, S. A. & Orestein, W. A.) 3rd edition, Chapter 3. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Adu, FD; Omotade, O.O.; Oyedele, O.I. *et al.* Field trial of combined yellow fever and measles vaccines among children in Nigeria. *East African Medical Journal* 1996; 73(9):579-82

Ambrosch, F; Fritzell, B.; Gregor, J.; *et al.* Combined vaccination against yellow fever and typhoid fever: a comparative trial. *Vaccine* 1994;12(7):625-8

Belmusto-Worn VE, Sanchez JL, McCarthy K, Nichols R, Bautista CT, Magill AJ *et al.* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 72(2):189-197.

Camacho LA, Freire M da S, Leal M da L, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana J de A, Farias RH; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Revista de Saúde Pública* 2004; 38(5):671-8.

Camacho LA, Aguiar SG, Freire M da S, Leal Mda L, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana J de A, Farias RH; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Revista de Saúde Pública* 2005; 39(3): 413-420

Camacho LAB e Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Interference of Immune response to yellow fever vaccines and combined measles-rubella-mumps vaccines in infants. 6th World Congress on Vaccines, Immunisation and Immunotherapy. Milan 23-25 September 2008

Centers for Disease Control and Prevention. General Recommendations on Immunization. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2006; 55(RR15).

Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Immunogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children younger than 2 year-old: a randomized, double-blind study. 5th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases – WSPID. Bangkok, Thailand, November 15-18, 2007

Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Measles immunogenicity after simultaneous application of 17DD or WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines and measles-mumps-rubella vaccine in children: a randomized, double-blind study. 1st Vaccine Congress. Amsterdam, The Netherlands 9-11 December 2007.

Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Immunogenicity of 17DD or WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines after simultaneous application of measles-mumps-rubella vaccine in children: a randomized, double-blind study. 1st Vaccine Congress. Amsterdam, The Netherlands 9-11 December 2007.

Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program. *Vaccine* 2007; 25: 3118–3123

Coursaget P, Fritzell B, Blondeau C *et al.* Simultaneous injection of plasma-derived or recombinant hepatitis B vaccines with yellow fever and killed polio vaccines. *Vaccine* 1995; 13(1):109-11.

Coursaget P, Bringer L, Bourdil C *et al.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1991; 85(6):788

Deforest A, Long SS, Lischner HW, *et al.* Simultaneous administration of measles-mumps-rubella vaccine with booster doses of diphtheria-tetanus-pertussis and poliovirus vaccines. *Pediatrics* 1988; 81:237–46.

Dumas R, Forrat R, Lang J, Farinelli T, Loutan L. Safety and immunogenicity of a new inactivated hepatitis A vaccine and concurrent administration with a typhoid fever vaccine or a typhoid fever + yellow fever vaccine. *Advances in Therapy* 1997;14;160–7.

Fabiyi A, MacNamara FN. The effect of heterologous antibodies on the serological conversion rate after 17D yellow fever vaccination. *American Journal of Tropical Medicine* 1962; 11:817-21.

Freestone, DS. Yellow Fever Vaccine. In *Vaccines*, Plotkin, S.A. & Mortimer, E.A. (Eds.) 2nd Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1994.

Fransen GAJ, van Marrewijk CJ, Mujakovic S, Muris JWM, Laheij RJF, Numans ME *et al.* Pragmatic trials in primary care Methodological challenges and solutions demonstrated by the DIAMOND-study. *BMC Medical Research Methodology* 2007, 7:16

Gil A, Gonzalez A, Dal-Re R, Calero JR. Interference assessment of yellow fever vaccine with the immune response to a single-dose inactivated hepatitis A vaccine (1440 EL.U.). A controlled study in adults. *Vaccine* 1996; 14(11):1028-1030.

Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina contra Febre Amarela. Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina contra febre amarela. *Ciência & Saúde Coletiva* 2003; 8(Supl. 2):511 (Livro de Resumos II do VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Brasília-DF, agosto de 2003).

Henderson BE, Cheshire PP, Kirya GB, Lule M. Immunologic Studies with Yellow Fever and Selected African Group B Arboviruses in Rhesus and Vervet Monkeys. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1970; 19(1):110-118.

Hepburn MJ, Kortepeter MG, Pittman PR, Boudreau EF, Mangiafico JA, Buck PA, Norris SL, Anderson EL. Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17d yellow fever vaccine. *Vaccine* 2006; 24: 2843–2849

Hutchins SS, Escolan J, Markowitz LE, *et al.* Measles outbreak among unvaccinated preschool-age children: opportunities missed by health care providers to administer measles vaccine. *Pediatrics* 1989; 83:369–74.

Kaplan JE, Nelson DB, Schonberger LB, *et al.* Effect of immune globulin on trivalent oral polio and yellow fever vaccinations. *Bulletin of the World Health Organization* 1984;62:585–90.

King GE, Hadler SC. Simultaneous administration of childhood vaccines: an important public health policy that is safe and efficacious. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 1994;13:394–407.

Lhuillier M, Mazzariol MJ, Zadi S *et al.* Study of combined vaccination against yellow fever and measles in infants from six to nine months. *Journal of Biological Standardization* 1989;17:9-15.

Godwin M, Ruhland L, Casson I, MacDonald S, Delva D, Birtwhistle R *et al.* Pragmatic controlled clinical trials in primary care: the struggle between external and internal validity. *BMC Medical Research Methodology* 2003; 3:28

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia. Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle da Febre Amarela. 2000. <http://www.funasa.gov.br/epi/fa/fa0.htm>

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Manual de Procedimentos para Vacinação. 4ª Edição. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/MPV/mpv00.htm>.

Monath TP. Yellow Fever Vaccine. *Expert Review of Vaccines* 2005; 4(4)

Monath TP, Nichols R, Archambault WT, Moore L, Marchesani R, Tian J *et al.* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 66(5):533-541.

Monath TP, Cetron MS, Teuwen DE. Yellow Fever Vaccine. Chapter 36. In Plotkin, SA. & Orenstein WA organizadores. *Vaccine*. Philadelphia. Editora W.B. Saunders 2008

Mouchon D, Pignon D, Vicens R *et al.* Étude de la Vaccination Combinée Rougeole-Fièvre Jaune Chez L'Énfant Africaine Agé de 6 a 10 Mois. *Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique* 1990; 83:537-551.

Ruben FL, Smith EA, Foster SO, Casey HL, Pifer JM, Wallace RB *et al.* Simultaneous administration of smallpox, measles, yellow fever and diphtheria-pertussis-tetanus antigens to Nigerian children. *Bulletin of the World Health Organization* 1973; 48:175-181.

Siegrist CA. Vaccine Immunology. Chapter 2 In Plotkin, SA. & Orenstein WA organizadores. *Vaccine*. Philadelphia. Editora W.B. Saunders 2008.

da Silva JRN e Camacho LAB. Avaliação da interferência da vacinação contra febre amarela na vacinação contra rubéola. Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS: edição 20 anos do SUS 2008. Ministério da Saúde. Brasília, 2008

Smith CEG, Turner LH & Armitage P. Yellow Fever Vaccination in Malaya by Subcutaneous Injection and Multiple Puncture. *Bulletin of the World Health Organization* 1962; 27:717-727.

Soula G, Sylla A, Pichard E *et al.* Etude d'un nouveau vaccin combiné contre la fièvre jaune et la rougeole chez des enfants âgés de 6 à 24 mois au Mali. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1991; 84(5):885-97.

Stefano I, Sato HK, Pannutti CS *et al.* Recent immunization against measles does not interfere with the efficacy of yellow fever vaccine. *Vaccine* 1999; 17:1042-6.

Strebel PM, Papania MJ, Dayan GH *et al.* Measles Vaccine. Chapter 18. In Plotkin, SA. & Orenstein WA *organizadores.* *Vaccine.* Philadelphia. Editora W.B. Saunders 2008

Suzano CES, E. Amaral E, Sato HK *et al.* The effects of yellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy during a mass campaign in Brazil. *Vaccine* 2006; 24 (9): 1421-1426

The National Vaccine Advisory Committee. Standards for child and adolescent immunization practices. *Pediatrics* 2003;112:958–63

Theiler M & Anderson CR. The Relative Resistance of Dengue-Immune Monkeys to Yellow Fever Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1975; 24(1):115-117.

Verstraeten T, Jumaan AO, Mullooly JP *et al.* A retrospective cohort study of the association of varicella vaccine failure with asthma, steroid use, age at vaccination, and measles-mumps-rubella vaccination. *Pediatrics* 2003;112:98–103

Watson JC & Peter G. In: *Vaccines.* (Plotkin, S. A. & Orenstein, W. A.) 3rd edition, Chapter 5. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 872, 1998.

World Health Organization. Global Programme for Vaccines and Immunization / Division of Emerging and Other Communicable Diseases Surveillance and Control. Yellow Fever – Technical Consensus Meeting. Geneva, 2-3 March 1998. Documento WHO/EPI/GEN/98.08.

Yvonnet B, Coursaget P, Deubel V *et al.* Simultaneous administration of hepatitis B and yellow fever vaccines. *Journal of Medical Virology* 1986;19:307–11.

Anexo 1

Artigo de publicação do protocolo

Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program.

Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine.

Vaccine 2007; (25): 3118–3123

Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program

Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine^{1,*}

*Escola Nacional de Saúde Pública, Rua Leopoldo Bulhões, 1480 Sala 820, Manguinhos,
21041-210 Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

Available online 22 January 2007

Abstract

Vaccines against yellow fever currently recommended by the World Health Organization contain either virus sub-strains 17D or 17DD. In adults, the 17DD vaccine demonstrated high seroconversion and similar performance to vaccines manufactured with the WHO 17D-213/77 seed-lot. In another study, 17DD vaccine showed lower seroconversion rates in children younger than 2 years. Data also suggested lower seroconversion with simultaneous application of measles vaccine. This finding in very young children is not consistent with data from studies with 17D vaccines. A multicenter, randomized, double-blind clinical trial was designed (1) to compare the immunogenicity and reactogenicity of two yellow fever vaccines: 17DD (licensed product) and 17D-213/77 (investigational product) in children aged 9–23 months; (2) to assess the effect of simultaneous administration of yellow fever and the measles–mumps–rubella vaccines; and (3) to investigate the interference of maternal antibodies in the response to yellow fever vaccination. The anticipated implications of the results are changes in vaccine sub-strains used in manufacturing YF vaccine used in several countries and changes in the yellow fever vaccination schedule recommendations in national immunization programs.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Yellow fever vaccine; Clinical trials; Randomized controlled trials

1. Introduction

Yellow fever vaccines are available since 1937 and are the major disease control method. Vaccines against yellow fever currently recommended by the World Health Organization contain either virus sub-strains 17D or 17DD and are considered safe and immunogenic [1,2]. The World Health Organization recommends vaccination of children at 9 months old, concomitant with measles vaccination, because of better cost/benefit analysis than campaign vaccinations to control outbreaks [3]. 17DD vaccine is of free-access to every

Brazilian citizen and is offered exclusively by the National Immunization Program.

The genetic sequencing of 17D-213/77 and 17DD sub-strains showed few differences in the nucleotide sequence [4,5]. The 17DD vaccine showed similar efficacy to a vaccine produced from the seed-lot WHO 17D-213/77, reaching 98% of seroconversion among healthy adults [6]. In an observational multicenter study, although the 17DD vaccine reached higher seroconversion rates among children older than 2 years: 97% among children older than 10 years and 94% among children between 2 and 9-years old; data showed lower seroconversion rates in children younger than 2 years: 88% for 12–23-months old, 72% for 9–11-months old, and 82% for 6–8-months old. The data also suggested lower seroconversion with simultane-

* Correspondence to: Guilherme Côrtes Fernandes.
Tel.: +55 32 32347387/21 2598 2630.

¹ Members of the Collaborative Group are listed in [Appendix A](#).

ous application of measles vaccine [7]. In another study, the proportion of children, with neutralizing antibodies, born from seropositive mothers dropped from 90% at birth to 63, 21 and 7% at 3, 6 and 12 months of age, respectively [8].

Possible determinants of lower levels of seroconversion in younger children include the vaccine substrain, presence of maternal immunity, interference of other vaccines and the research method. Lower seroconversion rates represent enormous implications for disease control. Therefore, it is important for the recommendations of basic routine immunization schedule to evaluate the interference of other attenuated virus vaccines and maternal antibodies and also to assess to what extent the vaccine virus substrains explain differences in vaccine immunogenicity. This study aims to: (i) compare seroconversion attained with 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccine substrains in individuals aged 9–23 months; (ii) compare seroconversion attained with yellow fever 17D and 17DD vaccines and MMR vaccine in subgroups of children vaccinated simultaneously and 30 days apart; (iii) compare seroconversion attained with yellow fever 17D and 17DD vaccines in children under 1 year old with yellow fever seropositive and seronegative mothers; (iv) compare the frequency of adverse events within 30 days following vaccination. The objective of this paper is to describe the rationale, study design, implementation and proposed analysis of the trial.

2. Materials and method

This is a multicentric, randomized, double-blind, prospective study to test the hypothesis of difference in the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccine substrains applied simultaneously or with a 30-day interval of measles–mumps–rubella (MMR) vaccination. The study was conducted in four Brazilian states (São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul and Brasília-Distrito Federal) and the Coordinating Study Center is located at Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

The study was performed in public health centers where yellow fever and MMR vaccination are part of routine practice. Healthy children aged between 9 and 23-months old presenting for routine vaccination were invited to participate. Children were formally included in the study if the free and informed consent form was signed by parents or legal guardians. Eligibility criteria for inclusion and exclusion in the study followed the Brazilian National Immunization Program's recommendation for routine yellow fever vaccination.

2.1. Randomization and blinding

Participants were randomized in blocks of size 6, at a 1:1 ratio. Randomization was stratified by states. Children

from Minas Gerais, Mato Grosso do Sul and São Paulo, below 12 months of age, were randomized to receive either 17D or 17DD yellow fever vaccines (Fig. 1). In Brasília-Distrito Federal, children over 12 months old were assigned through randomization to receive either 17DD or WHO17D-213/77 yellow fever vaccines but also randomized to receive these vaccines either simultaneously or at a 30-day interval to MMR vaccination (Fig. 2).

The type of vaccine used was blinded to the participants, the field study team, and the study data analyst (“triple-blind”), through codes on the vials. The vaccines to be compared were identical in appearance, volume, handling requirements and administration, and were presented in identical vials labeled with numeric codes randomly distributed by a statistician and open only to the person responsible for the alterations in manufacturing routine. Each vaccine vial was used in only one participant. The vials were packed following the numeric sequence.

Randomization lists containing the codes were sealed and kept at the Coordinating Study Center (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). The External Monitoring Committee had access to the randomization list. The codes could only be opened after conclusion of statistical analyses or if requested by a physician due to an adverse event for which the knowledge of the type of vaccine used was considered essential for treatment.

2.2. Data collection

A two-section questionnaire was applied: pre- and post-vaccination (applied 30 days after vaccination) with records of social, demographical and clinical data. A 4 mL sample of blood was collected to measure antibodies (measles, rubella, mumps, dengue fever and yellow fever) on the vaccination day and 30 days after vaccination (Figs. 1 and 2). On the vaccination day, mothers of children under 1 year of age were requested to provide a blood sample to measure maternal antibodies against yellow fever.

2.3. Vaccination

The yellow fever vaccines used are (i) 17DD vaccine produced at Bio-Manguinhos, FIOCRUZ already used in public health services of endemic regions; and (ii) a vaccine produced from the seed-lot WHO 17D-213/77, used successfully in a randomized placebo-controlled study [7]. Distribution, handling and application of the vaccines followed the recommendations from the manufacturer (Bio-manguinhos/FIOCRUZ) and from the Brazilian National Immunization Program [9].

The vaccines were prepared from attenuated virus strains, cultivated in chicken embryos, free from pathogenic agents SPF (Specific Pathogenic Free), according to the norms established by the World Health Organization [10]. The 17D vaccine currently in routine use is produced from the Secondary Seed Lot 102 (passage no. 287) of the 17DD substrain

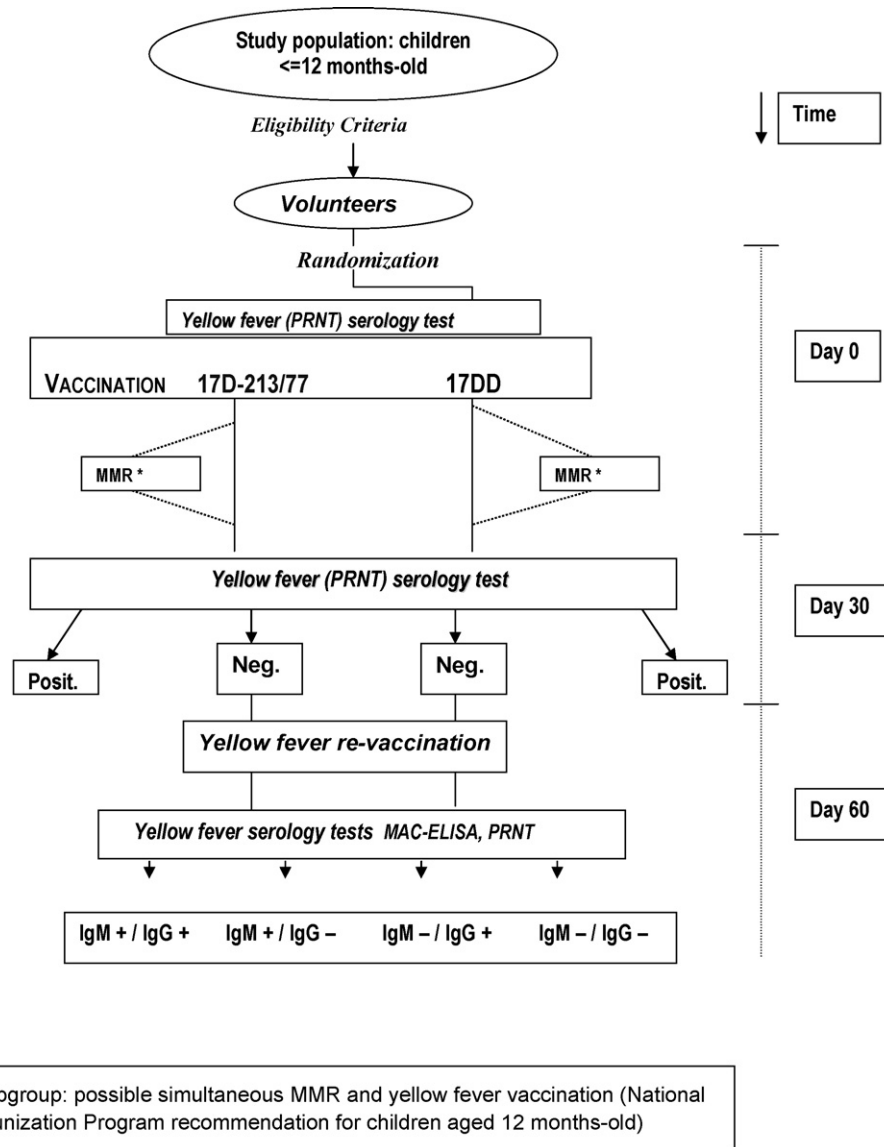


Fig. 1. Flowchart of recruiting and follow-up of study subjects, children younger than 12 months. Minas Gerais, Mato Grosso do Sul and São Paulo.

produced in 2001 (used to manufacture all vaccine lots since 2002). The vaccine produced from the seed-lot derived from the WHO seed 17D-213/77 was produced in an investigational lot for use only in this study. Vaccines were produced at Bio-Manguinhos/FIOCRUZ with Good Manufacturing Practices (GMP) and have the following composition per dose (0.5 mL): yellow fever virus (1000 DL_{50}^{**}), sucrose (0.8 mg), sodium glutamate (4.05 mg), sorbitol (8.5 mg), hydrolyzed bovine gelatin (5.0 mg), erythromycin (3.0 mcg) and kanamycin (10.0 mcg). The diluent (water for injection) was the same currently used in routine yellow fever vaccination: Lot 04UDFA161Z; expiration date 04/2009. The vaccine lots used and expiration dates are: (i) 17DD strain vaccine, seed-lot 993FB013Z: Lot 055VFA054P, expiration date: 05/2007; (ii) 17D strain vaccine, WHO seed-lot (17D: 213/77): Lot 04UVFAEX34, expiration date: 12/2006.

2.4. Laboratory tests

The Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) is considered the most sensitive and specific test for yellow fever [11,12] producing quantitative results (in International Units) that correlate to protection. Serum aliquots in ependorf labeled with numeric codes were sent to Laboratório de Vírus de Bio-Manguinhos (LATEV/FIOCRUZ, Virus Laboratory) to undergo PRNT. Serologic tests for dengue fever, measles, rubella, and mumps were performed at the Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz (Virology Department, Oswaldo Cruz Institute).

2.5. Post-vaccination follow-up

All volunteers who received the vaccine were included in the safety analysis, which evaluated events that may have

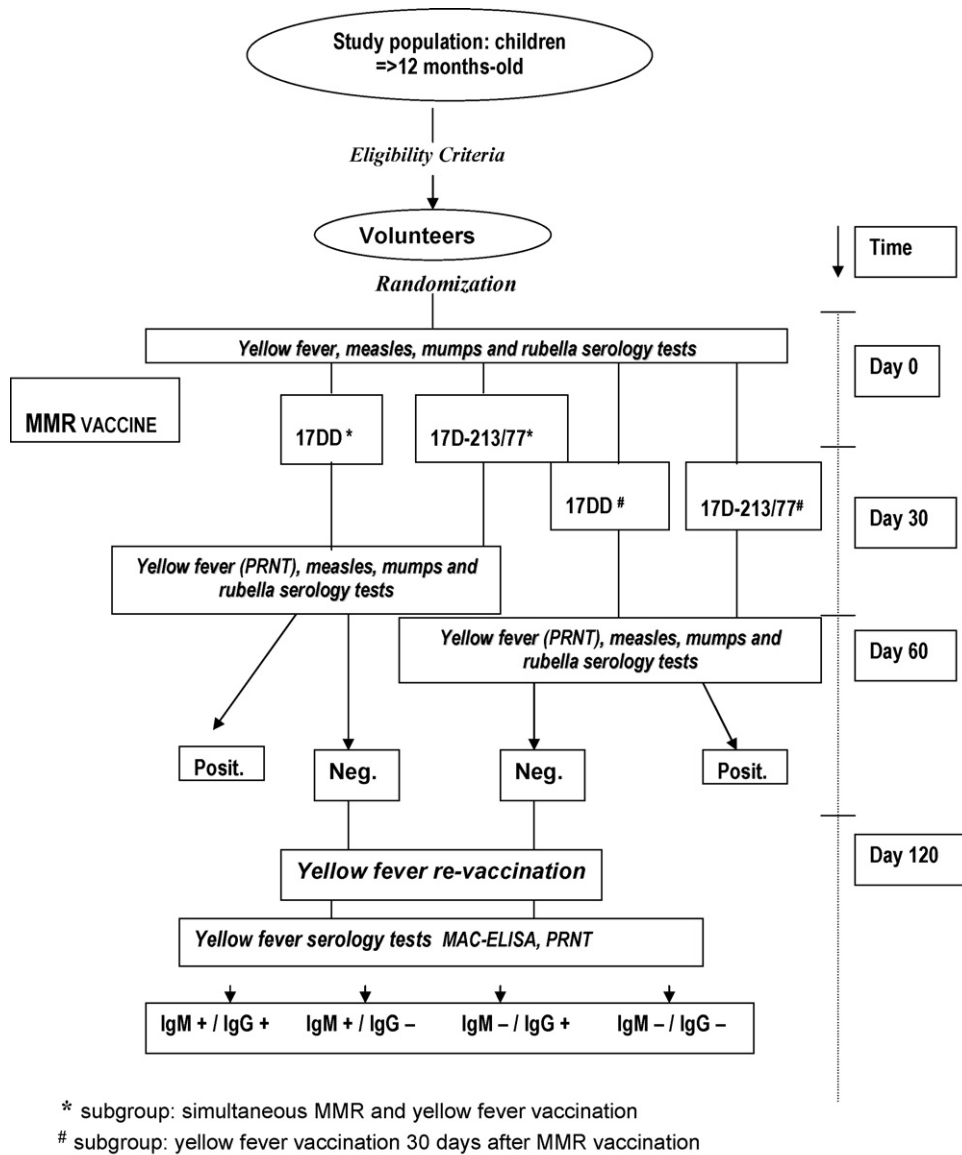


Fig. 2. Flowchart of recruiting and follow-up of study subjects, children older than 12 months. Brasilia-Distrito Federal.

occurred from the initiation of the study to 30 days after vaccination. Investigators asked parents about the occurrence of events following vaccination at the second visit and a standardized form filled by the parents, describing the events occurred during the first 10 days after vaccination collected. Serious adverse events were reported immediately during the whole study period. An independent data-monitoring committee of expert clinicians who were blinded to the study group assignments and an independent committee were empowered to stop the trial. Three ordinary meetings were scheduled to discuss all serious adverse events and adherence to the study protocol.

The delivery of serologic tests results, the final evaluation of post-immunization adverse events or (re)vaccination of

yellow fever seronegative individuals – whatever happened last – formally end the individuals’ participation in the study (Figs. 1 and 2).

Dates for post-vaccination blood collection were scheduled on the study ID card, and participants who did not present themselves on the appointed date were contacted by mail, telephone or home visit. Individuals who decided not to take further part in the study and that could be contacted were asked to provide a reason for their decision, which was recorded.

Laboratory tests results were informed in individual letters to the participants through the Health Units where blood was collected. Revaccination was recommended with the routine vaccine for participants that did not present antibodies in the post-vaccination antibody test.

At the end of the study, the parent/guardian was asked if he/she knew the type of vaccine that was used. This approach intended to evaluate a possible unblinding and its implications on the results.

2.6. Sample size

The number of participants in each group was calculated based on the following parameters: statistical power of 80%, significance level of 95%, two-tailed test, proportion of seroconversion of 90% in one of the groups (p_1), minimum relevant difference between groups (p_1-p_2) of 5%, correction for losses 20% [13]. With 650 children in each comparison group differences as small as 0.3 in mean \log_{10} in yellow fever antibody titres could be detected with 80% power. For adverse events found in 5% of subjects in one group this sample size had 82% power to detect 5% difference.

2.7. Data analyses

Statistical data analysis was conducted at the coordinating center at Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. In the database, the vaccines were assigned codes A and B to blind the analyst to the type of vaccine.

Pre- and post-vaccination tests results were compared defining seroconversion as seropositivity in non-reacting individuals prior to vaccination. For the complete cohort analysis (“intent-to-treat”) seroconversion was defined as a 4-fold increase of antibodies titres as compared to pre-vaccination levels. The proportion of seroconversion, mean geometric titres and frequency of adverse events were calculated and confidence intervals of 95% were defined for the estimates. Data were analyzed with the software SPSS Version 10.0 for Windows.

The entire cohort was considered for adverse events analyses and was composed of individuals with reactogenicity data, even when there was a breach in the protocol (intent-to-treat analysis). For immunogenicity analyses, the entire cohort was composed of all randomized individuals with pre-vaccination serology tests. A secondary analysis of the subgroup that followed the protocol did not take into account subjects that followed criteria for exclusion or elimination or that were seropositive at the pre-vaccination serology test. A protocol adherence analysis included frequency tables by type of breach, by collaborating center, and by study arms.

The study arms were compared so as to assess if the randomization was successful. The demographic profile of the participants and individuals who decline participation was also compared to support consideration on the external validity of study results. The immunogenicity and reactogenicity analyses were stratified by collaborating center.

The interaction between yellow fever and MMR vaccines were assessed by comparing seroconversion rates for yellow fever in same age subgroups, distinguished only by the dates of administration of the vaccines. The proportion of

seropositive individuals for measles, rubella, and mumps was compared in these subgroups.

In breastfed children under 1 year of age, seroconversion analysis was conducted in subgroups defined by the yellow fever serology status of the mothers.

2.8. Considerations on study ethics

The research was conducted in regions where yellow fever vaccination is already part of the basic routine immunization for children over 9 months. This protocol was elaborated according to the Resolution 196/96 of the National Health Council on research involving humans, approved by the Research Ethics Committees at Escola Nacional de Saúde Pública-FIOCRUZ and authorized by ANVISA (Brazilian regulatory authority). The trial registration number is ISRCTN72367932.

3. Closing remarks

The use of yellow fever vaccine in infants living or traveling to endemic areas still poses challenges to immunization programmes as the list of recommended vaccines grows. This study’s results may suggest changes in routine vaccines recommendation and schedule, such as, changes in vaccine sub-strains used in manufacturing yellow fever vaccine used in several countries in Latin America and Africa, and changes in the age of the first dose and booster doses of yellow fever vaccine in national immunization programs. This trial took advantage of a public health programme to assess interventions and health policies, providing hard data for the decision-making process, and ensuring that public health interventions are based on scientific criteria.

The well-established use of yellow fever vaccines in national immunization programmes precluded the assessment of comparative *efficacy* of the vaccine. Trial endpoints relied on immunogenicity laboratory data (seroconversion), which are considered valid correlates of protection. Moreover, being conducted in health care units emphasized *effectiveness* of the vaccine, as study personnel, despite specific training, comprised mostly the staff of health care units, and intervention and data collection procedures were performed in real immunization settings. Infants recruited for the study represent the main population target of the vaccine (eligibility criteria were similar to those of routine immunization) from several regions (multicenter study). These features are thought to enhance the external validity of the findings.

Acknowledgements

Contributors: Luiz Antonio Bastos Camacho, Marcos da Silva Freire, Maria da Luz Fernandes Leal and Maria de Lourdes Souza Maia led the development of the pro-

tocol, securing of funding, study administration, and data analysis; Guilherme Côrtes Fernandes (e-mail addresses: gcortes@ensp.fiocruz.br and gcortes@powerline.com.br) and Luiz Antonio Bastos Camacho led the writing of this paper.

Sponsorship: National Immunization Program, Ministry of Health; Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ; CNPq; Local and State Health Departments.

Appendix A. The members of the Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine are:

Steering Committee: Luiz Antonio Bastos Camacho (Principal Investigator), Marcos da Silva Freire, Maria da Luz Fernandes Leal, Maria de Lourdes Souza Maia and Reinaldo Menezes Martins (FIOCRUZ).

Collaborating centers and investigators: Anna Maia Yamamoto Yoshida (Laboratory of Vírus Technology-FIOCRUZ), Helena Keico Sato (São Paulo State Health Secretary), Guilherme Côrtes Fernandes (Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora-MG), Ivone Perez de Castro (Health Secretary of Brasília-DF), Jandira Campos Lemos (Health Secretary of Minas Gerais), and Eugenio Martins Barros (Health Secretary of Campo Grande-MS).

Collaborators: Takumi Igushi (FIOCRUZ), Márcia Borges Leitão (Health Secretary of Minas Gerais), Maristela Batista (Health Secretary of Juiz de Fora-MG), Maria da Conceição Barros (Health Secretary of Campo Grande-MS) and Elisabete Paganini São Paulo (State Health Secretary), Marileide Nascimento (FIOCRUZ) e Nilce da Silva (FIOCRUZ).

Data Monitoring Committee: Meri Baran (Health Secretary of Rio de Janeiro), Eduardo Pernambuco (University of Rio de Janeiro) and Antonio José Leal Costa (Federal University of Rio de Janeiro).

References

- [1] World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series No. 594;1976.
- [2] Monath TP. Yellow fever. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccine. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004. pp. 1095–176.
- [3] World Health Organization. Global programme for vaccines. Yellow fever. Fact Sheet No. 100. Geneva: Mimeo; August 1998, p. 5.
- [4] Santos CND, Post PR, Carvalho R, Ferreira II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res* 1995;35:35–41.
- [5] Galler R, Post PR, Santos CND, Ferreira II. Genetic variability among Yellow Fever virus vaccine strains. *Vaccine* 1998;16:1024–8.
- [6] Camacho LAB, Freire MS, Leal MLF, Aguiar SG, Nascimento JP, Igushi T, et al. Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Rev Saúde Pública* 2004;38(5): 671–8.
- [7] Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina contra Febre Amarela. Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina contra febre amarela. *Ciência Saúde Coletiva* 2003;8(Suppl. 2): 511.
- [8] Suzano CES, et al. The effects of yellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy during a mass campaign in Brazil. *Vaccine* 2006;24:1421–6.
- [9] Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Manual de Procedimentos para Vacinação. 4ª Edição; 2001. <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/MPV/mpv00.htm>.
- [10] World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 872;1998.
- [11] Dobler G, Jelinek T, Frösner G, Nothdurft HD, Loscher T. Kreuzreaktivität von Patientenseren mit akutem Dengue-Fieber mit Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Tests. *Wien Med Wochenschr* 1997;147(19–20):463–4.
- [12] Niedrig M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop Med Int Health* 1999;4(12):867–71.
- [13] Fleiss J. Statistical methods for rates and proportions. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.

Anexo 2

Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Ensaio Clínico Randomizado Duplo-cego com duas Vacinas contra Febre Amarela das Subcepas 17DD e 17D-213/77 em Crianças

FIOCRUZ/Ministério da Saúde – Secretaria Municipal de Saúde

Pesquisador Responsável: Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho

Este documento procura dar ao Sr. (à Sra.) informações e pedir a participação do seu filho(a) nesta pesquisa patrocinada pelo Ministério da Saúde com o objetivo de comparar a proteção e as reações por dois tipos de vacinas contra a febre amarela produzidas pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da FIOCRUZ (Bio-Manguinhos). Por favor, leia as explicações abaixo e peça os esclarecimentos que quiser à equipe da pesquisa. Se preferir, consulte também outros médicos e pessoas de sua confiança antes de decidir sobre a participação na pesquisa.

A FIOCRUZ vem produzindo há mais de 60 anos vacinas contra febre amarela com segurança e eficácia comprovadas pelo controle da doença nas regiões onde tem sido aplicada. Assim como outras vacinas e medicamentos, a vacina contra febre amarela vem incorporando avanços científicos através de pesquisas como esta que estamos propondo. Esta pesquisa é para saber se a vacina produzida com um lote-semente da Organização Mundial da Saúde pode dar maior grau de proteção contra febre amarela do que a vacina em uso atualmente. Além disso, vamos investigar se o grau de proteção pela vacinação contra febre amarela em crianças pequenas pode ser influenciado pelos anticorpos que as mães passam aos filhos, e se vacinas contra outras doenças podem interferir na proteção pela vacina contra a febre amarela. Neste tipo de pesquisa, se fazem exames e observações nos vacinados para medir a quantidade de anticorpos contra a febre amarela no sangue e comparar os dois tipos de vacina.

A pesquisa está sendo feita em unidades de saúde e escolas de vários Estados do Brasil onde a vacina já é feita de rotina. Nós estamos convidando para participar da pesquisa todas as crianças que não tomaram a vacina contra febre amarela e que não tiverem contra-indicação para a vacina. Para participar nós pedimos às pessoas para (1) receber uma dose de um dos tipos de vacina contra febre amarela que estão sendo comparados; (2) responder a algumas perguntas sobre a saúde do seu filho; (3) informar sobre quaisquer problemas de saúde que aparecerem até 30 dias depois da vacinação; (4) fazer um exame de sangue para medir os anticorpos no mesmo dia da vacinação e

outro exame 30 dias depois da vacinação. A comparação da quantidade de anticorpos contra a febre amarela no sangue antes e depois da vacinação permite confirmar a proteção dada pela vacina. Das mães das crianças até 1 ano de idade, será pedido também um exame de sangue no dia da vacinação para medir anticorpos contra febre amarela.

Em pesquisas científicas como essa, cada tipo de vacina recebe um código e a vacina a ser aplicada é indicada por sorteio, de forma a aumentar a confiança nos resultados. Os códigos serão abertos ao fim do estudo, ou antes, somente nos casos de necessidade do médico. As vacinas deste estudo já foram usadas em outras pesquisas e se mostraram seguras. Mesmo assim, depois da aplicação algumas pessoas apresentaram dor e vermelhidão no local da injeção, febre baixa, dor de cabeça e dor no corpo. Problemas mais sérios, como reações alérgicas graves, são muito raros (1 caso em um milhão de doses aplicadas). O exame de sangue pode produzir um certo incômodo, mas não representa risco importante para a saúde. O atendimento a qualquer problema de saúde ligado à vacina contra febre amarela ou aos exames de sangue será assegurado aos participantes deste estudo. O Ministério da Saúde se responsabilizará pela indenização ou compensação monetária por eventuais danos causados pela pesquisa, nas formas previstas em lei. Os resultados dos exames de sangue feitos durante a pesquisa serão informados por escrito ao Sr.(Sra.) e uma nova dose de vacina será oferecida aos que não tiverem anticorpos contra febre amarela no sangue. O tempo total de duração da sua participação do estudo é de aproximadamente dois meses, com apenas um retorno ao centro de saúde para fins da pesquisa.

Sua colaboração nesta pesquisa é muito importante mas é uma escolha somente sua, e não faz parte do atendimento ou das atividades na escola. Você pode se recusar a participar ou interromper sua participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem precisar dar explicações, e sem que isso o prejudique no trabalho, no atendimento ou em vacinações no futuro. Todas as informações sobre os participantes neste estudo são confidenciais. Não serão divulgados nomes dos participantes em nenhuma hipótese, e os resultados da pesquisa só serão apresentados em conjunto, sem revelar a identidade dos participantes. As amostras de sangue coletadas neste estudo serão utilizadas exclusivamente para os exames previstos neste projeto de pesquisa (anticorpos contra febre amarela, sarampo, rubéola, caxumba e dengue).

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ.

Nos locais de vacinação haverá um responsável pelo estudo para esclarecer dúvidas e prestar um primeiro atendimento e providenciar o encaminhamento dos casos que precisem de atendimento médico. Em caso de dúvidas contactar o Dr. _____, telefones xxxx xxxx (2ª a 6ª de 8h às 17 h) ou o Dr. _____, telefones xxxx xxxx e xxxx xxxx, o Dr. Luiz

Antonio B. Camacho , telefone 21 2598 2630, ou o Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ, telefone 21 2561 4815.

Declaro estar ciente das informações deste Termo de Consentimento, entendendo que poderei pedir esclarecimentos a qualquer tempo. Declaro dar meu consentimento para a participação de meu filho nesta pesquisa, estando ciente de que uma outra cópia deste termo permanecerá arquivada pelos organizadores da pesquisa.

Participante: _____

Endereço: _____

_____, de _____ de 200_.
(local)

Assinatura do responsável

Assinatura do responsável pela pesquisa no posto de vacinação

Assinatura do responsável pela pesquisa no posto de vacinação

Assinatura do responsável pela pesquisa no posto de vacinação

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Ensaio Clínico Randomizado Duplo-cego com duas Vacinas contra Febre Amarela das
Subcepas 17DD e 17D-213/77 em Crianças**

FIOCRUZ/Ministério da Saúde – Secretaria Municipal de Saúde

Pesquisador Responsável: Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho

Este documento complementa o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pela Sr.(a) para participação de seu (sua) filho(a) no estudo com a vacina contra febre amarela, conduzida pela FIOCRUZ em colaboração com a Secretaria de Saúde de Juiz de Fora. Por favor, leia as explicações abaixo e peça os esclarecimentos que quiser à equipe da pesquisa. Se preferir, consulte também outros médicos e pessoas de sua confiança antes de decidir sobre a participação.

Após a aplicação de vacinas uma pequena proporção de crianças pode não produzir quantidades detectáveis de anticorpos. Na maior parte dos casos, isso não indica anormalidade com a criança, e a aplicação de outra dose da vacina de modo geral é suficiente para assegurar proteção. Para os participantes do estudo com a vacina contra febre amarela em que foi indicada a aplicação da vacina que é usada de rotina no centro de saúde, um novo exame de sangue poderá confirmar a proteção pela vacina.

Nós pedimos sua colaboração no sentido de retornar à unidade de saúde 15 (quinze) dias após a vacinação para fazer um exame de sangue para medir os anticorpos. Os resultados dos exames de sangue feitos durante a pesquisa serão informados por escrito ao Sr.(Sra.) e serão usados no estudo com a vacina contra febre amarela.

Sua colaboração nesta pesquisa é muito importante mas é uma escolha somente sua, e não faz parte do atendimento ou das atividades na escola. Você pode se recusar a participar ou interromper sua participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem precisar dar explicações, e sem que isso o prejudique no trabalho, no atendimento ou em vacinações no futuro. Todas as informações sobre os participantes neste estudo são confidenciais. Não serão divulgados nomes dos participantes em nenhuma hipótese, e os resultados da pesquisa só serão apresentados em conjunto, sem revelar a identidade dos participantes. As amostras de sangue coletadas neste estudo serão utilizadas exclusivamente para os exames previstos neste projeto de pesquisa (anticorpos contra febre amarela).

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ.

Nos locais de vacinação haverá um responsável pelo estudo para esclarecer dúvidas e prestar um primeiro atendimento e providenciar o encaminhamento dos casos que precisem de atendimento médico. Em caso de dúvidas contactar com _____, telefones _____ (2ª a 6ª de 8h às 17 h) ou o Dr. Guilherme Côrtes, telefone 9112-8236, o Dr. Luiz Antonio B. Camacho , telefone 21 2598 2630, ou o Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ, telefone 21 2561 4815.

Declaro estar ciente das informações deste Termo de Consentimento, entendendo que poderei pedir esclarecimentos a qualquer tempo. Declaro dar meu consentimento para a participação de meu filho nesta pesquisa, estando ciente de que uma outra cópia deste termo permanecerá arquivada pelos organizadores da pesquisa.

Participante:

[Redacted name]

Endereço:

[Redacted address]

[Redacted day]

, 30 de

[Redacted month]

de 2007.

x [Redacted signature]

Assinatura do responsável

[Redacted signature]

Assinatura do responsável pela pesquisa no posto de vacinação

Anexo 3

Questionário

ANEXO III

**Ensaio Clínico Randomizado, Duplo-cego, com duas Vacinas contra Febre Amarela das
Subcepas 17DD e 17D-213/77 em Crianças**

QUESTIONÁRIO PRÉ-VACINAL

PREENCHER EM LETRA DE FORMA, POR FAVOR.

Neste questionário, as instruções para os entrevistadores estão em retângulos sombreados ou em letras pequenas, e NÃO devem ser lidas para os entrevistados.

Data da entrevista : ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ *Entrevistador:* _____
 dia mês ano

Local da entrevista: _____

1a. Número de identificação do participante nesta pesquisa

Cole aqui a etiqueta de identificação

1b. Data da coleta de sangue PRÉ-vacinal

___ ___ / ___ ___ / ___ ___

1c. Data da vacinação contra febre amarela nesta pesquisa

___ ___ / ___ ___ / ___ ___

1d. Data da coleta de sangue PÓS- vacinal

___ ___ / ___ ___ / ___ ___

2. Qual o nome completo da criança vacinada?

Nome e sobrenome do participante no estudo (sem abreviaturas)

3. Qual o nome completo da mãe da criança ?

Nome da mãe do participante, sem abreviatura

4. Com que nome a Sra. [mãe da criança] é conhecida no lugar onde mora ?

Apelido da mãe

5.a. Qual o endereço completo (para correspondência) ?

[Quadra, conjunto, rua, número da casa, apt.]

[Bairro, CEP]

[Ponto de referência]

5.b. Qual o telefone para contato?
(de casa, trabalho, vizinho, parente etc.)

Telefone para contato

6. Marcar com círculo o sexo da criança

Masculino 1

Feminino..... 2

7. Qual a idade da criança [do participante] ?

[ATENÇÃO: idade em meses em

crianças com menos de 2(dois) anos]

____ / ____
idade

8. Qual a data do nascimento da criança [do participante]?

___ ___ / ___ ___ / ___ ___
dia mês ano

Crianças com idade igual ou maior que 2 anos, saltar para item 11

Itens 9 e 10: apenas para crianças com menos de 2 anos de idade

7. Qual o peso da criança quando nasceu ?

[Ver no cartão da criança. Se não estiver disponível anotar informação da mãe]

 Peso em gramas

10. Qual o peso atual da criança ? [Ver no cartão da criança. Se não estiver disponível, pesar a criança]

 Peso em gramas

ANTECEDENTES VACINAIS E PATOLÓGICOS

Agora eu vou lhe fazer perguntas sobre a saúde da criança que são importantes para analisar os resultados desta vacina.

Peça para ver o Cartão de Vacinação da criança. Se o cartão estiver disponível, preencha os itens abaixo copiando do cartão. Se o cartão não estiver disponível, perguntar à mãe por cada uma das vacinas abaixo

11. a. Tomou BCG ?

Sim 1

[Verificar cicatriz vacinal]

Não 2

Indeterminado 9

Em caso afirmativo.

11. b. Fonte da informação

Cartão de Vacina 1

Informação da Mãe2

Outro (p.ex., prontuário) ... 3

Cicatriz vacinal 4

11. c. Data da vacinação (ou idade em que tomou a vacina)

[ou data da última aplicação, caso tenha tomado mais de uma vez]

___ ___ / ___ ___ / ___ ___

12. a. Tomou vacina contra pólio (paralisia infantil) ?

Sim 1

Não 2

Indeterminado 9

51

Grupo Colaborativo para Estudos com a Vacina contra Febre Amarela

Em caso afirmativo.

12. b. Fonte da informação

Cartão de Vacina 1
 Informação da Mãe2
 Outro (p.ex., prontuário) ... 3

12. c. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose)

___ ___ / ___ ___ / ___ ___

13. a. Tomou vacina DTP-Hib (Tetraivalente) ?

Sim 1
 Não 2
 Indeterminado 9

Em caso afirmativo.

13. b. Fonte da informação

Cartão de Vacina 1
 Informação da Mãe2
 Outro (p.ex., prontuário) ... 3

13. c. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose)

___ ___ / ___ ___ / ___ ___

14. a. Tomou vacina tríplice viral (sarampo, rubéola e caxumba) ?

Sim 1
 Não 2
 Indeterminado 9

Em caso afirmativo.

14. b. Fonte da informação

Cartão de Vacina 1
 Informação da Mãe2
 Outro (p.ex., prontuário) ... 3

14. c. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose)

___ ___ / ___ ___ / ___ ___

14.d. Vacina tríplice viral no mesmo dia em que a vacina contra febre amarela

Sim 1
 Não 2
 Indeterminado 9

15. a. Tomou alguma outra vacina ? Sim 1
[por exemplo, contra raiva, varicela etc.] Não 2
Indeterminado 9
- Em caso afirmativo,**
- Quais ?
- 15.b. _____ Cartão de Vacina 1
nome da outra vacina Informação da Mãe2
15. c. Fonte da informação Outro (p.ex., prontuário) ... 3
- 15.d. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose) ___ ___ / ___ ___ / ___ ___
- 15.e. _____ Cartão de Vacina 1
nome da outra vacina Informação da Mãe2
- 15.f. Fonte da informação Outro (p.ex., prontuário) ... 3
18. g. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose) ___ ___ / ___ ___ / ___ ___
- 15.h. _____ Cartão de Vacina 1
nome da outra vacina Informação da Mãe2
15. i. Fonte da informação Outro (p.ex., prontuário) ... 3
15. j. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose) ___ ___ / ___ ___ / ___ ___
16. A criança já tomou SORO anti-tetânico, anti-rábico, algum outro tipo de soro hiperimune ou transfusão de sangue? Sim 1
Não 2
Não sabe .. 9

Em caso afirmativo

Quais ?

16.b. _____
nome do soro

16.c. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose) _____ / _____ / _____

16.d. Motivo (diagnóstico) para aplicação do soro ou da transfusão _____

17. A criança está fazendo tratamento ou tem algum problema de saúde no momento ?

Sim 1

Não 2

Não sabe .. 9

Em caso afirmativo,

Quais ?

Há quanto tempo ?

Problemas de saúde atuais	Data de início	Remédios e outros tratamentos atualmente

18. A criança já esteve internada em hospital alguma vez na vida ? Sim 1

Não 2

Não sabe .. 9

**19. Qual o motivo da internação? Qual hospital ou enfermaria ?
Quando foi? Quanto tempo ficou internado ? [Preencher quadro abaixo]**

Problema que levou à internação	Hospital ou clínica onde foi internado	Mês e ano, ou idade na internação	Dias de internação
A			
B			
C			
D			

20. A criança tem ou já teve alergia a algum remédio, alimento ou a alguma outra coisa?

Sim 1

Não 2

Não sabe .. 9

Em caso afirmativo, fazer breve descrição que inclua os seguintes itens:

21. Quais os sinais e sintomas da alergia? Qual o remédio, alimento (alergia a ovo) ou substância que causou a alergia? Quando foi, a última vez que apresentou a alergia?

OBSERVAÇÕES (outros dados relevantes relacionados a saúde atual ou passada do participante.)

ANEXO III (CONT.) QUESTIONÁRIO PÓS-VACINAL

Data da entrevista: ____ / ____ / ____

Entrevistador: _____

Nós precisamos saber como a criança passou depois da vacina contra a febre amarela do dia *DD/MM*. [*relembrar o entrevistado do dia em que a vacina foi administrada*]

Eu vou perguntar sobre alguns sintomas mais comuns, mas se o Sr. se lembrar de algum outro problema, por favor me fale.

▷ Registre sinais, sintomas e problemas de saúde relevantes mesmo que não pareçam ter relação com a vacina.
Anote as características de cada sinal / sintoma na coluna correspondente

Sinal, sintoma ou problema de saúde	Quantos dias após a vacinação começou ?	Quanto tempo durou?	Qual a intensidade? [fraco, médio, forte]	Parou de brincar / Faltou à escola /Ficou de cama?	Procurou médico?	Qual o tratamento?
22. FEBRE <i>Indicar a temperatura na coluna “intensidade”?</i>						
23. VÔMITOS			(frequência)			
24. IRRITABILIDADE (criança) /						

Grupo Colaborativo Vacina Febre Amarela

Sinal, sintoma ou problema de saúde	Quantos dias após a vacinação começou ?	Quanto tempo durou?	Qual a intensidade? [fraco, médio, forte]	Parou de brincar / Faltou à escola /Ficou de cama?	Procurou médico?	Qual o tratamento?
25. DORES NO CORPO (Dores musculares generalizadas)						
26. DOR DE CABEÇA						
27. DOR NO LOCAL DA APLICAÇÃO da vacina contra febre amarela			(limitação funcional)			
28. Vermelhidão no local da aplicação da vacina contra febre amarela						

Grupo Colaborativo Vacina Febre Amarela

Sinal, sintoma ou problema de saúde	Quantos dias após a vacinação começou ?	Quanto tempo durou?	Qual a intensidade? [fraco, médio, forte]	Parou de brincar / Faltou à escola /Ficou de cama?	Procurou médico?	Qual o tratamento?
29. Outros problemas de saúde quaisquer **						
A. _____						
B. _____						
C. _____						

****Ex.:** desmaios, dores nas juntas etc.; ou atendimento médico por qualquer motivo; *Descrever abaixo cada um deles* na coluna correspondente.

Observações que não se incluíam nos itens acima: _____

30) A criança viajou para fora da cidade após a vacinação contra febre amarela?

Onde? _____

Quando? _____

Tempo de permanência: _____

31) A criança tomou alguma outra vacina depois da vacinação contra febre amarela?

Registre no quadro abaixo o nome da vacina, a fonte da informação (caderneta, prontuário, cicatriz etc.) e a data da aplicação

Nome da vacina recebida depois da vacina contra febre amarela.	Fonte da informação (cartão etc.) ou outros registros.	Data da aplicação (dia, mês e ano) ou tempo (dias) entre data da aplicação da vacina contra febre amarela e outra vacina

32) Qual das vacinas do estudo você acha que foi aplicada na criança?

Vacina da rotina (17DD) 1

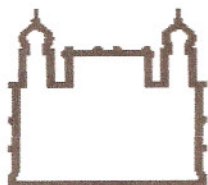
Vacina experimental (WHO/17DD) 2

Não sabe .. 9

Observações que não se incluam nos itens acima:

Anexo 4

Cartas de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
Comitê de Ética em Pesquisa



Rio de Janeiro, 02 de dezembro de 2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – CEP/ENSP, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo, discriminado:

PROTOCOLO DE PESQUISA CEP/ENSP - Nº 120/08
CAAE: 0148.0.031.000-08

Título do Projeto: “Imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela: Implicações para o Programa Nacional de Imunizações”

Classificação no Fluxograma: Grupo III

Pesquisador Responsável: Guilherme Cortes Fernandes

Orientador: Luiz Antonio Bastos Camacho

Instituição onde se realizará: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – ENSP/FIOCRUZ

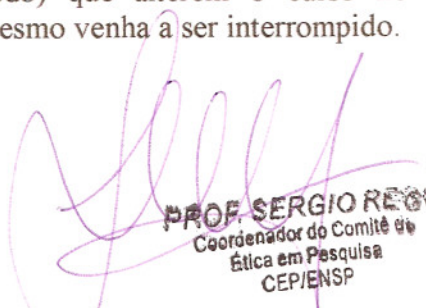
Data de recebimento no CEP-ENSP: 20 / 08 / 2008

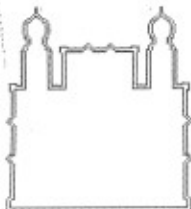
Data de apreciação: 03 / 09 / 2008

Parecer do CEP/ENSP: Aprovado

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII.13.d., da resolução CNS/MS Nº 196/96*) de acordo com o modelo disponível na página do CEP/ENSP na internet.

Esclarecemos, que o CEP/ENSP deverá ser informado de quaisquer fatos relevantes (incluindo mudanças de método) que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisadora justificar caso o mesmo venha a ser interrompido.


PROF. SERGIO REGO
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa
CEP/ENSP



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 16 de fevereiro de 2004.

Carta: 005/04


De: CEP/FIOCRUZ

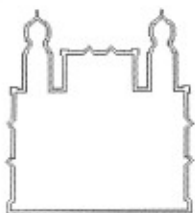
Para: - Dr. Luiz Antonio B. Camacho e
- Dr. Akira Homma

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **236A/03**, intitulado: **“Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com duas vacinas contra Febre Amarela das subcepas 17DD e 17D-213/77 em crianças e adolescentes”** que foi **APROVADO**.

Atenciosamente


CARLA DIAS NETTO
Secretária Geral
Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Oswaldo Cruz



Rio de Janeiro, 16 de fevereiro de 2004.

PARECER

Título do Projeto: **“Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com duas vacinas contra Febre Amarela das subcepas 17DD e 17D-213/77 em crianças e adolescentes”.**

Protocolo CEP: **236A/03**

Pesquisador Responsável: **Luiz Antonio Bastos Camacho**

Instituição: **ENSP**

Deliberação: **APROVADO**

Trata-se de ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, para testar a hipótese de diferença na imunogenicidade e reatogenicidade da vacina contra a febre amarela da subcepa 17DD (produto comercial, licenciado) e da vacina da subcepa OMS 17D-203/77 (produto experimental manufaturado a partir de lote-semente da Organização Mundial da Saúde) produzido em Bio-Manguinhos/Fiocruz. O estudo tem caráter multicêntrico e envolverá os Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais.

O estudo será realizado em unidades de saúde em que as vacinas contra febre amarela e triviral estejam incorporadas à rotina, e em escolas da rede pública de ensino, selecionadas com base no número esperado de indivíduos elegíveis (sem história de vacinação contra febre amarela, e que não apresentem contra indicações para esta vacina) e disponíveis para realização dos procedimentos previstos no protocolo.

Os sujeitos da pesquisa receberão uma das vacinas do estudo e submeter-se-ão a exames de sangue e a entrevistas antes e 45 dias após a vacinação. As vacinas que serão utilizadas no estudo são: 1) a vacina que atualmente é utilizada na rotina dos serviços de saúde, produzida a partir do Lote Semente Secundário 102 (passagem n° 287) da subcepa 17DD produzido em 2001 e utilizado na produção de todos os lotes de vacina desde 2002 e, 2) a vacina produzida a partir do lote semente oriundo da semente da OMS (17D-213/77), que será produzida em lote experimental apenas para uso na pesquisa (p.8 do Projeto)

Após a primeira entrevista, o participante será encaminhado para coleta de 6ml (4 ml em lactentes) de sangue por venopunção de veia do antebraço, para dosagem de anticorpos contra febre amarela, sarampo, rubéola (somente naqueles que receberam a vacina triviral) e dengue, sorotipos 1, 2 e 3. Uma segunda amostra de sangue será coletada no 45° dia pós-vacinação para dosagem dos mesmos anticorpos. Exames clínicos e laboratoriais adicionais poderão ser realizados para avaliação e acompanhamento de problemas de saúde ou anormalidades que o participante venha a apresentar no decorrer do estudo, e deverão ser registrados no questionário do participante.

Das mães de todas as crianças menores de 1 ano será solicitada uma amostra de sangue no dia da vacinação da criança, para dosagem de anticorpos da febre amarela.

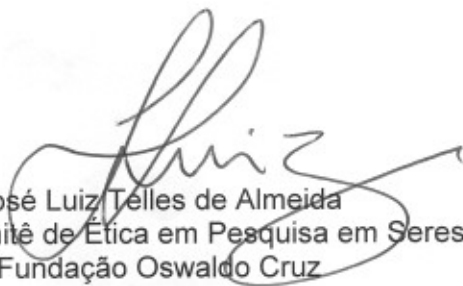
Os indivíduos elegíveis para vacinação e/ou seus responsáveis serão convidados a participar no estudo após serem informados dos seus objetivos e métodos por auxiliares de pesquisa treinados, e por um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os escolares e, se possível seus pais serão informadas sobre os objetivos do estudo em reuniões realizadas nas escolas com a anuência e participação dos professores. Somente serão incluídos no estudo os escolares que trouxerem termos de consentimento assinados pelo seu responsável.

Cabe destacar que somente após a verificação dos critérios de elegibilidade, realização da entrevista e coleta de sangue, será feita a alocação randômica dos indivíduos para um dos grupos de comparação (uma das vacinas). A randomização marca formalmente a entrada do indivíduo no estudo, e o grupo para o qual foi alocado não pode ser alterado em nenhuma hipótese.

Destaca-se também que o estudo não irá intervir na vacinação triviral, mas apenas registrar a data da sua aplicação. A análise da interação das vacinas contra febre amarela com a vacina triviral dependerá de número de voluntários elegíveis que se apresentarem espontaneamente, já que essa condição não pode ser manipulada experimentalmente, por questões éticas. As crianças cujos testes sorológicos não evidenciarem anticorpos contra febre amarela após 45 dias de vacinação (soronegativas) serão revacinadas e re-examinadas após 15 dias de forma a determinar o tipo de resposta – primária e anamnésica – à vacinação.

Em resposta enviada pelo pesquisador responsável às pendências suscitadas por este colegiado foi feita análise por este Comitê, e tendo por referência as diretrizes e normas da resolução CNS196/96, foi decidido pela **APROVAÇÃO** do referido protocolo.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais anuais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo de pesquisa, deve ser submetida.



Handwritten signature of José Luiz Telles de Almeida in black ink, featuring a large, stylized initial 'L' and 'A'.

José Luiz Telles de Almeida
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz

Anexo 5

Grupo Colaborativo de estudos com as vacinas contra febre amarela

Comitê Diretor: Luiz Antonio Bastos Camacho (Investigador Principal), Marcos da Silva Freire, Maria da Luz Fernandes Leal, Maria de Lourdes Souza Maia e Reinaldo Menezes Martins (FIOCRUZ).

Centros colaboradores e pesquisadores: Anna Maia Yamamoto Yoshida (Laboratório de Tecnologias Virais - FIOCRUZ), Helena Keico Sato (Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo), Guilherme Côrtes Fernandes (Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora-MG), Ivone Perez de Castro (Secretaria de Saúde de Brasília-DF), Jandira Campos Lemos (Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais) e Eugenio Martins Barros (Secretaria de Saúde de Campo Grande-MS).

Colaboradores: Takumi Igushi (FIOCRUZ), Márcia Borges Leitão (Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais), Maristela Batista (Secretaria Municipal de Saúde de Juiz de Fora-MG), Maria da Conceição Barros (Secretaria de Saúde de Campo Grande-MS) e Elisabete Paganini (Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo), Marileide Nascimento (FIOCRUZ) e Nilce da Silva (FIOCRUZ).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)