

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

Tatiana Guimarães de Noronha

**Duração da imunidade pós-vacinação contra febre amarela em crianças: estudo complementar sobre imunidade humoral**

Rio de Janeiro

2016

Tatiana Guimarães de Noronha

**Duração da imunidade pós-vacinação contra febre amarela em crianças: estudo complementar sobre imunidade humoral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública do Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador(a): Luiz Antônio Bastos Camacho

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

N852d Noronha, Tatiana Guimarães de  
Duração da imunidade pós-vacinação contra febre amarela em  
crianças: estudo complementar sobre imunidade humoral. /  
Tatiana Guimarães de Noronha. -- 2016.  
159 f. : tab. ; mapas; graf.

Orientador: Luiz Antonio Bastos Camacho.  
Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio  
Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1. Febre Amarela – prevenção & controle. 2. Vacina contra  
Febre Amarela. 3. Febre Amarela – etiologia. 4. Febre Amarela –  
transmissão. 5. Febre Amarela – diagnóstico. 6. Febre Amarela –  
epidemiologia. 7. Febre Amarela – transmissão. 8. Imunidade  
Humoral. 9. Criança. I. Título.

CDD – 22.ed. – 614.541

Tatiana Guimarães de Noronha

**Duração da imunidade pós-vacinação contra febre amarela em crianças: estudo complementar sobre imunidade humoral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública do Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 29 de março de 2016

Banca Examinadora

Dr. Pedro Luiz Tauil  
Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Guilherme Côrtes Fernandes  
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Dra. Paula Mendes Luz  
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/FIOCRUZ

Dr. Akira Homma  
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP)/FIOCRUZ

Dr. Marcos da Silva Freire  
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Dr. Sérgio Javier Bedoya Pacheco  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP)/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2016

Aos meus amados avós, Doca e Josefina, *in memoriam*, por terem primado pela educação de filhos e netos, mesmo diante de todas as adversidades.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos Irmãos de Luz por estarem sempre ao meu lado, me guiando, orientando e iluminado meus caminhos para que possa cumprir a minha missão.

Aos meus pais, Anna Maria e Ubiratan, que sempre priorizaram a nossa educação, desde a mais tenra infância. E a minha irmã Anna Paula, parceira de todos os momentos.

Ao Gustavo, companheiro de uma vida, pelo seu amor, companheirismo, concessões e apoio em todos os momentos.

A nossa filha Gabriela, razão do meu viver, muito obrigada pela sua existência, por fazer tudo ter sentido para mim e ser essa menina tão doce e compreensiva. Você está e sempre estará em primeiro lugar.

A Bio-Manguinhos/Fiocruz, instituição que me acolheu há 12 anos e me introduziu na área de saúde pública, pesquisa clínica e vacinologia, as quais se transformaram em grandes paixões da minha vida profissional.

À Dra. Maria de Lourdes de Sousa Maia e aos colegas da Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz, que me apoiaram incondicionalmente e supriram minha ausência nos momentos de dedicação ao Doutorado.

Aos Drs. Olindo Assis Martins-Filho, Ana Carolina Campi Azevedo e demais colegas do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz pela parceria e apoio na conclusão da minha tese.

A Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima e colegas do Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos, o meu muito obrigada pelo empenho na realização dos ensaios sorológicos que permitiram as análises deste estudo.

Ao meu orientador Professor Doutor Luiz Antonio Bastos Camacho, exemplo de profissional e de ser humano, não só pela sua atuação precisa, atenciosa e dedicada como orientador de Mestrado e Doutorado, mas também como orientador de toda uma vida profissional.

Enfim, a todos, o meu profundo agradecimento por não me permitirem sequer cogitar em deistir, cada um ao seu modo, mesmo quando os os maiores obstáculos, alguns aparentemente intransponíveis, teimavam em surgir. Serei eternamente grata...

*“Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”.*

Cora Coralina

## RESUMO

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa febril aguda, cujo agente etiológico é um Arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, transmitido principalmente por mosquitos dos gêneros *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes*. Em função da sua gravidade clínica e potencial de disseminação, é objeto do Regulamento Sanitário Internacional. A vacinação é a medida mais importante para prevenção e controle da doença no homem. É indicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para aplicação em moradores de áreas endêmicas, idealmente, nos calendários rotineiros de vacinação das crianças entre 9 e 12 meses de idade, além de campanhas de imunização em massa e vacinação de viajantes para áreas de risco com idade mínima de 9 meses. Até 2013, estavam indicadas doses de reforço dessa vacina a cada 10 anos, mas a OMS retirou essa recomendação, indicando dose única como suficiente para proteção a longo prazo. O presente estudo justifica-se pela necessidade de avaliar a duração da imunidade após a primovacinação contra febre amarela em crianças. Em função dos questionamentos a respeito dessa decisão e dos resultados de um estudo de duração da imunidade em adultos realizado no Brasil, identificou-se a necessidade de avaliar a duração da imunidade para febre amarela em crianças de 9 meses a 12 anos primovacinadas nos dois primeiros anos de vida, objetivo do presente estudo. Foi realizada análise da frequência do *status* sorológico (negativo, indeterminado e positivo), média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes contra febre amarela obtidos pelo método de PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*), estratificadas por categoria de tempo após a vacinação contra febre amarela, e razão de chances (OR) para soropositividade. A categoria de referência foi a composta por indivíduos com período pós-vacinal de 0 a 6 meses. Observou-se uma redução na proporção de soropositividade (SP), média geométrica de títulos de anticorpos e OR, a medida que aumenta o tempo pós-vacinação, com destaque para a queda mais acentuada a partir dos 31 meses pós-vacinação. Na categoria de 31 a 72 meses pós-vacinação (mediana de 51 meses ou 4,25 anos), a proporção de SP foi de 59% com OR para soropositividade de 0,22 (IC95%: 0,13; 0,39). Esses dados reforçam não só a necessidade de revacinação das crianças residentes em área de risco para febre amarela, primovacinadas nos dois primeiros anos de vida, como também indicam a necessidade de revacinação em um intervalo inferior aos 10 anos anteriormente recomendados pela OMS, idealmente, até 4 anos após a dose inicial.

Palavras-chave: vacina contra febre amarela; duração da imunidade em crianças.

## ABSTRACT

Yellow fever (YF) is an acute febrile infectious disease caused by an arbovirus belonging to the genus flavivirus, transmitted by mosquitoes such as *Haemagogus*, *Sabethes* and *Aedes*. Because of its clinical severity and potential for spread, it is subject of the International Health Regulations. Vaccination is the most important measure for prevention and control of disease in humans. It is indicated by World Health Organization (WHO) for use in residents of endemic areas, ideally in the routine schedules of children vaccination between 9 and 12 months of age, for immunization mass campaigns and vaccination of travelers moving to risk areas from 9 years of age. Until 2013, booster doses were given every 10 years, however, the WHO removed this recommendation, indicating a single dose as sufficient for long-term protection. This study is justified by the need to assess the duration of immunity after primary vaccination against yellow fever in children. Considering the discussion about this decision and the results of a study regarding duration of immunity in adults, held in Brazil, we identified the need to assess the duration of immunity to yellow fever in children aged 9 months to 12 years who received the first dose during the first two years of life, which is the purpose of this study. The frequency of serologic status (negative, indeterminate and positive), geometric mean titers of neutralizing antibodies against yellow fever obtained by PRNT method (Plaque Reduction Neutralization Test), stratified by category of time after yellow fever vaccination, and odds ratio (OR) for seropositivity were calculated. The reference category was composed by individuals with post-vaccine period of 0-6 months. There was a reduction in the proportion of seropositivity (SP), geometric mean antibody titers and OR, as there was an increase in the post-vaccination time, with more accentuated decline from 31 months after vaccination. At the "31-72 post-vaccination months group" (median 51 months or 4.25 years), the proportion of SP was 59% and the OR for seropositivity was 0.22 (95% CI: 0.13, 0.39). These data reinforce the need for revaccination of children living in risk areas for yellow fever, primarily vaccinated for yellow fever in the first two years of life, in a lower range than 10 years (which was previously recommended by WHO), suggesting a booster dose 4 years following the first dose as an ideal schedule.

Keywords: Yellow fever vaccine; duration of immunity in children.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Figura 1: Ciclos de transmissão do vírus de febre amarela .....	17
Figura 2: Distribuição das formas clínicas de febre amarela. ....	18
Figura 3: Áreas de risco de transmissão de febre amarela no Mundo. ....	21
Figura 4: Série histórica de casos humanos confirmados de febre amarela e taxas de letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, 1980-2015. ....	23
Quadro 1: Classificação das áreas de risco de transmissão de febre amarela e estratégias de controle da doença.....	26
Figura 5: Brasil – Áreas de recomendação de vacina contra Febre Amarela, Brasil, 2014.....	27
Figura 6: Valores médios e intervalos de confiança de 95% para os títulos de anticorpos neutralizantes (log <sub>10</sub> mUI/mL) contra febre amarela de acordo com tempo desde a vacinação e a idade. ....	48
Figura 7: Distribuição dos títulos de anticorpos (miliunidades internacionais por mL) segundo categorias de tempo de vacinação contra febre amarela.....	49
Figura 8: Títulos de anticorpos (logaritmo na base 10 dos títulos em miliunidades internacionais por mL) contra febre amarela, segundo tempo de vacinação. ....	50
Figura 9: Idade em meses dos participantes de pesquisa elegíveis no momento da inclusão no estudo e coleta de sangue para avaliação de imunogenicidade. ....	69
Figura 10: Idade em meses dos participantes de pesquisa elegíveis no momento da vacinação contra febre amarela.....	70
Figura 11: Distribuição dos títulos de anticorpos (log <sub>10</sub> da recíproca da diluição do PRNT), por tempo após a vacinação.....	76
Linha vertical pontilhada representa limite de soropositividade. ....	77
Figura 12: Distribuição dos títulos de anticorpos (log <sub>10</sub> da recíproca da diluição do PRNT), nos tempos pré-vacinal e 30-45 dias após vacinação, observado no Estudo Complementar I - .....	77
Figura 13: Diagrama de dispersão dos títulos de anticorpos contra febre amarela (log <sub>10</sub> ) e o tempo após a vacinação.....	80
Quadro 2: Dicionário de variáveis para os modelos de regressão linear múltipla.....	145
Figura 14: Análise de resíduos do Modelo 2 .....	146
Figura 15: Distribuição dos resíduos - Modelo 2.....	147

Figura 16: Distribuição da variável resposta em log 10. ....	147
Figura 17: Distribuição de Resíduos – Modelo 3 .....	148
Figura 18: Histograma de Resíduos - Modelo 3 .....	149
Figura 19: Distribuição de Resíduos – Modelo 4 .....	150
Figura 20: Histograma de Resíduos - Modelo 4 .....	151
Figura 21: Distribuição de Resíduos - Modelo 6 .....	153
Figura 22: Histograma de Resíduos - Modelo 6 .....	154
Quadro 3: Dicionário de variáveis para os modelos de regressão logística.....	155

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxas de soroconversão de acordo com a concentração de vírus na vacina contra febre amarela - Estudo de dose-resposta da vacina contra febre amarela 17-DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz.....	39
Tabela 2: Título de anticorpos neutralizantes determinados pelo método de neutralização por redução de placa, de acordo com o tempo desde a vacinação.....	47
Tabela 3: Títulos geométricos médios de anticorpos e seus intervalos de confiança de 95% (mUI/mL).....	47
Tabela 4: Média e intervalo de 95% de confiança dos títulos de anticorpos (miliunidades internacionais por mL) e proporção de soropositividade, por tempo de vacinação contra febre amarela.....	50
Tabela 5: Descrição das variáveis do estudo. ....	63
Tabela 6: Distribuição dos voluntários por unidade de saúde de recrutamento – Estudo Matriz.....	67
Tabela 7: Idade dos participantes de pesquisa no momento da inclusão, segundo adesão ao protocolo do estudo. ....	68
Tabela 8: Idade dos participantes de pesquisa no dia da vacinação contra febre amarela, segundo adesão ao protocolo do estudo.....	69
Tabela 9: Distribuição dos participantes de pesquisa quanto ao gênero.....	71
Tabela 10: Distribuição dos participantes de pesquisa pelos grupos de tempo desde a vacinação contra febre amarela, de acordo com o previsto no protocolo do Estudo Matriz e o observado na análise.....	72
Tabela 11: Estado sorológico aferido pelo título de anticorpos neutralizantes (PRNT), de acordo com o tempo desde a vacinação.....	74
Tabela 12: Estado sorológico no período pós-vacinação imediato, aferido pelo título de anticorpos neutralizantes (PRNT).....	74
Tabela 13: Títulos geométricos médios de anticorpos e seus intervalos de confiança de 95%, em recíproca da diluição, segundo o tempo após a vacinação, na coorte que aderiu ao protocolo do estudo. ....	75
Tabela 14: Soropositividade e título médio geométrico, por categoria de tempo após a vacinação – Resumo Imunogenicidade - Estudo Matriz.....	78

Tabela 15: Soropositividade e título médio geométrico cerca de 30 a 45 dias após a vacinação, em crianças vacinadas entre 9 e 23 meses de idade – Estudo Complementar I. ....	79
Tabela 16: Coeficientes de regressão observados no modelo final da regressão linear múltipla. ....	81
Tabela 17: Razão de Chances (Odds Ratio – OR) brutas para a variável explicativa e todas as covariáveis estudadas - categóricas (A) e contínuas (B). ....	82
Tabela 18: Razão de Chances (Odds Ratio – OR) variável explicativa incluída no modelo final. ....	83
Tabela 19: Distribuição por idade de todos os participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo. ....	141
Tabela 20: Distribuição por gênero de todos os participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo. ....	141
Tabela 21: Distribuição dos participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo, segundo informação de viagem para outras áreas de risco para febre amarela. ....	141
Tabela 22: Distribuição dos participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo, segundo tempo após vacinação contra febre amarela em meses. ....	142
Tabela 23: Distribuição dos participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo, segundo categorias de tempo desde a vacinação contra febre amarela. ....	142
Tabela 24: Status sorológicos dos participantes de pesquisa por tempo desde a vacinação contra febre amarela, incluindo aqueles sem informação por indisponibilidade de material biológico para análise do presente estudo (“Teste não realizado”). ....	142

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRV	Áreas com Recomendação de Vacina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASRV	Áreas sem Recomendação de Vacina
CPQRR	Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ESPIN	Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional
FA	Febre Amarela
FAS	Febre Amarela Silvestre
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulina da Classe G
IgM	Imunoglobulina da Classe M
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz.
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNH	Primatas Não Humanos
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
RSI-2005	Regulamento Sanitário Internacional, 2005
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, Brasil
TGM	Título Geométrico Médio
UI	Unidades Internacionais
VFA	Vacina contra Febre Amarela
VFA-17D	Vacina contra Febre Amarela obtida a partir da cepa viral 17D
VFA-17D	Vacina contra Febre Amarela obtida a partir da cepa viral 17DD

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	51
2.1. OBJETIVO GERAL.....	51
2.2. OBJETIVO PRIMÁRIO.....	51
2.3. OBJETIVO SECUNDÁRIO.....	51
3. MÉTODO.....	52
3.1. DELINEAMENTO GERAL.....	52
3.2. POPULAÇÃO-ALVO.....	53
3.3. TAMANHO AMOSTRAL.....	54
3.4. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO.....	55
3.4.1. <b>Recrutamento</b> .....	55
3.4.2. <b>Inclusão</b> .....	55
3.4.3. <b>Coleta de dados</b> .....	55
3.4.4. <b>Coleta e processamento das amostras de sangue</b> .....	56
3.4.5. <b>Protocolo de remoção de heparina das amostras de plasma</b> .....	58
3.4.6. <b>Teste Laboratorial – PRNT</b> .....	60
3.5. ANÁLISE DOS DADOS.....	62
3.6. ASPECTOS ÉTICOS.....	65
4. RESULTADOS.....	66
4.1. DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES DE PESQUISA POR UNIDADES DE SAÚDE.....	67
4.2. DADOS DEMOGRÁFICOS.....	68
4.2.1. <b>Idade</b> .....	68
4.2.2. <b>Gênero</b> .....	70
4.3. INTERVALO DE TEMPO ENTRE A VACINAÇÃO CONTRA FEBRE AMARELA E A COLETA DE SANGUE PARA AVALIAÇÃO DE IMUNOGENICIDADE.....	71
4.4. ANÁLISE DA IMUNIDADE HUMORAL - PRNT.....	73
4.4.1. <b>Proporção de soropositividade segundo tempo após a vacinação contra febre amarela</b> .....	73

4.4.2. Médias geométricas dos títulos de anticorpos segundo tempo de vacinação.....	75
4.4.3. Resumo da imunidade humoral segundo tempo após a vacinação .....	78
4.4.4. Análise Multivariada .....	79
4.5. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE IMUNIDADE HUMORAL E IMUNIDADE CELULAR .....	83
5. DISCUSSÃO.....	83
6. CONCLUSÃO .....	88
7. REFERÊNCIAS:.....	88
ANEXO 1 .....	97
ANEXO 2 .....	100
ANEXO 3 .....	103
ANEXO 4 .....	110
ANEXO 5 .....	121
ANEXO 6 .....	123
ANEXO 7 .....	130
ANEXO 8 .....	135
APÊNDICE 1.....	140
APÊNDICE 2.....	143

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Febre Amarela

### 1.1.1. Etiologia e Transmissão

A febre amarela é uma doença infecciosa febril aguda, que tem como agente etiológico um *Arbovírus*, pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, transmitido por insetos hematófagos da família *Culicidae*, em especial dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* (Vasconcelos, 2003).

Os arbovírus são mantidos na natureza em um ciclo de transmissão entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos, como mosquitos e carrapatos por exemplo. Esses vírus multiplicam-se e induzem viremia nos hospedeiros vertebrados, e replicam-se nos tecidos de artrópodes, os quais se alimentam dos vertebrados infectados. Após um período de incubação extrínseca, são passados para novos hospedeiros vertebrados através da picada do artrópode (Simões et al, 2012).

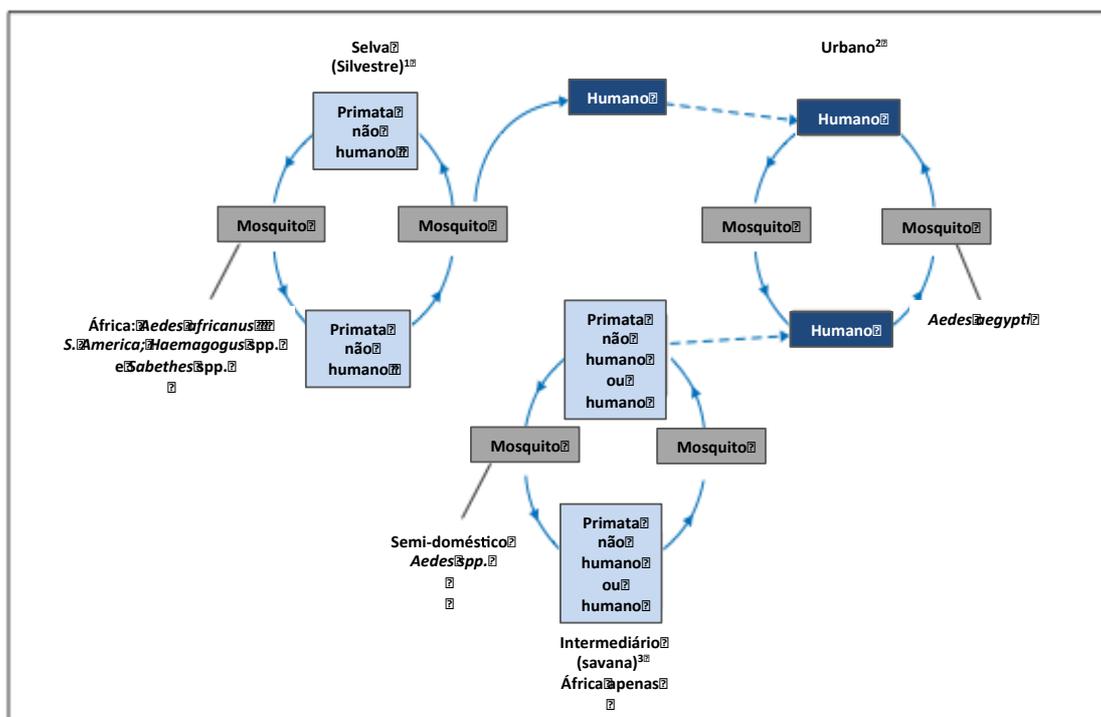
Para o vírus da febre amarela, classicamente são descritos dois ciclos de transmissão distintos, um silvestre e outro urbano. No ciclo silvestre, os primatas não humanos são os principais hospedeiros do vírus da febre amarela, a transmissão ocorre a partir de vetores silvestres e o homem participa como um hospedeiro acidental. No ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica e a transmissão dá-se a partir de vetores urbanos infectados, principalmente, o *Aedes aegypti* (Monath, 1995). Com o avanço do homem para áreas de floresta, seja por atividades ocupacionais ou por lazer, um terceiro ciclo de transmissão, intermediário, é descrito na África - Figura 01 (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; World Health Organization, 2013b).

(i) Ciclo Silvestre: a doença acomete geralmente primatas não humanos e a transmissão ocorre a partir de várias espécies de mosquitos dos gêneros *Haemagogu*, *Sabethes* e *Aedes*, encontrados nas áreas de floresta da América e da África. A transmissão aos humanos é eventual, através da picada de mosquitos que se alimentaram de primatas não-humanos durante o período de viremia. Tem sido o ciclo de transmissão de quase todos os casos nas Américas em décadas recentes, onde a maioria (70 a 90%) dos humanos infectados são

adultos jovens do sexo masculino, exercendo atividades ocupacionais na floresta ou nas áreas ao seu redor.

(ii) Ciclo Intermediário: é visto somente em regiões úmidas da África, onde as espécies de *Aedes* são capazes de se reproduzir tanto na selva quanto ao redor de domicílios e de infectar tanto os primatas não humanos quanto os humanos. Esse tipo de transmissão geralmente resulta em casos esporádicos que ocorrem simultaneamente em diferentes vilas da mesma região, mas grandes surtos da doença também podem ocorrer.

(iii) Ciclo Urbano: ocorre quando pessoas infectadas se deslocam para áreas densamente povoadas, nas quais a população local tem pouca ou nenhuma proteção contra febre amarela e o *A. aegypti* circula ativamente. Dessa forma, mosquitos infectados transmitem a doença de pessoa a pessoa, o que resulta em grandes epidemias.



<sup>1</sup> O ciclo selvagem (silvestre) de transmissão envolve a transmissão do vírus entre primatas não humanos e espécies de mosquitos localizados na área de floresta. O vírus é transmitido ao ser humano pelos mosquitos, a partir de primatas não humanos, quando os humanos entram na selva durante atividades ocupacionais ou de recreação.

<sup>2</sup> O ciclo de transmissão urbana envolve a transmissão do vírus entre humanos e mosquitos urbanos, principalmente *Ae. Aegypti*. Humanos virêmicos viajando de uma região para outra pode servir como alimento e fonte de infecção para mosquitos em outros ciclos de transmissão (linha pontilhada).

<sup>3</sup> Na África, um ciclo intermediário (savana) envolve a transmissão do vírus de febre amarela de mosquitos criados nas copas das árvores para humanos residindo ou trabalhando em áreas de fronteira da selva. Nesse ciclo, o vírus pode ser transmitido de primatas não humanos para humanos ou de humanos para humanos a partir desses mosquitos.

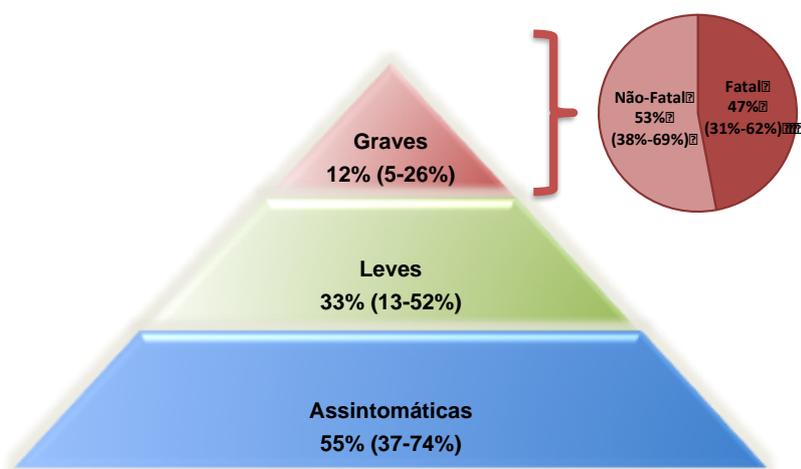
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2010. Traduzido.

**Figura 1:** Ciclos de transmissão do vírus de febre amarela

### 1.1.2. Manifestações Clínicas

A febre amarela é uma doença de curta duração, com período de incubação médio de 3 a 6 dias, podendo chegar até 10 dias. Possui variabilidade de apresentação clínica, apresentando-se de maneira assintomática, oligossintomática, moderada ou grave. As formas fulminantes da doença, caracterizadas por icterícia, albuminúria e hemorragias, são as formas clássicas e correspondem a cerca de 10% dos casos (Figura 2). A grande maioria – cerca de 90% dos casos de febre amarela – caracteriza-se pelas formas leves e assintomáticas, de difícil diagnóstico, portanto, subnotificadas (Johansson et al, 2014). Essas formas são mais frequentes em crianças de baixa idade cujas mães vacinadas transmitiram anticorpos do tipo IgG por via transplacentária e em indígenas, que além dos anticorpos maternos, adquirem imunidade ao longo da sua vida, e são raramente diagnosticadas, exceto em vigência de epidemias (Vasconcelos, 2003).

Estima-se que 9 casos (IC 95% de 1 a 70) de infecção assintomática ou leve são esperados para cada caso de doença grave a cada novo surto, da mesma forma que são esperados 21 casos de infecção (IC 95% de 3 a 239), dos quais 12 seriam casos assintomáticos e 8 casos de infecção leve. Dessa forma, a partir do conhecimento do número de casos graves da doença, de mais fácil diagnóstico e notificação, é possível estimar o número de casos de infecção em determinado surto, com um maior conhecimento do potencial de disseminação de infecção e carga de doença, permitindo a adoção de medidas de controle da infecção e assistência à saúde (Johansson et al, 2014).



Fonte: Vasconcelos, 2003; Johansson et al, 2014.

**Figura 2:** Distribuição das formas clínicas de febre amarela.

Não há tratamento específico para essa doença e, em função da sua elevada eficácia, a vacina contra febre amarela é considerada a medida mais importante para prevenção e controle da doença no homem (Monath, 1995).

### **1.1.3. Diagnóstico de Febre Amarela**

Além das manifestações clínicas e história epidemiológica, que levam à suspeição da doença, existem exames laboratoriais que podem confirmar o diagnóstico, pois a infecção pelo vírus da FA é seguida por uma rápida resposta imune específica. Anticorpos neutralizantes, anticorpos citolíticos contra proteínas virais na superfície de células infectadas e células T citotóxicas são presumidas para mediar a remoção de infecção primária. Entretanto, existem poucos dados conhecidos dessa resposta imunológica à infecção pelo vírus selvagem, exceto para a resposta humoral, que é caracterizada pelo aparecimento de IgM durante a primeira semana da doença - pico na segunda semana e rápido declínio em 30 a 60 dias - e pelos anticorpos com atividade biológica, como os inibidores da hemaglutinação e os neutralizantes, que aparecem rapidamente, em geral até o quinto dia da doença. Entre os testes sorológicos disponíveis para a avaliação da resposta imune específica, os testes de neutralização são considerados os mais sensíveis e específicos, com acurácia superior à observada para o ELISA e testes de inibição da hemaglutinação.

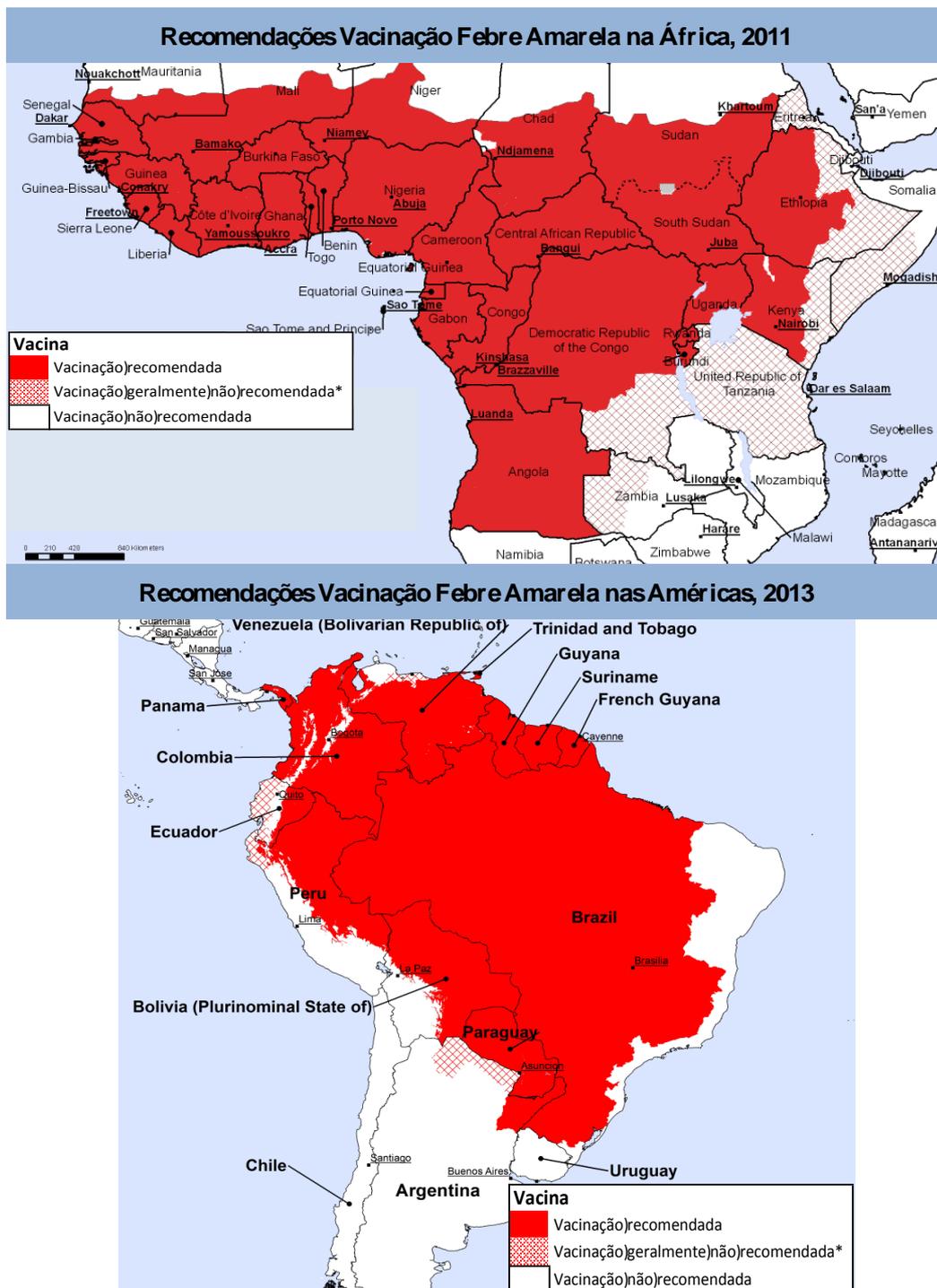
O diagnóstico laboratorial específico da febre amarela é feito pela detecção do vírus, do RNA viral ou de antígenos virais no sangue ou em outros tecidos, e pela sorologia. O isolamento viral em geral ocorre durante os primeiros 4 dias após o início dos sintomas, porém, há relato de isolamento mais tardio, como 12 dias ou mais. Atualmente, o RT-PCR é mais comumente usado do que o isolamento viral para o diagnóstico de FA na fase aguda, em função da sua mais rápida execução e maior sensibilidade. Um diagnóstico rápido e precoce também é possível pela aferição dos antígenos virais da FA no soro por imunoensaio, entretanto, a sensibilidade desse método para detecção do vírus no soro é menor que a do RT-PCR. Em relação à sorologia, a detecção dos anticorpos IgM numa única amostra permite o diagnóstico presuntivo, mas a confirmação é feita pelo teste de neutralização, que pode detectar um aumento nos títulos específicos para o vírus entre as amostras pareadas de fase aguda e de convalescência. A especificidade do ELISA IgM é alta na infecção primária e em muitos casos da infecção secundária, entretanto, reações cruzadas com outros flavivírus podem ocorrer (Monath et al, 2013).

#### 1.1.4. Epidemiologia da Febre Amarela

A febre amarela é endêmica em 44 países das regiões tropicais da África e Américas, mas pode apresentar-se também intermitente e epidêmica. Mais de 90% dos casos e mortes relatados ocorrem na África Sub-Saara (Figura 3). A distribuição dos casos por sexo, idade e ocupação varia entre os países da África e da América, refletindo diferentes níveis de intensidade de transmissão. Em regiões africanas endêmicas, a imunidade natural é adquirida ao longo da vida, portanto, as crianças representam o grupo de maior suscetibilidade à doença (World Health Organization, 2013b; Centers for Disease Control and Prevention 2010).

Nas Américas (do Sul e Central), onde é endêmica em 13 países (Figura 3), a sua incidência é sazonal e está relacionada a elevados níveis de pluviosidade, umidade e temperatura, sendo mais frequentes em homens jovens, não vacinados, que frequentam áreas de florestas por atividades ocupacionais. Apenas casos esporádicos e pequenos surtos são relatados nessas regiões, entretanto, grandes centros urbanos encontram-se infestados pelo *A. aegypti*, o que torna parcela considerável da população vulnerável à febre amarela se elevadas coberturas vacinais não forem atingidas. Por essa razão, o atual período pode ser considerado como o de maior risco para a ocorrência de epidemias urbanas na América do Sul e Central dos últimos 50 anos (World Health Organization, 2013b).

Em função do seu elevado potencial de disseminação, da gravidade clínica da doença, com taxa de letalidade em torno de 50% entre os casos graves, e do risco de reurbanização da sua transmissão, a febre amarela possui grande importância epidemiológica. Apresenta relevante impacto em saúde pública na África e nas Américas (Ministério da Saúde, 2014a) e, por isso, é de relato imediato à OMS, segundo o Regulamento Sanitário Internacional (World Health Organization, 2005).



\*Vacinação contra febre amarela (FA) geralmente não é recomendada em áreas onde há baixo risco potencial de exposição ao vírus FA. Entretanto, vacinação deve ser considerada para uma pequena parcela de viajantes para essas áreas, os quais estarão sobre elevado risco de exposição ao vírus da FA em função de viagens prolongadas, exposição intensa a mosquitos ou incapacidade em evitar picadas de mosquitos. Considerações sobre vacinação de qualquer viajante deve levar em conta o seu risco de ser infectado pelo vírus da FA, requerimentos para a entrada nos países e riscos individuais para a ocorrência de eventos adversos associados à vacina (EX. idade, estado imune).

Fonte: [http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/ITH\\_YF\\_vaccination\\_america.png](http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/ITH_YF_vaccination_america.png). Acesso em 14 de outubro de 2014. Traduzido.

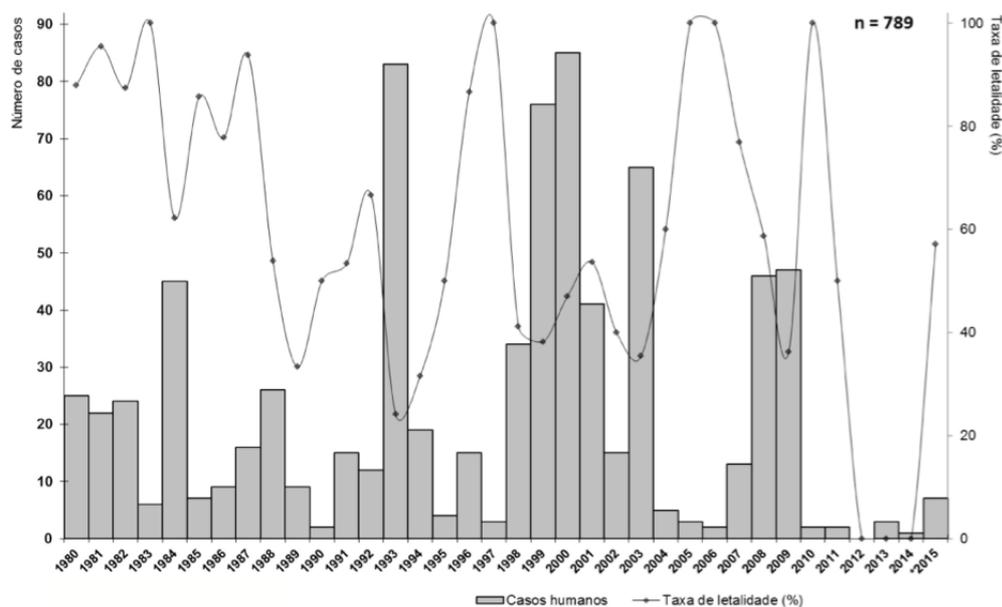
**Figura 3:** Áreas de risco de transmissão de febre amarela no Mundo.

No Brasil, é uma doença de notificação compulsória imediata em todo o território nacional. Tem ocorrido esporadicamente, com registros de casos humanos isolados nas áreas consideradas endêmicas (regiões norte e centro-oeste), assim como na forma de surtos de maior ou menor magnitude na região fora da Amazônia (Ministério da Saúde, 2014a).

Além da vigilância de casos humanos, o Ministério da Saúde adota desde de 1999 a vigilância de epizootias em primatas não humanos como estratégia de detecção precoce da circulação viral. Todos os casos humanos e epizootias em primatas não humanos (PNH) suspeitos são notificados e investigados em até 24 horas, visando identificar as áreas de circulação viral, as populações sob risco e as áreas prioritárias para aplicação de medidas de prevenção e controle. Dessa forma, a morte ou o adoecimento de PNH constituem eventos de alerta para o risco de transmissão do vírus às populações humanas, favorecendo a resposta oportuna dos serviços de saúde e reduzindo os efeitos da transmissão e a ocorrência de casos humanos (Ministério da Saúde, 2014a).

A ocorrência anual de febre amarela, medida pelo número de notificações é variável. A série histórica da febre amarela no Brasil (Figura 4) mostra um padrão irregular de incidência anual, com períodos de reemergência do vírus, quando é registrada maior frequência de casos. De tempos em tempos, a doença manifesta-se de forma epidêmica no país, com ocorrência de surtos de magnitude variável, sobretudo fora da área endêmica. Apesar de os fatores relacionados à reemergência e à dispersão do vírus serem pouco compreendidos, a ocorrência de períodos epidêmicos é esperada, e a detecção precoce da atividade viral é essencial para a mitigação dos danos nas populações humanas (Ministério da Saúde, 2015).

No período de 1980 e 2008, foram confirmados 726 casos humanos de FA, com uma letalidade média de 52,8%, chegando, porém, a cerca de 100% em certos períodos (Figura 4), sugerindo fortemente um viés de detecção de casos graves. Todos os estados da região Norte registraram casos no período, mesmo que esporádicos, e essa região foi responsável por 35,8% das notificações do país, seguida pelas regiões Centro-Oeste (30,2%), Sudeste (18%), Nordeste (15%) e Sul (1%) (Ministério da Saúde, 2009).



Fonte: Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Dados provisórios até semana epidemiológica - 33/2015

**Figura 4:** Série histórica de casos humanos confirmados de febre amarela e taxas de letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, 1980-2015.

No ano de 2008, foi detectada uma reemergência do vírus da febre amarela nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, o que levou a uma intensificação das ações de vigilância e monitoramento da febre amarela. Para acompanhar as áreas de ocorrência e dispersão do vírus no Brasil, o Sistema Nacional de Vigilância e Controle da Febre Amarela passou a monitorar os casos humanos suspeitos e as epizootias de primatas não humanos também durante todo o período que antecede o período conhecido sazonal de transmissão no Brasil - dezembro a maio, estendendo-se até pelo menos oito semanas consecutivas sem registro de evidências de transmissão na área atingida. Com isso, esperava-se aumentar a oportunidade das ações do serviço de saúde pública, ampliando o alerta para a recomendação da vacina às populações sob risco.

Naquele período de intensificação da vigilância e monitoramento nos anos de 2008 e 2009, foram notificados 274 casos humanos suspeitos de febre amarela silvestre, com confirmação de 18,6% dos casos (51) e taxa de letalidade de 41,2% (21 óbitos). A mediana de idade dos casos foi de 31 anos, com variação entre 8 dias de vida e 73 anos, e predomínio do sexo masculino (72%). A expansão da área de ocorrência observada no Rio Grande do Sul atingiu áreas que extrapolaram aquelas classificadas como de risco, caracterizando uma

Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), baseado no Regulamento Sanitário Internacional, 2005. Em fevereiro de 2009, foi registrada nova ESPIN de febre amarela no Estado de São Paulo, em áreas classificadas até então como indenes, portanto, sem recomendação de vacina à população naquele momento. Os primeiros registros surgiram a partir de casos humanos suspeitos, confirmados posteriormente por laboratório. Retrospectivamente, foram investigadas epizootias de primatas que não haviam sido informadas oportunamente ao serviço de saúde pública. No Estado do Paraná, foram registradas epizootias suspeitas, entretanto, foi possível documentar e confirmar febre amarela em apenas um município. Não foram notificados casos humanos suspeitos ou confirmados para FA no Paraná nesse período. Posteriormente, a partir da vigilância laboratorial das síndromes febris ictero-hemorrágicas agudas (SFIHA), foi possível detectar outros três casos humanos confirmados, em regiões consideradas endêmicas para a febre amarela nos Estados de Minas Gerais e Mato Grosso. No período de outubro de 2008 a agosto de 2009, como recomendação para contenção da ESPIN, foram distribuídas 22.452.800 doses da vacina febre amarela, sendo 6.712.120 e 4.180.000 doses, respectivamente, para os estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, com aplicação de 9.797.771 doses de vacina em áreas com recomendação de vacina durante a intensificação das ações de vigilância (Ministério da Saúde, 2009).

Em seguida, durante o período de monitoramento nos anos 2012 e 2013, foram notificados ao Ministério da Saúde do Brasil 279 casos humanos suspeitos de febre amarela. A região Sudeste notificou a maior parte dos casos suspeitos (51,3%), seguida das regiões Centro-Oeste (18,6%), e Sul (17,6%), mas nenhum caso foi confirmado fora da região considerada endêmica, ou seja, fora da região amazônica. Os estados com maior frequência de notificação foram São Paulo (39,8%), Goiás (12,2%), Paraná (7,5%) e Minas Gerais (6,8%). Provavelmente, a maior frequência de notificações nesses estados ocorreu por terem sido áreas afetadas entre os anos de 2007 e 2009, durante a reemergência do vírus fora da região amazônica no Brasil (Ministério da Saúde, 2014a).

No período de monitoramento de julho de 2014 a junho de 2015, foram notificados 344 casos suspeitos de febre amarela, dos quais 7 (2,0%) foram confirmados até a semana epidemiológica 33. Os casos confirmados concentraram-se nos meses de maio a dezembro, período sazonal da doença, e a maior parte dos casos confirmados ocorreu em regiões turísticas de Goiás e Mato Grosso do Sul, áreas que mantêm intenso fluxo de pessoas especialmente durante o verão. Todos os casos confirmados foram do sexo masculino, com mediana de idade de 31anos e nenhum dos indivíduos tinha histórico de vacinação prévia

contra a febre amarela. A taxa de letalidade no período foi de 57,1% (Ministério da Saúde, 2015).

Muitos dos casos de febre amarela ocorrem em adultos, do sexo masculino, e estão associados a atividades ocupacionais, turísticas ou de lazer em áreas de floresta, onde ficam expostos a mosquitos infectados, principalmente, espécies selvagens do *Haemagogus janthinomys* (Ministério da Saúde, 2015). Embora não haja relato de transmissão urbana dessa doença no Brasil desde 1942, surtos esporádicos de febre amarela transmitida por vetores selvagens nas regiões Sul e Sudeste do País, próximas a áreas urbanas de levada circulação do *Aedes aegypti* e cuja população não é vacinada contra FA, remete à preocupação com o risco de reurbanização da doença (Ministério da Saúde, 2005).

### **1.1.5. Controle da Febre Amarela**

A principal estratégia para o controle de febre amarela é a combinação da vacinação contra a doença e a adoção de medidas de vigilância. O controle pela vacinação contempla a administração da vacina como parte de um programa rotineiro de vacinação de crianças e a prevenção de surtos em áreas de alto risco da doença por campanhas de vacinação em massa. Segundo a OMS, para que as estratégias de vacinação contra febre amarela sejam consideradas efetivas, devem atingir uma cobertura mínima de 80% (Gotuzzo et al, 2013).

No Brasil, em função da expansão dos casos de febre amarela para além da Região Amazônica observados a partir de 2008, as áreas de risco e de recomendação para vacinação no Brasil passaram a ser avaliadas e definidas periodicamente, durante a reunião anual do Comitê de Especialistas em Febre Amarela, do Ministério da Saúde. Nessa reunião, são avaliados os períodos de transmissão anteriores e redefinidas as áreas de recomendação de vacina à população residente e visitante. Dessa forma, desde 2008, as áreas de risco vêm sendo classificadas como *Área com Recomendação de Vacina* ou *Área sem Recomendação de Vacina*, com adoção de diferentes estratégias para o controle de febre amarela em cada um dessas áreas - Tabela 1 (Ministério da Saúde, 2011).

Como estratégia para controle da doença, são consideradas como prioridades nas áreas com recomendação de vacina: (i) vacinar 100% da população residente a partir dos 9 meses de idade; (ii) monitorar coberturas vacinais em todos os municípios; (iii) investigar os eventos adversos pós-vacinação; (iv) realizar vigilância de casos suspeitos de FA e epizootias de primatas; (v) a captura de vetores e primatas na investigação de casos humanos e epizootias;

(vi) o monitoramento da circulação do vírus na área. Além da vacinação de toda a população residente na área de recomendação de vacina, são necessárias estratégias (Quadro 1) que visem à vacinação oportuna de viajantes para áreas com recomendação de vacina ou com ESPIN em curso (Ministério da Saúde, 2009).

<p><b>Áreas com recomendação de vacina (ACRV)</b></p>	<p>Vacinar 100% da população a partir dos 9 meses de idade (residentes e visitantes).  Monitorar coberturas vacinais em todos os municípios.  Notificar e investigar eventos adversos pós-vacinais.  Notificar e investigar, em menos de 24 horas, casos humanos suspeitos.  Notificar e investigar, em menos de 24 horas, epizootias de primatas.  Manter demais ações para captação precoce e tratamento dos casos de FA.</p>
<p><b>Áreas sem recomendação de vacina (ASRV)</b></p>	<p>Promover a vacinação oportuna para viajantes com destino a ACRV.  Desenvolver estratégias de detecção precoce da circulação viral.  Ampliar a vigilância de casos humanos suspeitos (vigilância de síndromes febris ictero-hemorrágicas agudas e de óbitos sem causas conhecidas)  Ampliar capacidade de resposta do serviço (capacitação de profissionais, interface com atenção básica para fortalecimento das ações de informação, vigilância e imunização, e ação integrada com setores de turismo, meio ambiente, educação e comunicação).</p>

**Quadro 1:** Classificação das áreas de risco de transmissão de febre amarela e estratégias de controle da doença.

Assim, a partir da ESPIN de 2008, observou-se um aumento das áreas de recomendação de vacinação em função da expansão dos casos de febre amarela para além da Região Amazônica, especificamente nas regiões Centro Oeste, Sudeste e Sul do País. Com o objetivo de conter a expansão da transmissão da doença, antecipando-se ao período de transmissão sazonal de 2009 e 2010, a área com recomendação de vacinação na rotina foi ampliada com a inclusão de 330 municípios, sendo 271 municípios no Rio Grande do Sul, 44 em São Paulo, 11 em Santa Catarina e 4 no Paraná. Naquele momento, a área de expansão da ocorrência da febre amarela e, conseqüentemente, da recomendação da vacina na rotina, passou a ser composta por um contingente populacional de 8.596.106 habitantes: 993.289 em São Paulo, 96.897 em Santa Catarina, 76.380 no Paraná e 7.429.540 no Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2009).

Atualmente, a área com recomendação da vacina inclui diversos municípios, nas cinco regiões brasileiras, aproximando-se cada vez mais do litoral, como representado na Figura 5.



Duas diferentes subcepas da vacina de vírus vivo atenuado de febre amarela, 17D-204 e 17DD, vêm sendo utilizadas em larga escala no mundo. Elas possuem a mesma origem, e foram obtidas a partir do vírus selvagem de febre amarela isolado de um paciente acometido de forma não letal pela doença (*Asibi strain*), em Gana, África, em 1927 (World Health Organization, 2013b). No Brasil, a vacina distribuída pelo Programa Nacional de Imunizações é produzida, partir da subcepa 17DD, pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos/Fiocruz (Ministério da Saúde, 2008).

A vacina deve ser administrada por via subcutânea, de preferência na região deltoide, na face externa da parte superior do braço, podendo também ser administrada, no quadrante superior externo da região do glúteo. Está indicada a partir dos 9 meses de idade em residentes e viajantes para áreas endêmicas ou a partir de 6 meses de idade em situações de surto da doença, conforme recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (Ministério da Saúde, 2014a).

Além do uso na rotina de imunizações em unidades básicas de saúde e em unidades da Vigilância Sanitária, a vacina tem sido usada em campanhas de imunização em massa para conter surtos. A vacinação entre os seis e nove meses de idade poderá ser feita em situações de alto risco à doença, como epidemias, a critério das autoridades sanitárias (Ministério da Saúde, 2009). A decisão de vacinar os viajantes contra a febre amarela deve ser individualizada, levando em conta o risco de contrair febre amarela no destino e os riscos de eventos adversos pós-vacinais (Monath, 2004; Centers for Disease Control and Prevention, 2005-2006; Struchiner et al, 2004; Martins et al, 2007; Khromava et al, 2005; World Health Organization, 2013b). Ela deve ser aplicada pelo menos 10 dias antes da viagem para as áreas de risco de transmissão da doença (Monath, 2004; Centers for Disease Control and Prevention, 2005-2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a vacinação de gestantes e mães que estejam amamentando deve ocorrer apenas durante epidemias ou no caso de viagens inevitáveis para áreas de alto risco. Em geral, gestantes e nutrizes não vacinadas devem ser orientadas, se possível, a não viajar para áreas de risco de transmissão de FA. Para indivíduos com 60 anos ou mais de idade, em função do maior risco da ocorrência de eventos adversos graves após a vacinação, é necessário que se faça uma avaliação da relação risco-benefício da vacinação. É contraindicada para aqueles indivíduos com história de intolerância grave ou reações alérgicas intensas aos produtos derivados de ovos, imunodeficiência congênita ou adquirida e infecção sintomática pelo HIV (World Health Organization, 2013b).

### **1.2.1. Esquema Vacinal**

A aplicação da vacina contra febre amarela segue os calendários nacionais de imunização, os quais são guiados pelas recomendações da Organização Mundial da Saúde. Em geral, a vacina é indicada a partir dos 9 meses de idade, para residentes ou visitantes de áreas com risco de transmissão da doença (World Health Organization, 2013b).

Segundo recomendações da OMS, a vacina contra febre amarela deve ser administrada em criança com idade entre 9 e 12 meses de idade nos países endêmicos para essa doença. Todos os países com áreas de risco para febre amarela devem estabelecer cronogramas de introdução da vacina contra febre amarela nos seus programas nacionais de imunização. Além disso, campanhas de vacinação em massa são recomendadas para os habitantes de áreas de risco para febre amarela e baixa cobertura vacinal. Nesse caso, vacinação deve ser oferecida a todos os indivíduos com idades maiores ou iguais a 9 meses de idade residentes em áreas com casos relatados. No caso de viajantes, a vacina deve ser oferecida para os viajantes não vacinados, viajando de ou para áreas sob risco, exceto se pertencerem a algum grupo para o qual a vacina contra febre amarela esteja contraindicada.

Até recentemente, considerando como de dez anos a duração máxima da proteção contra infecção conferida pela vacina, o Regulamento Sanitário Internacional (RSI) recomendava um reforço vacinal a cada dez anos, de modo que o certificado de vacinação ou revacinação exigido a critério de cada país participante, era válido apenas por esse período. No entanto, em maio de 2014, a Assembleia Mundial da Saúde da OMS, aprovou uma alteração do anexo 7 do Regulamento Sanitário Internacional de 2005 (World Health Organization, 2005), estipulando que o período de proteção conferida pela vacina contra a febre amarela, e conseqüentemente, o prazo de validade do certificado internacional, deveria mudar de dez anos de duração para toda a vida da pessoa vacinada. Essa alteração entrará legalmente em vigor em junho de 2016, até quando o texto atual referente à vacinação contra febre amarela do RSI e o certificado de vacinação corrente continuam a valer. Dessa forma, alguns países podem continuar solicitando comprovante de vacinação nos últimos 10 anos aos seus viajantes.

No Brasil, onde a vacina é aplicada rotineiramente partir dos 9 meses de idade em residentes e viajantes das Áreas com Recomendação da Vacina ou em campanhas de vacinação, inclusive a partir de 6 meses de idade em situações de surto da doença, a revacinação a cada dez anos era recomendada pelo Programa Nacional de Imunizações até

recentemente. Entretanto, a partir de agosto de 2014, considerando as evidências científicas disponíveis sobre a duração da imunidade pela vacina contra febre amarela e a situação epidemiológica da febre amarela no Brasil, o Ministério da Saúde do Brasil revisou o esquema de vacinação e estabeleceu as seguintes orientações para o uso da vacina contra febre amarela: (i) em indivíduos residentes ou viajantes para as Áreas com Recomendação da Vacina deve ser administrada aos 9 meses de idade com um reforço aos quatro anos, com um objetivo de resgatar as potenciais falhas primárias e secundárias da vacina em lactentes; (ii) para aqueles indivíduos maiores de quatro anos de idade, residentes ou viajantes para áreas endêmicas, deverá ser aplicada uma dose de reforço após dez anos da aplicação da primeira dose. Entretanto, o Ministério da Saúde do Brasil aguarda a conclusão de estudos de persistência de imunidade à vacina contra febre amarela, como forma de obtenção de evidências científicas consistentes para a tomada de decisão sobre a necessidade de manutenção de uma única dose de reforço após 10 anos da aplicação da primeira dose (Ministério da Saúde, 2014b).

### **1.2.2. Segurança da Vacina contra Febre Amarela**

Embora seja uma vacina segura, eventos adversos associados à vacina contra febre amarela podem ocorrer. São geralmente eventos adversos leves, que ocorrem em cerca de 2% a 5% dos vacinados, por volta do 5º ao 10º dia. As manifestações mais comuns são dor local, mal-estar, cefaleia, dores musculares, febre baixa e outros eventos leves, que duram em média de 1 a 2 dias (Centers for Disease Control and Prevention, 2002 e 2005-2006; Monath et al, 2013).

De maneira bem menos frequente, podem ocorrer também eventos adversos mais graves. No Brasil, tem sido observado maior risco de ocorrência dessas situações em áreas onde não há recomendação de vacina na rotina, e a sua aplicação ocorre a partir de campanhas de vacinação (Ministério da Saúde, 2008; Ministério da Saúde, 2009).

Está descrita uma viremia cerca de 4 a 10 dias após a vacinação, com maior frequência em torno do 5º dia (Monath et al, 2008; Camacho et al, 2005). Os anticorpos neutralizantes aparecem entre uma e duas semanas após a vacinação, atingindo nível máximo três a quatro semanas depois, e persistem por longo tempo. A imunidade tem sido descrita como persistente por no mínimo 10 anos e, possivelmente, por toda a vida (Monath, 2004).

A doença viscerotrópica aguda é uma complicação grave, na qual o vírus vacinal dissemina-se para diversos órgãos, com choque, derrame pleural e abdominal, falência múltipla de órgãos e alta letalidade. O estudo detalhado de dois casos de viscerotropismo por um comitê internacional de especialistas, solicitado pelo Ministério da Saúde do Brasil, não evidenciou mutações significativas no vírus vacinal 17DD e concluiu que são eventos muito raros, determinados por fatores estritamente individuais (Galler et al, 2001; Vasconcelos et al, 2001). De forma semelhante, vacinas produzidas a partir da cepa 17D-204 também apresentaram este tipo de reação adversa (Chan et al, 2001; Martin et al, 2001; Gerasimon e Lowry, 2005; Doblaz et al, 2006). Há evidências que sugerem maior risco de tais eventos graves em pessoas idosas (Khromava et al, 2005; Lawrence et al, 2004). Entretanto, a despeito da ocorrência desses eventos, a avaliação de risco-benefício é altamente favorável à vacinação em áreas endêmicas e em outras situações de risco (Struchiner et al, 2004; Martins et al, 2007).

De acordo com o Sistema Nacional de Vigilância de Eventos Adversos Pós-Vacinais, um sistema passivo de vigilância de eventos adversos a vacinas, do Ministério da Saúde, 1994 eventos adversos à vacina de febre amarela foram relatados entre os anos de 2000 e 2008, quando 101.564.083 doses de vacina de febre amarela foram administradas. Os eventos adversos foram muito mais frequentes após a primeira dose do que após revacinações. Nesse período, foram relatados 26 casos de doença viscerotrópica associados à vacina 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz, 21 no Brasil e 5 em outros países, dos quais 19 foram confirmados, 4 prováveis e 3 suspeitos, com letalidade de 92,3% (Martins et al. 2010).

A vacina contra febre amarela apresenta um grau mínimo de neurovirulência, com ocorrência de raros casos de encefalite pós-vacinal em seres humanos, especialmente em crianças muito pequenas. No período compreendido entre 1952 e 1960, quando não havia restrições quanto à idade mínima para administração da vacina contra febre amarela, ocorreram 15 (quinze) casos, todos em menores de sete meses de idade. Até 2002, 25 (vinte e cinco) casos de meningoencefalite associados temporalmente à vacina contra febre amarela foram descritos no mundo (Monath, 2004). Nos Estados Unidos, desde 1992, 05 (cinco) casos de encefalite em adultos receptores da vacina contra febre amarela foram notificados ao Sistema de Notificação de Eventos Adversos a Vacinas (*US Vaccine Adverse Event Reporting System – VAERS*). Além disso, foram notificados 10 (dez) casos de doença neurológica autoimune, incluindo síndrome de Guillain-Barré e encefalomielite disseminada aguda. Todos

esses casos neurológicos ocorreram de 4 a 23 dias após a vacinação e após a primeira dose (Centers for Disease Control and Prevention, 2005-2006; McMahon et al, 2007).

Hayes, em estudo de revisão da literatura, estimou o risco de anafilaxia em 0,8/100.000 doses; o risco de doença neurotrópica em 0,4/100.000 doses; e o de doença viscerotrópica em 0,3/100.000 doses (Hayes, 2007).

Em campanhas realizadas no Brasil, os eventos adversos graves foram relatados com frequências muito maiores. Em 2009, em campanha contra febre amarela em São Paulo, foram relatados 3 casos confirmados e 2 prováveis de doença viscerotrópica associada à vacina de febre amarela, com uma frequência de 0,31/100.000 doses administradas. Em campanha no Rio Grande do Sul, foram relatados 2 casos confirmados e 2 casos prováveis de doença viscerotrópica associada à vacina de febre amarela, correspondendo a uma frequência de 0,11/100.000 doses administradas. Nessa última campanha, foram confirmados 35 casos de meningite asséptica (0,97/100.000 doses administradas) e 2 casos prováveis de síndrome de Guillain-Barré (0,06/100.000 doses administradas), com um total de eventos neurológicos de aproximadamente 1,1/100.000 doses administradas. Também no Rio Grande do Sul foram confirmados 2 casos de meningite adquiridos através do leite humano (Couto et al, 2009).

Reações de hipersensibilidade ocorrem nas primeiras 2 horas após a vacinação (erupções, urticária, broncoespasmo) e são extremamente raras. A taxa de casos registrados pelo Sistema Nacional de Vigilância de Eventos Adversos Pós-Vacinais, um sistema passivo, durante o período de 2005 a 2010 foi 0,76 (2005), 0,68 (2006), 0,32 (2007), 0,29 (2008), 0,12 (2009) e 0,14 (dados preliminares de 2010) por 100.000 vacinações. A taxa de incidência de reações anafiláticas é de 0,015/100.000 vacinações (dados de farmacovigilância, não publicados). Estas reações são atribuídas às proteínas do ovo, ou a outros componentes da vacina, como a gelatina, a canamicina e a eritromicina. Eventos adversos múltiplos e graves envolvendo contaminação bacteriana resultaram de erros técnicos de manuseio e administração da vacina (Monath, 2004).

### **1.2.3. Eficácia da vacina contra febre amarela**

Não existem estudos clássicos de eficácia vacinal contra febre amarela relatados em humanos. Entretanto, diversas observações têm indicado a proteção conferida pela vacina a seres humanos, como: (i) a redução dos casos de infecções associadas a procedimentos de laboratório em trabalhadores vacinados; (ii) a observação seguida à introdução da vacina

contra febre amarela no Brasil e outros países da América do Sul, nos quais apenas os indivíduos não vacinados adquiriram febre amarela; (iii) e o rápido desaparecimento dos casos de FA durante campanhas de vacinação iniciadas durante epidemias. Segundo Monath e colaboradores (2008), a partir de dados não publicados comparando a incidência de FA entre vacinados e não vacinados durante a epidemia da Nigéria em 1986, foi possível estimar uma efetividade vacinal de aproximadamente 85%.

Em todo o mundo, em 70 anos de utilização da vacina (de 1942 a 2012), apenas 12 casos de febre amarela causada pelo vírus selvagem foram identificados em indivíduos vacinados, e o status sorológico pós-vacinal de nenhum desses indivíduos é conhecido. Dessa forma, não se sabe se esses casos falharam ao desenvolver imunidade a uma vacina adequadamente aplicada ou se receberam uma vacina deteriorada em função de problemas com a cadeia de frio, manuseio e/ou aplicação (Gotuzzo et al, 2013).

No Brasil, assim como em outros países da América do Sul, a eficácia da vacina contra febre amarela é demonstrada pelas observações de mais de 60 anos de utilização dessa vacina, sendo muito rara a ocorrência da doença em pessoas vacinadas. No Brasil, a doença está sob controle pela vacinação sistemática da população sob risco, com poucos casos relatados (Ministério da Saúde, 2004).

Um estudo comparativo realizado com duas vacinas contra febre amarela - cepa 17DD e cepa WHO-17D – em adultos jovens, demonstrou taxa de soroconversão igual ou superior a 98% em indivíduos previamente soronegativos para as duas vacinas. A intensidade da resposta imune também foi semelhante para as duas vacinas, com títulos de anticorpos neutralizantes variando de 14,5 a 18,6UI/mL. Foi detectada viremia entre os dias três e sete em 2,7% dos participantes vacinados (Camacho et al, 2004).

#### **1.2.4. Imunogenicidade da Vacina contra Febre Amarela.**

De forma semelhante à infecção natural, a imunização com a vacina contra febre amarela é seguida por uma rápida resposta imune específica, mediada por anticorpos neutralizantes, citolíticos e células T citotóxicas (Simões et al, 2012).

Indivíduos saudáveis raramente falham no desenvolvimento de anticorpos neutralizantes após a vacinação. Alguns ensaios clínicos têm demonstrado que 80 a 100% dos indivíduos vacinados desenvolvem títulos protetores de anticorpos neutralizantes dentro de 10 dias após a vacinação, enquanto 99% atingem títulos protetores 30 dias após a vacinação

(World Health Organization, 2013b). Entretanto, essa resposta imune é menos intensa em lactentes do que em adultos (Nascimento et al, 2011; Gotuzzo et al, 2013).

#### **1.2.4.1 Imunidade Humoral**

A resposta humoral à infecção pelo vírus selvagem da febre amarela é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos do tipo IgM durante a primeira semana de doença, com pico durante a segunda semana após o seu início e declínio rápido, em 30 a 60 dias, e a magnitude dessa resposta de IgM é significativamente maior nos casos de infecção primária em relação aos casos com exposição prévia a flavivírus, nos quais a proporção de IgM para IgG é baixa (Monath et al, 2013).

Os anticorpos com atividade biológica, como os inibidores da hemaglutinação e os neutralizantes, aparecem rapidamente, geralmente até o quinto dia da doença, entretanto não há uma relação direta entre essas respostas em todos os casos. Os anticorpos inibidores da hemaglutinação apresentam um pico entre 30 e 60 dias após a infecção, com declínio significativo dos títulos nos 6 meses seguintes. Já os anticorpos neutralizantes persistem por muitos anos após a infecção natural por febre amarela, se não por toda a vida, proporcionando proteção completa contra a doença no caso de reexposição ao vírus, de modo que não há o registro de nenhum caso de segunda infecção clínica pela febre amarela. Anticorpos fixadores de complemento (CF) aparecem durante a segunda semana após o início dos sintomas, sobem durante o período de convalescença, e declinam entre 4 e 12 meses após o seu início (Monath et al, 2013).

As respostas dos anticorpos da classe IgM e dos anticorpos neutralizantes seguintes à vacina são geralmente semelhantes à infecção pelo vírus selvagem, exceto pelos anticorpos fixadores de complemento que estão ausentes nos indivíduos não expostos previamente a flavivírus. As respostas de anticorpos à infecção primária são específicas para o antígeno da febre amarela. Indivíduos com imunidade heteróloga prévia a outros flavivírus desenvolvem amplamente as respostas de anticorpos de reação cruzada. A especificidade da resposta imunitária varia com o teste utilizado: o teste de inibição de hemaglutinação é menos específico, o de fixação do complemento é intermediário, e o teste de neutralização é o mais específico. O ensaio Imunoenzimático de captura de anticorpos IgM ligado à enzima (ELISA) é específico nos casos de infecção primária, mas reações cruzadas podem ocorrer ao longo do tempo e nos casos com exposição prévia a flavivírus (Monath et al, 2013).

### *Correlatos de Soroproteção*

Correlatos sorológicos de proteção para febre amarela não estão estabelecidos em humanos. A determinação da eficácia conferida pela vacina baseia-se em estudos de desafios realizados em primatas não-humanos, os quais não seriam considerados éticos em humanos (Centers for Disease Control and Prevention, 2010). No entanto, as evidências de efetividade dos programas de imunização no controle da febre amarela sugerem que os indivíduos soropositivos após a vacinação estão protegidos contra a doença (Monath et al, 2008). Assim, os anticorpos neutralizantes são considerados como a melhor medida de resposta imune à vacinação ou à infecção natural. O teste de neutralização por redução de placa ou PRNT é o método mais sensível, reprodutível e menos custoso de medida de anticorpo neutralizante disponível, sendo considerado como o teste de referência para essa avaliação. É um ensaio funcional que mede a habilidade do soro em neutralizar o vírus da febre amarela e tem sido frequentemente utilizado como teste diagnóstico para a determinação da presença ou ausência de anticorpos neutralizantes, assim como para a sua titulação (De Madrid e Porterfield, 1969; Spector e Tauraso, 1968; Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

Apesar do PRNT ser o padrão-ouro para determinação dos anticorpos neutralizantes para febre amarela, diferenças metodológicas entre os laboratórios podem influenciar a sensibilidade do método e dificultar a comparação entre estudos (Monath et al, 2008). Por isso, é fortemente recomendável a utilização de um soro imune de febre amarela de referência internacional para reporte dos títulos em unidades internacionais (UI / ml), de modo a permitir a padronização dos resultados (Ferguson e Heath, 2004).

O teste de neutralização por redução de placa em 96 poços (micro-PRNT) foi desenvolvido com o objetivo de otimizar recursos e permitir o manejo de grandes quantidades de soros, como o necessário em ensaios clínicos com vacinas de febre amarela. Em 2012, Simões e colaboradores publicaram um trabalho no qual foram avaliadas a confiabilidade e a acurácia dos testes de micro-PRNT50 e micro-PRNT90, desenvolvidos pelo Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz, em um grupo de 200 adultos, do sexo masculino, imunizados com a vacina 17 DD. A diferença entre o micro-PRNT 50 e 90 corresponde ao percentual (50 ou 90%, respectivamente) da redução do número de placas após a diluição do soro em relação ao controle de vírus. O título de anticorpos neutralizantes detectados pelo PRNT50 ou PRNT90 é definido pela recíproca da diluição que reduziu o número de placas em 50% ou 90% em relação ao controle de vírus, respectivamente. Para

avaliação do desempenho de ambos os testes, foi utilizado como teste de referência o PRNT em placas de 6 poços.

No estudo de Simões e colaboradores (2012), o micro-PRNT90 apresentou melhor performance que o micro-PRNT 50, em termos de repetitividade (ICC variando de 0,78 a 0,79), reprodutibilidade - ICC 0,81 (0,77 a 0,85), sensibilidade (100%), especificidade (94,7%) e acurácia global (95%). Foi também possível determinar, por meio de uma curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*), que o valor de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL (794mUI/mL 1:50) representa a melhor combinação entre sensibilidade e especificidade, tendo sido adotado como ponto de corte para o referido teste.

### ***Estudos de Imunogenicidade***

Um estudo de imunogenicidade conduzido em adultos no Brasil, comparando as vacinas de febre amarela 17D-204 e 17DD, demonstrou uma equivalência entre as vacinas, com proporção de soroconversão mínima de 98% para aqueles indivíduos considerados suscetíveis pré-vacinação (Camacho et al, 2004).

Há evidências de que a resposta imune à vacina contra febre amarela não é tão intensa em lactentes quanto em crianças maiores e adultos. Em um estudo multicêntrico de imunogenicidade (Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações, 2003), a vacina mostrou desempenho em crianças, inferior ao observado nos adultos: soroconversão de 97% no grupo 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. Resultados similares foram obtidos em um estudo de imunogenicidade no Peru (Belmusto-Worn et al, 2005) que mostrou proporção de soroconversão após vacinação com YF-VAX de 88,5% em crianças de 18 a 36 meses e 92,3% no grupo etário de 9 a 18 meses e 92,3% no grupo etário de 3 a 5 anos. Para a vacina de comparação (Arilvax®), porém, a proporção de soroconversão após vacinação foi maior e não pareceu influenciada pela idade: 95,8% no grupo com 9 a 18 meses e 96,6% no grupo etário de 5 a 10 anos. As mesmas vacinas imunizaram 99% dos adultos nos EUA. Em estudo multicêntrico de imunogenicidade (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever, 2007) 83% das crianças vacinadas no primeiro ano de vida mostraram duplicação dos títulos de anticorpos neutralizantes 30 dias ou mais após a vacinação.

### ***Efeito Dose-Resposta da Vacina de Febre Amarela***

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o número de partículas virais que compõem a vacina deve ser de no mínimo 1.000 MLD<sub>50</sub> (dose letal média para 50% do lote de camundongos testados) ou 3 log<sub>10</sub> UI (Unidades Internacionais), ou o seu correspondente em PFU (Unidades Formadoras de Placa) - cerca de 5.000 PFU. A razão MLD 50/PFU varia de vacina para vacina, em virtude de diferenças entre a sensibilidade dos ensaios utilizados e, possivelmente, diferenças na virulência para camundongos, e a dose vacinal deve ser preferencialmente informada em Unidades Internacionais (World Health Organization, 1998, 2008 e 2013b).

Em estudo de dose-resposta (Lopes et al, 1988), no qual voluntários sadios de 18 a 47 anos (média 21,6 anos) foram vacinados com diferentes diluições do vírus vacinal 17DD, observou-se que vacinas com concentrações maiores ou iguais a 200 PFU/dose apresentaram elevada soroconversão. Entretanto, esses dados devem ser considerados com reserva, em função do pequeno número de voluntários estudados nos vários grupos e dos métodos laboratoriais diferentes dos empregados atualmente.

Outros estudos, com pequeno número de voluntários, sugerem também que a dose vacinal pode ser muito menor do que a utilizada atualmente (Monath et al, 2008). Alguns estudos mostram, inclusive, que doses mais baixas podem induzir maior resposta de anticorpos que doses mais altas, devido a um efeito de prozona ou a outros fatores associados às doses mais altas, mas os resultados de vários estudos são contraditórios, com menores taxas de soroconversão e títulos mais elevados com as doses menores (Fox e Penna 1943; Freestone et al 1977; Lopes et al 1988).

Testes de potência com o produto final da vacina contra febre amarela de Bio-Manguinhos/Fiocruz realizados em 2007 mostraram um valor médio para dose humana (0,5mL) de 4,79 log<sub>10</sub> (61.660 PFU) / mL, com desvio padrão de 0,13 log<sub>10</sub> (1,35). No teste de termoestabilidade (14 dias a 37°C), o valor médio foi de 4,52 log<sub>10</sub> (33.113 PFU) / mL, com desvio padrão de 0,14 log<sub>10</sub> (1,38). Assim, a vacina contra FA de Bio-Manguinhos tem, antes do teste de termoestabilidade, uma média de 12 vezes (de 7 a 24 vezes) mais partículas virais do que o mínimo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Após o teste de termoestabilidade, essa média é de 6,6 vezes mais partículas virais (de 2,3 a 12 vezes) do que o mínimo preconizado pela OMS (Martins et al, 2013).

Com a ocorrência de epizootias e a ampla disseminação de vetores, especialmente do *Aedes aegypti* nas cidades, levando possivelmente à necessidade de vacinação de toda a

população brasileira e uma maior demanda por vacinas, o Ministério da Saúde do Brasil, em 2008, solicitou a Bio-Manguinhos/Fiocruz, a realização de um estudo de dose-resposta com a vacina contra febre amarela. Esse estudo deveria avaliar a imunogenicidade e segurança em formulações com menores concentrações do vírus vacinal (Martins et al, 2013).

Assim, em 2009, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos realizou o *Estudo de dose-resposta da vacina contra febre amarela 17-DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz*, cujo objetivo era testar a hipótese de que a vacina contra febre amarela, atualmente utilizada pelo Programa Nacional de Imunizações, tem uma concentração de partículas virais muito acima da necessária, e que vacinas com menores concentrações - respeitando o mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 1998) - seriam igualmente imunogênicas e talvez menos reatogênicas em adultos jovens. Dessa forma, seria possível ampliar a capacidade produtiva de Bio-Manguinhos para a vacina contra febre amarela, e conseqüentemente garantir um fornecimento sustentado dessa vacina aos mercados nacional e internacional (Martins et al, 2013).

O *Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela em adultos* foi um estudo randomizado e duplo-cego, realizado em adultos jovens saudáveis, recrutados em unidades militares no Município do Rio de Janeiro/RJ, e o seu objetivo era saber se a vacina contra febre amarela (VFA), usada em doses menores é tão imunogênica e segura quanto à usada em doses habituais. Nesse estudo, foi aplicada a vacina contra febre amarela tal como hoje é formulada – chamada de vacina de referência - e em cinco concentrações menores de partículas virais – grupos experimentais (Martins et al, 2013).

Foram estudados 900 participantes de pesquisa, adultos jovens, do sexo masculino, os quais foram divididos em seis grupos de 150 sujeitos cada um, que receberam a VFA em doses decrescentes a partir de cerca de 60.000 PFU até cerca de 60 PFU, expressas em UI. Foram avaliados a imunogenicidade, a partir da dosagem de anticorpos neutralizantes (em coletas de sangue realizadas antes e cerca de 30 dias após a vacinação), a viremia pós-vacinal (coletas de sangue entre três a sete dias após a vacinação) e os eventos adversos pós-vacinais (a partir de entrevista e exame médicos e realização de exames bioquímicos), comparando-se cada grupo experimental com o grupo da vacina de referência. Devido às informações inconsistentes relacionadas à possível interferência dos anticorpos contra dengue com a resposta imune à vacina de febre amarela, a sorologia para dengue (pré e pós vacinal) foi realizada para o estudo de possíveis interações. Cerca de dez meses após a vacinação, com o

objetivo de avaliar a duração da imunidade em todos os grupos vacinados, foi feita nova coleta de sangue para sorologia para febre amarela e dengue. Exames clínicos foram realizados antes e após a vacinação, e um caderno diário de eventos adversos foi preenchido pelos voluntários durante o período de estudo. Os seus resultados de imunogenicidade foram apresentados para aqueles que eram suscetíveis à febre amarela antes da vacinação e aderiram ao protocolo (N=749, Tabela 1). Observou-se que as doses em UI equivalentes a 52.480 até 1.122 PFU induziram soroconversão e níveis de anticorpos neutralizantes para febre amarela similares, demonstrando não inferioridade das concentrações a partir de 1.122 PFU (587 UI) em relação à vacina comercial (52.480 PFU ou 27.476 UI).

Grupo		Soroconversão				
PFU/dose	UI/dose	Não	Sim	Total	Proporção	IC 95%
52.480	27.476	3	128	131	0.977	0.935; 0.995
19.953	10.447	1	114	115	0.991	0.953; 1.000
5.754	3.013	3	129	132	0.977	0.935; 0.995
1.122	587	4	127	131	0.969	0.924; 0.992
302	158	14	108	122	0.885	0.815; 0.936
59	31	39	79	118	0.669	0.577; 0.753

**Soroconversão:** Mudança do estado de soronegativo antes da vacinação para soropositivo ou aumento de pelo menos 4 vezes nos títulos.

**Soropositividade:** Título pós-vacinal  $>2.7 \log_{10}$  mUI/mL, aproximadamente  $< 1:20$  em diluição.

**Tabela 1:** Taxas de soroconversão de acordo com a concentração de vírus na vacina contra febre amarela - Estudo de dose-resposta da vacina contra febre amarela 17-DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz.

FONTE: Martins et al. 2013

A imunidade dos que soroconverteram para febre amarela foi mantida durante cerca de 10 meses, exceto no grupo de menor dose (59 PFU ou 31 UI). A análise da viremia não mostrou relação estatisticamente significativa da dose vacinal com positividade ou intensidade das mesmas. Houve alta soropositividade para dengue antes da vacinação contra febre amarela, o que contribuiu para diminuir a frequência de viremia (isolamento viral). A sorologia para dengue não teve influência relevante nos resultados da imunogenicidade, exceto no grupo de menor dose (59 PFU), em que o Título Geométrico Médio (TGM) para febre amarela foi menor naqueles voluntários com sorologia para dengue pré-vacinal positiva. A reatogenicidade foi baixa e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os eventos adversos observados, exceto dor local, mais frequente no grupo de referência (Martins et al. 2013).

Como há evidências de que a resposta imune à vacina contra febre amarela não é tão intensa em lactentes quanto em crianças maiores e adultos (Belmusto-Worn et al, 2005; Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações, 2003), tornar-se-ia necessária a realização de estudo semelhante em lactentes. Assim, em continuidade ao estudo de dose-resposta da vacina contra febre amarela 17-DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz realizado em adultos, foi proposto por esse mesmo Instituto um estudo de dose-resposta da VFA em crianças com o objetivo de avaliar a possibilidade da sua aplicação em dose menor do que a utilizada atualmente também nesta faixa etária, com um aumento da disponibilidade desta vacina à população e possível redução da reatogenicidade. Esse estudo confirmaria os resultados do estudo de dose-resposta em adultos também na faixa etária pediátrica, permitindo o registro e a comercialização da nova formulação da vacina em adultos e crianças a partir de nove meses de idade, entretanto, por questões de formulação das vacinas experimentais, ainda não foi iniciado.

### **Imunidade celular conferida pela vacina contra febre amarela**

Existem poucas evidências relativas à eficácia da vacina contra febre amarela mediada por células imunes (Gotuzzo et al, 2013). Estudos incluindo uma análise da resposta de células T CD8+ específicas para o vírus a partir de peptídeos, abrangendo todo o genoma viral, foram realizados em indivíduos vacinados com a vacina contra febre amarela produzida a partir da cepa 17D, e os seus resultados demonstraram que essa vacina induz uma ampla resposta de células T CD8<sup>+</sup> tendo como alvo vários epítomos dentro de cada uma das proteínas virais (Akondy et al, 2009).

A memória imunológica é a base da proteção induzida pela vacina, e as células de memória T CD8 + constituem um importante componente celular dessa imunidade. Estudos de infecções virais têm demonstrado que as células T CD8 + de memória causam proteção de longa duração, pois a expansão clonal antígeno-dirigida resulta em uma resposta antiviral dinâmica mediada por células T CD8<sup>+</sup>, inicialmente, manifestada por uma depuração de patógeno via moléculas citotóxicas e citocinas efetoras e, posteriormente, pela presença de uma pequena população de células de memória, as quais podem ser rapidamente recrutados para neutralizar infecções subsequentes. A capacidade da vacina contra febre amarela, cepa 17D (VFA-17D) de infectar as células dendríticas e ativar múltiplos *Toll-Like receptors* é fundamental para a geração da resposta imune adaptativa robusta vista após a vacinação. Como consequência, é desenvolvida uma memória imunológica que compreende a

capacidade de produzir rapidamente anticorpos neutralizantes, assim como os efetores celulares T CD8<sup>+</sup>, que são provavelmente úteis para matar as células infectadas com o vírus que escapam à resposta humoral (Akondy et al, 2009).

Alguns trabalhos têm demonstrado o aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos primeiros 14 dias após a vacinação contra febre amarela, antes do início da produção de anticorpos neutralizantes, sugerindo uma ativação do sistema imune celular. Reinhardt e colaboradores demonstraram um aumento de neopterin e beta2-microglobulina entre 2 e 6 dias após a vacinação com a VFA-17D, como primeiros parâmetros de ativação imune, em indivíduos primovacinados. Em paralelo à viremia, ocorreu um significativo aumento das células T CD8 circulantes, com pico em torno do 5º dia pós vacinação (Reinhardt et al, 1998). Numa coorte de 40 vacinados com VFA-17 D e acompanhados por um ano após a vacinação, Gaucher e colaboradores demonstraram que imunização com a VFA-17 D leva a uma resposta imune integrada, com componentes de imunidade inata, incluindo o complemento, o “inflammasome” e interferons, além da imunidade adaptativa, com uma resposta das células T precoce, seguida de uma rápida e variável resposta de células B. Assim, o envolvimento dessas células efectoras do sistema imune leva ao desenvolvimento de uma resposta imunitária ampla, polifuncional e persistente (Gaucher et al, 2008).

Pelos dados apresentados acima, é de grande importância a inclusão do estudo da imunidade celular no contexto de avaliação da imunogenicidade e eficácia à vacina contra febre amarela. Apesar da já conhecida eficácia vacinal no controle da febre amarela ao longo de várias décadas, o mecanismo celular e molecular pelo qual a vacina contra febre amarela induz uma imunidade amplificada ainda é pouco conhecido. Com esse propósito de ampliar os estudos de imunidade celular em indivíduos adultos vacinados, alguns estudos têm sido conduzidos no Brasil. No estudo comparativo de imunogenicidade entre as vacinas oriundas das cepas 17-D e 17-DD, observou-se que ambas as vacinas induzem um misto de resposta inflamatória e regulada por citocinas, suportando a utilização da vacina 17-DD nas rotinas de imunização (Campi-Azevedo et al. 2012). Como parte do estudo de dose-resposta de Martins e Colaboradores (2013), foi realizada avaliação de imunidade celular, a partir da análise dos marcadores séricos IFN- $\gamma$  e IL-10, a qual corroborou os resultados de imunidade humoral, fornecendo evidências à possibilidade de uso da vacina contra febre em uma dose cerca de 10 vezes menor que a dose habitual (Campi-Azevedo et al, 2014). No *Estudo de Duração da Imunidade Pós-Vacinação contra Febre Amarela em Adultos* (Collaborative Group for Studies on Yellow Fever Vaccines, 2014), a análise do componente de imunidade celular

demonstrou que os fenótipos de memória específica contra febre amarela aumentaram cerca de 30 a 45 dias após a vacinação, em relação à avaliação pré-vacinal, porém, decresceram por volta de 10 a 11 anos após a vacinação, podendo levar à indicação de necessidade de revacinação dentro desse período (Campi-Azevedo et al, 2015).

Diante desses achados e com as evidências que se tem da resposta imune à vacina contra febre amarela não tão intensa em crianças menores (Belmusto-Worn et al, 2005; Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações, 2003), torna-se fundamental a inclusão de crianças nesses estudos, especialmente, os indivíduos vacinados nos dois primeiros anos de vida, grupo etário que representa a maior parte dos primovacinados nas áreas em que a vacina é parte do calendário rotineiro de vacinação das crianças. A partir da obtenção de evidências do comportamento de médio e longo prazo do estado imune após vacinação contra febre amarela nesse grupo etário, torna-se possível orientar as decisões sobre necessidades de revacinação e as oportunidades para fazê-lo.

O presente estudo de imunidade humoral é parte de um projeto maior de pesquisa que estudou paralelamente, em amostras de sangue coletadas simultaneamente, o componente celular da resposta imune em avaliação conduzida no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) /Fiocruz. Nesse estudo de avaliação de imunidade celular, foi feita a caracterização imunofenotípica de marcadores de linfócitos T e B de memória e a avaliação de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T citotóxicos, em crianças entre 9 e 23 meses de idade, com a finalidade de avaliar a variação do estado imune para febre amarela em intervalos de tempo após a primovacinação. Para essa avaliação, 800 crianças com idades entre 9 meses e 12 anos e selecionadas em unidades de saúde da Região Metropolitana de Belo Horizonte, foram divididos em seis grupos de acordo com o tempo de vacinação: cerca de 30 a 45 dias (grupo de referência), um, dois, quatro, sete e dez anos após a primovacinação. Todos os indivíduos incluídos nessa análise de imunidade celular, com exceção do primeiro grupo ou grupo de referência, eram participantes do estudo “Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças”. O grupo de referência, composto por indivíduos de 9 a 23 meses de idade primovacinados há 30-45 dias, foi obtido a partir do estudo “Clínico Randomizado, Duplo-cego”, com duas Vacinas contra Febre Amarela das Subcepas 17DD e 17D-213/77 em Crianças (Collaborative Group For Studies With Yellow Fever, 2007), realizado nas mesmas unidades de saúde em 2006, partindo do pressuposto que a vacina e os procedimentos de imunização não sofreram alterações significativas ao longo do tempo e que as diferenças observadas no estado imune seriam atribuíveis ao tempo pós vacinação. A análise de

marcadores de memória celular em linfócitos T CD4<sup>+</sup> demonstrou uma redução do índice de CD4<sup>+</sup> *naive* nos grupos de 4 e 7 anos após a vacinação em comparação com o grupo de referência (30 a 45 dias pós-vacinação) e no grupo 10 anos em relação ao grupo de referência e ao grupo de um a dois anos após a vacinação. Já no índice de CD4<sup>+</sup> memória central houve uma diminuição nos grupos 4, 7 e 10 anos em relação aos grupos 30-45 dias e um ano. Também houve uma diminuição significativa nos índices de CD4<sup>+</sup> memória efetora no grupo 7 anos em comparação ao grupo de um ano pós-vacinação. A análise dos marcadores de memória imunológica celular em linfócitos T CD8<sup>+</sup> não apresentou diferenças significativas entre os marcadores avaliados. A análise de marcadores de memória celular em linfócitos B de crianças demonstrou um aumento dos índices de linfócitos B *naive* nos grupos 1, 4, 7 e 10 anos pós-vacinação em comparação com o grupo 30-45 dias. Não houve diferenças significativas no índice de linfócitos B memória não clássica. Já no índice de linfócitos B memória clássica houve um aumento nos grupos 2, 4, 7 e 10 anos pós-vacinação em comparação com o grupo 30-45 dias. Assim, demonstrou-se nesse estudo que a vacinação 17DD induz um aumento das células T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B de memória um mês pós-primovacinação e que, de modo geral, esse aumento persiste até o 10º ano pós-primovacinação. No entanto, não houve diferença significativa entre diferentes tempos pós-vacinais quanto à frequência de células TCD8<sup>+</sup> e à frequência de células CD8<sup>+</sup>Citocina<sup>+</sup>, em relação à produção de TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IL-5<sup>+</sup>. Com esses resultados de caracterização parcial dos marcadores de superfície celular e intracelular de linfócitos T e B, induzida *in vitro* pelo antígeno vacinal 17DD em crianças primovacinadas com idades entre 9 e 23 meses, os pesquisadores do CPqRR levantaram a hipótese de que esses biomarcadores possam definir a manutenção da memória, o que pode ser confirmado quando novas análises forem realizadas em células TCD4<sup>+</sup> e LB. Assim, sugerem que mais estudos, incluindo a identificação de novos biomarcadores, a inclusão de um grupo de mais de 10 anos pós-primovacinação, e a inclusão de um grupo controle composto por crianças não vacinadas com amostras pareadas pré e 30-45 dias após a vacinação, se façam necessários a fim de buscar evidências sobre o comportamento de longo prazo do estado imune após vacinação, de modo a orientar as decisões quanto às necessidades de revacinação e as oportunidades para fazê-las (Rezende, 2014).

### ***Duração da Imunidade Conferida pela Vacina contra Febre Amarela***

A duração da imunidade conferida pela vacina contra febre amarela tem sido alvo de discussões e revisões. Segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde de 2003, além da vacinação rotineira contra febre amarela em residentes e viajantes de áreas com risco de transmissão da doença a partir dos 9 meses de idade, estaria indicada também uma revacinação desses indivíduos. Dessa forma, o Certificado Internacional de Vacinação contra Febre Amarela seria válido apenas nos primeiros dez anos após a vacinação primária, sendo requerida uma revacinação após este período (Wilder-Smith et al. 2008). Entretanto, essa recomendação de revacinação tem sido questionada, pois alguns trabalhos têm indicado que a proteção conferida parece durar pelo menos 20 a 35 anos, podendo provavelmente perpetuar por toda a vida (Gotuzzo et al, 2013).

Considerando os questionamentos relacionados à duração da imunidade conferida pela vacina contra febre amarela e necessidade de revacinação, Gotuzzo e colaboradores (2013) conduziram uma revisão sistemática sobre a eficácia e duração da imunidade pela vacina contra febre amarela em residentes de áreas endêmicas e viajantes. Nesse trabalho concluíram que a imunidade contra febre amarela pós-vacinal pode persistir por toda a vida e que, apesar de uma queda de títulos de anticorpos ao longo do tempo, a manutenção de coberturas de vacinação de cerca de 60 a 80% da população sob risco pode prevenir a ocorrência de surtos nas áreas afetadas.

Por consequência, em 2013, a recomendação de revacinação da Organização Mundial da Saúde foi revista pelo Grupo Consultivo Estratégico de Especialistas (*Strategic Advisory Group of Experts - SAGE*) em vacinas da Organização Mundial da Saúde, utilizando como alicerces principais duas revisões sistemáticas, uma relativa à indicação de reforços a cada dez anos após a vacinação inicial e outra sobre a segurança da vacina quanto à ocorrência de eventos adversos graves pós-vacinais em idosos. Foram utilizados também dados de vigilância, os quais constataram que falhas vacinais são extremamente raras e que não há frequência maior de FA com um maior tempo após a imunização. Dessa forma, a conclusão do SAGE foi que uma dose da VFA seria suficiente para conferir imunidade sustentada, com proteção contra febre amarela ao longo da vida, de modo que não seria necessária uma dose de reforço. No entanto, sugeriu que a vigilância em países endêmicos e ensaios clínicos poderiam indicar grupos especiais os quais poderiam se beneficiar de uma segunda dose ou dose de reforço da vacina de febre amarela, como os lactentes, por exemplo (World Health Organization, 2013a; World Health Organization, 2013b).

O *Advisory Committee for Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* também considera dose única da VFA como suficiente para proteção de longa duração e adequada para a grande maioria dos viajantes. Entretanto, recomenda doses adicionais da vacina para profissionais de laboratório que manipulem vírus selvagem, viajantes para áreas com surtos ou viajantes com permanência prolongada em áreas endêmicas (Staples et al, 2015).

Como a evidência científica para recomendação ou contraindicação do reforço com a VFA ainda é inconclusiva, o *Collaborative Group for Studies with Yellow Fever, Brasil*, realizou um estudo para estimar a soropositividade e título médio geométrico em adultos com diferentes tempos de vacinação, com o objetivo de fornecer dados para discussão sobre a necessidade e tempo de revacinação.

Esse estudo, denominado *Estudo de Duração da Imunidade Pós-Vacinação contra Febre Amarela em Adultos* (Collaborative Group for Studies on Yellow Fever Vaccines, 2014), foi um estudo transversal, multicêntrico, realizado em dois estados brasileiros, Rio de Janeiro e Minas Gerais, nos quais foram selecionados 721 participantes de pesquisa, adultos, de ambos os sexos, que haviam recebido uma única dose da vacina contra febre amarela em algum momento de sua vida, com registro desta informação em caderneta de vacinação ou registro médico. Foram excluídos do referido estudo aqueles indivíduos residentes ou que tinham viajado para áreas de risco para febre amarela, segundo o estabelecido pelo Departamento de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, Brasil, com a finalidade de evitar interferência no efeito *booster* nos níveis de anticorpos induzidos por uma dose da vacina.

Para atender ao seu objetivo principal de comparar a taxa de soropositividade e os títulos médios geométricos de anticorpos neutralizantes contra FA persistentes em adultos primovacinados, esses anticorpos foram quantificados pelo método PRNT<sub>50</sub>, tendo os seguintes pontos de corte para os resultados: (i) Sorologia positiva – títulos de anticorpos neutralizantes maiores ou iguais a  $2.9 \log_{10}$  mUI/mL ou a recíproca de diluição 50; (ii) Sorologia negativa – títulos menores que  $2.5 \log_{10}$  mUI/mL ou recíproca de diluição menor que 5; (iii) Sorologia indeterminada – títulos maiores ou iguais  $2.5$  e menores que  $2.9 \log_{10}$  mUI/mL ou recíproca de diluição maior que 5 e menor que 10. Testes sorológicos para dengue (captura indireta de IgG por ELISA) também foram realizados, com o objetivo de avaliar os efeitos dos anticorpos IgG contra dengue na resposta humoral à vacinação contra febre amarela. Os participantes de pesquisa eram adultos jovens, de ambos os sexos,

recrutados no serviço militar (unidades do exército, Rio de Janeiro), entre trabalhadores da Fiocruz (campus de Manguinhos, Rio de Janeiro) e entre usuários de centros de saúde do município de Alfenas, Minas Gerais, e foram incluídos mediante entendimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e avaliação dos critérios de elegibilidade.

Como tentativa de determinar o intervalo de tempo necessário para que a resposta imunológica pós-vacinal decline e indique a necessidade de revacinação, os participantes de pesquisa foram agrupados arbitrariamente de acordo com o tempo após a vacinação nas seguintes categorias: 30 a 45 dias; 1 a 4 anos; 5 a 9 anos; 10 anos; 12 ou mais anos. Nos indivíduos avaliados de 30 a 45 dias após a vacinação, a presença de anticorpos neutralizantes foi avaliada também antes da vacinação, e a resposta imunológica neste grupo, recentemente vacinado, foi considerada como padrão de referência para a avaliação da variação dos níveis de anticorpos ao longo do tempo. Dessa forma, para ser incluído no estudo, todos os participantes deveriam ter recebido uma única dose da VFA pelo menos um ano antes, documentada na sua caderneta de vacinação ou relatório médico ou nunca ter sido vacinado antes, e não ter tido exposição potencial à infecção natural para evitar interferência de efeito *booster* nos títulos de anticorpos induzidos por uma dose.

O estudo incluiu 721 participantes de pesquisa, sendo 50,7% de unidades do Exército situadas no município do Rio de Janeiro; 16,0% de trabalhadores da Fiocruz lotados no campus de Manguinhos, Rio de Janeiro; 33,3% de usuários de unidades de saúde de Alfenas, Minas Gerais. Desses, 691 (95,8%) atenderam a todos os critérios de elegibilidade e foram incluídos na análise. Eram predominantemente do sexo masculino (73,4%), com idade entre 18 e 83 anos e tempo pós vacinação variando de 30 dias a 18 anos. Aqueles indivíduos vacinados durante o estudo (grupo de referência) que apresentavam sorologia indeterminada pré-vacinação foram excluídos da análise como forma de garantir que este grupo contivesse apenas primovacinados, uma vez que não era possível descartar vacinação prévia com estes títulos intermediários.

Cerca de 93% dos participantes de pesquisa do grupo de referência tornaram-se soropositivos após a vacinação (Tabela 2). Globalmente, a proporção de indivíduos soropositivos foi de 86,2%, sem diferença considerável entre os vacinados no Rio de Janeiro (86,3%) e em Alfenas, Minas Gerais (85,5%). Entretanto, o percentual de sujeitos com títulos de anticorpos neutralizantes maiores que  $2.9 \log_{10} \text{ mUI/mL}$  (“soropositivos”) caiu gradualmente entre 4 e 10-11 anos pós vacinação. Porém, houve um inesperado aumento no número de indivíduos soropositivos no subgrupo vacinado há 12 anos ou mais. A distribuição

dos títulos de anticorpos, de acordo com o tempo decorrido após a única vacinação, indicou que o título mais elevado foi observado em indivíduos recém-vacinados (até 45 dias), com uma redução acentuada cerca de 1 a 4 anos após a vacinação, e um decréscimo mais discreto após 10-11 anos. Novamente, observou-se um inesperado e ligeiro aumento nos títulos de anticorpos neutralizantes nos indivíduos vacinados há 12 ou mais anos. De forma semelhante, os títulos geométricos médios dos anticorpos neutralizantes declinaram consideravelmente até 10-11 anos após vacinação, voltando a aumentar para o grupo vacinado há 12 anos ou mais (Tabela 3; Figura 6).

Tempo desde a vacinação	Títulos de anticorpos ( $\log_{10}$ mUI/mL) <sup>a</sup>							
	< 2.50		2.50–2.89		$\geq 2.90$		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
30 – 45 dias	3	2.4	5	4.0	117	93.6	125	100
1–4 anos	1	0.9	6	5.3	107	93.9	114	100
5–9 anos	5	6.0	9	10.8	69	83.1	83	100
10–11 anos	11	8.0	22	15.9	105	76.1	138	100
$\geq 12$ anos	11	5.8	17	8.9	163	85.3	191	100
Total	31	4.8	59	9.1	561	86.2	651	100

<sup>a</sup> Títulos de anticorpos  $\geq 2.9 \log_{10}$  mUI/mL foram considerados como soropositivos.

**Tabela 2:** Título de anticorpos neutralizantes determinados pelo método de neutralização por redução de placa, de acordo com o tempo desde a vacinação.

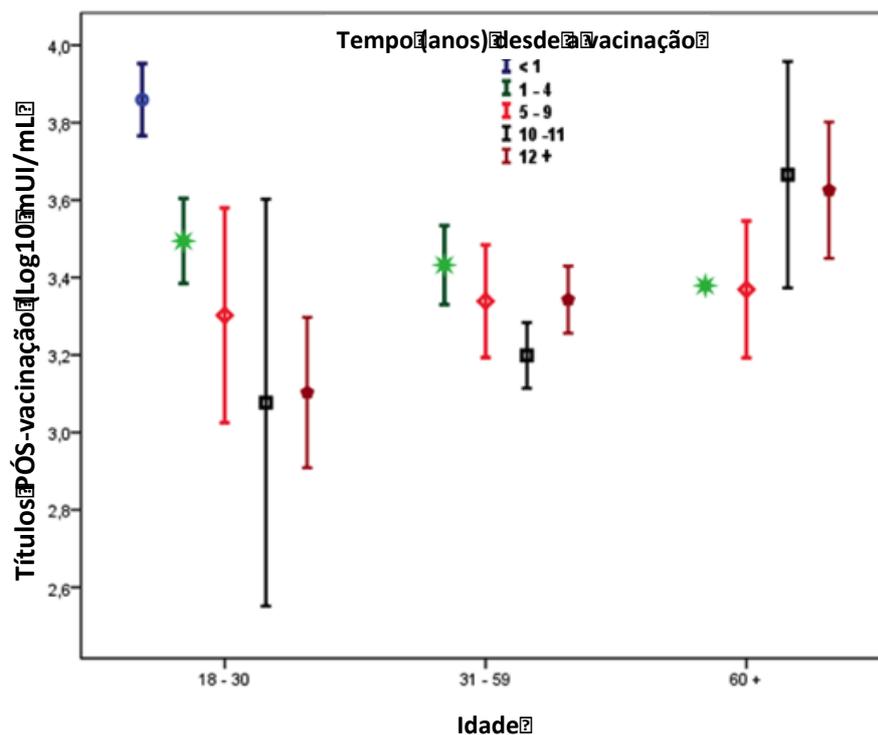
FONTE: Collaborative group for studies on yellow fever vaccines, 2014.

Tempo desde a vacinação	N	TGM <sup>a</sup>	LI <sup>b</sup>	LS <sup>c</sup>
30-45 dias	125	8762.8	7042.6	10903.1
1–4 anos	114	3007.5	2535.7	3567.8
5–9 anos	83	2194.8	1725.4	2791.3
10–11 anos	138	1661.9	1362.4	2026.7
$\geq 12$ anos	191	2123.1	1787.0	2522.5
Total	651	2824.6	2558.7	3118.1

<sup>a</sup> TGM: Título médio geométrico; <sup>b</sup> LI: limite inferior do intervalo de confiança de 95%; <sup>c</sup> UL: limite superior de intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Collaborative group for studies on yellow fever vaccines, 2014.

**Tabela 3:** Títulos geométricos médios de anticorpos e seus intervalos de confiança de 95% (mUI/mL).



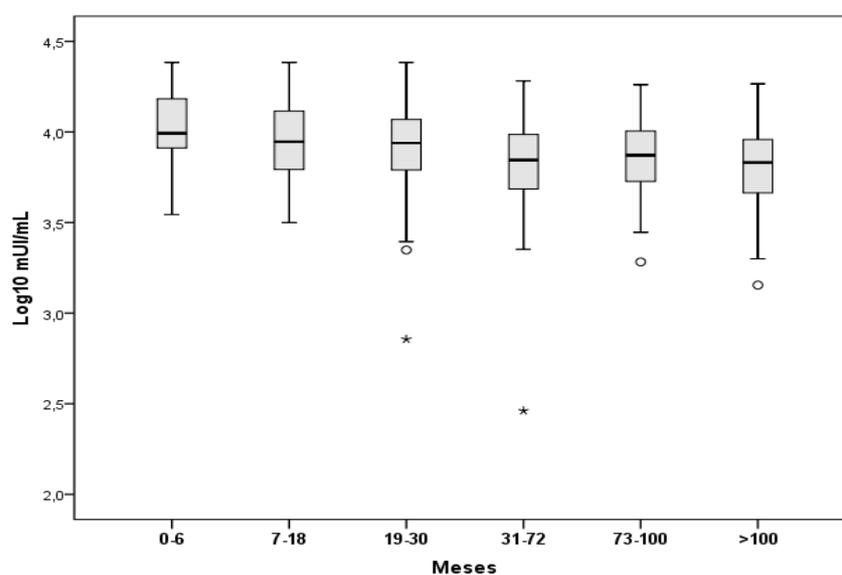
Fonte: Collaborative group for studies on yellow fever vaccines, 2014

**Figura 6:** Valores médios e intervalos de confiança de 95% para os títulos de anticorpos neutralizantes (log10 mUI/mL) contra febre amarela de acordo com tempo desde a vacinação e a idade.

Em consequência a todos esses estudos, o Ministério da Saúde do Brasil reformulou as recomendações sobre o esquema de revacinação do Brasil, que estão descritas na seção 1.2.1. Esquema Vacinal”.

Avaliação semelhante em crianças fora planejada pelo *Collaborative Group for Studies with Yellow Fever* no estudo denominado “Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças”, realizado nos municípios de Contagem e Ribeirão da Neves, Minas Gerais, integrantes da Área com Recomendação de Vacinação (ARV) no Brasil. Nesse projeto, entre os anos de 2010 e 2011, foram realizadas entrevistas e coletas de sangue de 1195 crianças, com o objetivo de avaliar a variação do estado imune para febre amarela de 1 mês a 10 anos após a primovacinação, em crianças vacinadas nos dois primeiros anos de vida. Após a coleta de dados, a distribuição dos tempos de vacinação foi classificada em 6 categorias que mais se aproximaram dos tempos pós-vacinação inicialmente previstos no protocolo do estudo: 30 a 45 dias (0 a 6 meses), 1 ano (7 a 18 meses), 2 anos (19 a 30 meses), 4 anos (31 a 72 meses), 7 anos (73 a 100 meses) e 10 anos (mais que 100 meses). Os

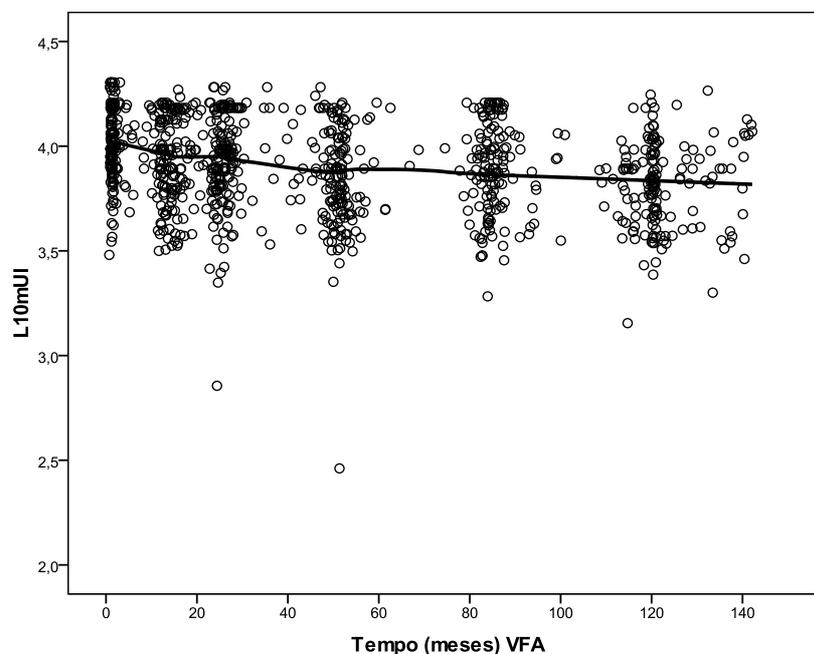
níveis médios dos títulos de anticorpos foram inversamente proporcionais ao tempo de vacinação, observando-se que a média geométrica dos títulos após 9 anos de vacinação correspondia a 60% do nível observado até 6 meses após (Tabela 4). Porém, para todas as categorias de tempo pós-vacinação, foram mantidos os níveis de soropositividade, com exceção de uma criança (Figura 6 e Figura 7). Apesar da redução nos níveis de anticorpos relacionada ao tempo de vacinação, quase todas as crianças eram soropositivas (Tabela 4).



**Figura 7:** Distribuição dos títulos de anticorpos (miliunidades internacionais por mL) segundo categorias de tempo de vacinação contra febre amarela.

Idade (Meses)	Mediana da idade	N	MGT	Limites de 95% de confiança		Soropositividade  %
				Lim. Inf.	Lim. Sup.	
0 - 6	1,4	212	10581	10037	11154	100,0
7 - 18	13,4	194	8617	8079	9191	100,0
19 - 30	25,6	203	8362	7804	8958	99,5
31 - 72	51,1	205	6854	6404	7336	99,5
73 - 100	84,9	195	7398	6932	7894	100,0
>100	120,5	179	6484	6058	6940	100,0

**Tabela 4:** Média e intervalo de 95% de confiança dos títulos de anticorpos (miliunidades internacionais por mL) e proporção de soropositividade, por tempo de vacinação contra febre amarela.



**Figura 8:** Títulos de anticorpos (logaritmo na base 10 dos títulos em miliunidades internacionais por mL) contra febre amarela, segundo tempo de vacinação.

É importante ressaltar, porém, que as análises descritas acima para crianças foram realizadas em plasma heparinizado com o pressuposto de que revelariam os mesmos resultados que o soro. Entretanto, uma verificação *post hoc*, comparando os resultados de PRNT obtidos em soro, plasma heparinizado e plasma com EDTA revelou que os títulos foram mais altos quando utilizado plasma heparinizado, e que a diferença variava de forma que não possibilitava a derivação de um fator de correção, para permitir a comparação com dados de outros estudos que utilizaram soro. Dessa forma, as proporções de soroconversão observadas pelo *Collaborative Group for Studies with Yellow Fever* na primeira avaliação em crianças (Tabela 4) podem estar superestimadas, o que levou a realização do presente estudo, com nova análise das mesmas amostras de plasma inicialmente coletadas, após tratamento com enzima de remoção de heparina, de acordo com o descrito na seção de Métodos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a duração da imunidade para febre amarela em crianças de 9 meses a 12 anos de idade, vacinadas nos dois primeiros anos de vida e que não foram revacinadas.

### **2.2. Objetivo primário**

- Estimar e comparar a proporção de soropositividade e a média geométrica dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes contra febre amarela em crianças vacinadas anteriormente (nos dois primeiros anos de vida) com única dose de vacina contra febre amarela, com idade atual entre 9 meses a 12 anos, categorizadas segundo o tempo após a vacinação: 30 a 45 dias, 1 ano, 2 anos, 4 anos, 7 anos e 10 anos.

### **2.3. Objetivo secundário**

- Comparar a proporção de soropositividade e a média geométrica dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes, com os resultados da análise de imunidade celular realizada pelo CPqRR em amostras de sangue coletadas simultaneamente na mesma população de estudo, nos seguintes intervalos de tempo: (a) 30 a 45 dias após a vacinação; (b) 1 ano após

vacinação; (c) 2 anos após vacinação; (d) 4 anos pós-vacinação; (e) 7 anos após vacinação; (f) 10 anos após vacinação.

### **3. MÉTODO**

#### **3.1. Delineamento geral**

Estudo seccional para análise do estado imune para febre amarela em grupos de crianças vacinadas contra febre amarela nos dois primeiros anos de vida. Os grupos foram definidos pelo intervalo de tempo decorrido entre a vacinação e o momento de captação para este estudo. Em cada grupo foi estimada a proporção das crianças soropositivas e a média geométrica dos títulos de anticorpos. Os dados foram obtidos do estudo “Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças” – aqui chamado de “estudo matriz” e seu complementar, denominado “Estudo Complementar da Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças”. As análises de imunidade humoral foram realizadas após tratamento das amostras de plasma de ambas as fontes com Ecteola-Celulose® visando à remoção de heparina e minimização dos efeitos dessa sobre os resultados inicialmente observados no estudo matriz.

Os intervalos de tempo após a aplicação da única dose da vacina de febre amarela foram categorizados em grupos, os quais estão descritos a seguir.

- Grupo 1 (referência): crianças primovacinadas há 30 - 45 dias
- Grupo 2: crianças primovacinadas há 1 ano
- Grupo 3: crianças primovacinadas há 2 anos
- Grupo 4: crianças primovacinadas há 4 anos
- Grupo 5: crianças primovacinadas há 7 anos
- Grupo 6: crianças primovacinadas há 10 anos

O grupo com 30-45 dias de vacinação, representando a máxima intensidade esperada da resposta imune induzida pela vacina, foi eleito como o grupo de referência para comparação dos grupos vacinados há 1, 2, 4, 7 e 10 anos neste estudo. Estes tempos foram definidos arbitrariamente para orientar a captação de participantes de forma a obter uma representação de vários grupos. Não havendo limites biologicamente definidos para estas categorias, os intervalos incluíram os tempos dispersos em torno do valor central tomado

como referência. Como não são esperadas alterações bruscas de níveis de anticorpos, é legítimo supor que o resultado de um teste sorológico após 5 meses de vacinação seja uma aproximação aceitável do nível de anticorpos após 2 meses, para fins de contrastes com tempos de vacinação maiores.

No Estudo Matriz, a sorologia para febre amarela no grupo de referência foi realizada somente após a primovacinação contra febre amarela, assim como nos demais grupos de tempo pós-vacinação. Entretanto, ao término da condução do Estudo Matriz, foi identificada a necessidade de realização de um estudo complementar em crianças de 9 a 23 meses de idade, com coletas de sangue pré-vacinação e cerca de 30 a 45 dias após a vacinação, o qual foi denominado de “Estudo Complementar da Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças”. Os dados obtidos por esse estudo, também chamado aqui de “Estudo Complementar I”, contribuíram para análise comparativa adicional dos dados relativos aos demais tempos pós-vacinação fornecidos pelo Estudo Matriz.

### **3.2. População-alvo**

Crianças de 9 meses a 12 anos de idade residentes em áreas onde a vacina contra febre amarela compõe o calendário básico de imunizações, que receberam a vacina na rotina das unidades básicas de imunização nos dois primeiros anos de vida e não foram revacinadas. Os participantes da presente pesquisa foram obtidos de duas fontes: do estudo matriz, conduzido de janeiro de 2010 a julho de 2011, no qual foram incluídas crianças dos seis grupos de pesquisa descritos na sessão 3.1; e do estudo complementar que incluiu crianças com controle de soroconversão a partir de amostras pareadas pré e 30 a 45 dias pós-vacinação, a fim de embasar o grupo de referência do presente estudo. Os locais de seleção dos participantes de pesquisa foram os municípios de Ribeirão das Neves e Contagem, pertencentes à região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Estes municípios já haviam participado de estudos anteriores com a vacina contra febre amarela, por possuírem as condições propícias à realização de estudos deste tipo (grande volume de vacinação de lactentes e recursos humanos com disponibilidade e interesse em participar de projetos de pesquisa).

### ***Crêterios de elegibilidade***

Foram elegíveis para o estudo matriz crianças de ambos os sexos, com idade entre 9 meses a 12 anos, primovacina as contra febre amarela entre 9 e 23 meses de idade, com tempo pós vacina o de cerca de 30 a 45 dias, 1 ano (intervalo de 12 a 15 meses), 2 anos (intervalo de 24 a 27 meses), 4 anos (intervalo de 48 a 51 meses), 7 anos (intervalo de 84 a 87 meses) e 10 anos (intervalo de 120 a 123 meses), cujos responsáveis legais assinaram o termo de consentimento. Os dados sobre data da vacina o foram obtidos a partir de registros nas unidades de saúde e confirmados com os responsáveis legais pelos participantes de pesquisa no momento da entrevista de inclusão. Algumas crianças haviam participado anteriormente de um ensaio clínico randomizado com vacinas contra febre amarela, o qual também incluiu indivíduos de 9 a 23 meses de idade e fora realizado em 2006, nas mesmas unidades de saúde (Collaborative Group For Studies With Yellow Fever, 2007). Entre os participantes desse ensaio clínico, foram incluídas no estudo matriz aquelas crianças para as quais estavam disponíveis as medidas de títulos de anticorpos contra febre amarela realizados após a vacina o e que apresentavam registro de soroconversão p s-vacina o. No estudo complementar, foram incluídas também crianças de 9 a 23 meses de idade, vacinados há 30-45 dias com controle de coletas de sangue pr  e p s vacinais.

Não foram incluídas crianças com imunodepressão permanente ou transitória, inclusive aquelas em tratamento com corticosteróides em doses acima 2 mg/kg de peso, e aquelas com doenças autoimunes, imunodepressão transitória ou permanente, induzida por doenças (neoplasias, AIDS etc.) ou pelo tratamento (drogas imunossupressoras, radioterapia etc.). Uso de corticosteroides (p.ex., prednisona, dexametasona) por menos de 2 semanas, ou de uso t pico ou por inala o, não levaram à exclusão do estudo, mas foram registrados no questionário. Da mesma forma, não foram incluídas crianças com hemoglobinopatias e crianças com antecedentes de transfusão de sangue ou de tratamento com soro hiperimune até 90 dias antes da coleta de sangue. Especificamente no “Estudo Complementar I” ao Estudo Matriz também não foram incluídas crianças que tenham recebido outras vacinas no intervalo de 30 dias antes ou depois da vacina contra febre amarela

### **3.3. Tamanho amostral**

Para estimar a propor o de soropositividade esperada de 85% em crianças (Collaborative Group For Studies With Yellow Fever, 2007), com limites de 95% de

confiança e precisão de 5 pontos percentuais para mais ou para menos (80% a 90%) seriam necessários aproximadamente 200 voluntários em cada um dos grupos.

Com esse tamanho de amostra, uma proporção de 50% teria os limites de confiança de 43% e 57%. Supondo a proporção de soroconversão de 85% no grupo de referência, ou seja, de 30 a 45 dias de vacinação (Collaborative Group For Studies With Yellow Fever, 2007), beta igual a 0,1 e alfa igual a 0,01 (para compensar análises múltiplas), os 200 indivíduos em cada grupo permitiriam detectar uma diferença de pelo menos 20 pontos percentuais em relação aos demais grupos. Hipoteticamente, se a proporção no grupo de referência for de 90%, a diferença mínima detectável seria de 15 pontos percentuais.

### **3.4. Procedimentos do estudo**

#### **3.4.1. Recrutamento**

Os potenciais participantes de pesquisa foram contatados e seus responsáveis convidados a trazê-los à unidade de saúde para sensibilização sobre o estudo. O grupo de 10 anos de vacinação foi contatado antes de completar o tempo para revacinação.

#### **3.4.2. Inclusão**

Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com os objetivos, métodos, benefícios, riscos da pesquisa e indicações de como obter esclarecimentos adicionais foi apresentado aos responsáveis legais pelas crianças durante o Estudo Matriz (Anexo 1) e o Estudo Complementar I (Anexo 2). Após a concordância com a participação no estudo e assinatura do TCLE, uma versão assinada foi entregue ao responsável legal pelo participante.

#### **3.4.3. Coleta de dados**

Após a inclusão no Estudo Matriz e Complementar 1 foi aplicado um questionário (Anexos 3 e 4) para a coleta de dados: (i) gerais de identificação - nomes completos do participante e da mãe, data do nascimento, local de nascimento, endereço completo e telefone para contato; (ii) antecedentes vacinais, com verificação das datas das últimas doses no cartão de vacinação; (iii) problemas de saúde atuais e uso de medicamentos; (iv) antecedentes patológicos, inclusive eventos adversos após vacina e soros hiperimunes (nome, dose,

indicação, data do início e duração do uso) e de outras vacinas; (v) viagens realizadas após a aplicação da vacina contra febre amarela. O peso em gramas das crianças foi também medido e registrado.

Para ambos os estudos, em seguida à entrevista, foram coletadas amostras de sangue para avaliação dos desfechos de interesse do estudo, como as dosagens de anticorpos contra febre amarela e análise de imunidade celular. Na oportunidade, foi oferecida aos participantes do Estudo Matriz a realização de dosagem de hemoglobina para diagnóstico de anemia, apenas como incentivo à participação, sem finalidade de pesquisa. No Estudo Complementar I, foi agendada nova coleta de sangue para 30 dias após a vacinação, tolerando-se o intervalo máximo de 45 dias.

#### **3.4.4. Coleta e processamento das amostras de sangue**

No Estudo Matriz foram coletados cerca de 4 mL de sangue por punção venosa no antebraço. No Estudo Complementar I, foram coletados 7mL (mínimo 5 mL) de sangue total imediatamente antes da vacinação e agendada nova coleta de sangue para 30 dias, tolerando-se o intervalo máximo de 45 dias.

Em ambos os estudos, a coleta de sangue foi feita com tubos contendo o anticoagulante heparina sódica, pois além de investigar a imunidade humoral, a partir da dosagem de anticorpos neutralizantes, era essencial para os dois estudos investigar a imunidade celular, com avaliação do fenótipo de memória e produção de citocinas. Como para a avaliação do componente celular é necessária a obtenção de plasma e o volume de sangue coletado das crianças não poderia ser superior a 10mL, a equipe de pesquisadores daqueles estudos optou pela coleta de sangue em tubo primário contendo anticoagulante. A escolha da heparina sódica ocorreu por se tratar de um anticoagulante natural, já encontrado *in vivo*, e por não atuar como quelante de cálcio, o que alteraria o processo de ativação celular, como observado para os demais anticoagulantes (EDTA, CITRATO, CPDA1), permitindo a realização destes ensaios fenotípico-funcionais. Buscou-se assim a otimização da coleta de sangue de crianças pequenas evitando-se o excesso de volume de sangue.

Para avaliação da imunidade celular, as amostras de sangue em heparina foram encaminhadas em temperatura ambiente ao Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM/CPqRR-Fiocruz-MG), onde foram submetidas a processamento preliminar de modo a separar as alíquotas para os diversos testes, com identificação das

amostras por etiquetas autoadesivas contendo números que não permitiam ao laboratório identificar o voluntário. Outra etiqueta com o mesmo número foi afixada no questionário do participante.

Para dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela, as alíquotas de plasma foram acondicionadas em criotubos etiquetados com códigos numéricos, congeladas e enviadas ao Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz (LATEV) para realização do PRNT. As titulações de anticorpos neutralizantes seriam realizadas em plasma heparinizado com o pressuposto de que revelariam os mesmos resultados que o soro. Entretanto, a partir de uma verificação *pos hoc*, comparando os resultados do PRNT realizado em soro, plasma heparinizado e plasma com EDTA, observou-se que os títulos foram mais altos com o plasma heparinizado, e que a diferença variava de forma a não permitir a derivação de um fator de correção para permitir a comparação com dados de outros estudos que utilizaram soro. Assim, as proporções de soroconversão observadas a partir da realização do PRNT em plasma heparinizado poderiam estar superestimadas. Como medida de controle dessa superestimativa, os pesquisadores do Estudo Matriz identificaram a necessidade de se estabelecer um protocolo de remoção de heparina do plasma previamente à realização dos testes de soroneutralização para febre amarela. Optou-se, portanto, pelo tratamento do plasma com Ecteola-Celulose® (*Epichlorohydrin triethanolamine–celulose*), uma resina de troca aniônica capaz de remover heparina do plasma, mais comumente utilizada para permitir a realização de testes de coagulação em sangue heparinizado (Cumming et al, 1986).

#### ***Tratamento do plasma com Ecteola-Celulose®***

A presença de heparina em amostras de plasma interfere com muitos ensaios para avaliação da coagulação. Dessa forma, vários métodos para neutralização da heparina estão disponíveis. Alguns desses métodos correspondem a procedimentos de troca iônica, que não interferem com muitos testes de coagulação (Hoffmann e Meulendijk, 1980). A utilização da Ecteola-Celulose® é um desses métodos, no qual até cerca de 300 unidades de heparina podem ser completamente adsorvidas de cada 1 mL de plasma. Quando amostras de plasma heparinizado (de 0,1 a 1,0 unidades/mL) passam por colunas de ecteola, a heparina é completamente removida e os resultados dos testes de coagulação são semelhantes aos testes em amostras não heparinizadas (Thompson e Counts, 1976).

De forma semelhante, cogitou-se a hipótese de que o uso de heparina como anticoagulante poderia influenciar nos resultados dos testes de soroneutralização para febre amarela, e um protocolo de remoção de heparina de amostras de plasma a serem utilizadas em ensaios de soroneutralização para febre amarela foi desenvolvido e validado pelo Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz e o Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz. Após essa etapa, foi realizada nova titulação de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo ensaio PRNT, com o objetivo de avaliar os desfechos de interesse do presente protocolo de pesquisa.

#### **3.4.5. Protocolo de remoção de heparina das amostras de plasma**

Os ensaios-padrão para detecção de anticorpos neutralizantes são realizados empregando amostras de soro, obtidas de sangue coletado na ausência de anticoagulante (Niedrig et al. 1999). Entretanto, no Estudo Matriz, pelas razões acima descritas, a dosagem de anticorpos neutralizantes foi realizada em amostras de plasma obtidas pela coleta de sangue em tubos contendo o anticoagulante heparina sódica, a qual, por ser capaz de se ligar a partículas virais, pode alterar o perfil de soroneutralização e interferir na detecção de anticorpos neutralizantes. Assim, a avaliação dos níveis desses anticorpos pode ser alterada, interferindo, conseqüentemente, na taxa de soropositividade contra febre amarela observada. Estudos já realizados demonstram que a presença da heparina sódica em amostras de plasma pode levar à ocorrência de resultados falso-positivos ou elevar a magnitude da capacidade bloqueadora da amostra biológica em ensaios de pesquisa de anticorpos neutralizantes (Van den Besselaar & Meeuwisse-Braun, 1993; Bozzini et al. 1998; Zahn et al. 2005).

Com o objetivo de evitar a interferência da heparina sódica em ensaios de pesquisa de anticorpos neutralizantes, alguns estudos têm sido desenvolvidos para estabelecer protocolos de tratamento pré-analítico de amostras biológicas visando à investigação simultânea de componentes celulares e humorais em imunologia aplicada à vacinologia. Dentre esses protocolos, estão descritos o uso da heparinase para degradação da heparina sódica e o uso de resina de celulose para a adsorção da heparina sódica (Thompson & Counts, 1976; Van den Besselaar & Meeuwisse-Braun, 1993). Embora altamente eficaz na degradação da heparina, o uso da heparinase é de elevado custo e pode gerar metabólitos ainda capazes de exercer algum tipo de interferência em ensaios de pesquisa de anticorpos neutralizantes. Por outro lado, a aplicação da resina de Ecteola-Celulose® (ECT) é um

procedimento operacional de baixo custo e também eficaz, uma vez que adsorve o anticoagulante, podendo remover de forma definitiva sua interferência nos ensaios.

Diante da necessidade de avaliar o impacto do anticoagulante heparina sódica nas dosagens de anticorpos neutralizantes do Estudo Matriz, de modo a permitir a dosagem correta dos níveis de anticorpos neutralizantes e a taxa de soropositividade contra febre amarela, foi proposto por um grupo de pesquisadores do CPqRR/Fiocruz a elaboração de um protocolo específico de tratamento de amostras de plasma coletadas em heparina com Ecteola-Celulose®. A proposta partiu do racional que o reagente Ecteola-Celulose® é capaz de remover 90% ou mais da heparina sódica presente em amostras de plasma e um dos seus objetivos específicos era estabelecer condições padrões de relação da quantidade de Ecteola-Celulose® necessária para esse fim - remoção de no mínimo 90% da heparina sódica presente em amostras de plasma de indivíduos residentes em área com recomendação de vacinação contra febre amarela (Martins-Filho OA – no prelo). Esse protocolo, aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - parecer no Anexo 7 - foi desenvolvido a partir de três grupos de indivíduos, descritos a seguir. Os dois primeiros eram compostos por amostras armazenadas no biorrepositório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) e o terceiro foi obtido a partir do denominado “Estudo Complementar I”.

O primeiro grupo era constituído por 90 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, com idade variando de 16 a 82 anos, e residentes em Bambuí/MG, cidade situada em área com recomendação de vacinação contra febre amarela. Foram 90 amostras de soro, obtidas de sangue coletado na ausência de anticoagulante, pareadas a 90 amostras de plasma, obtidas a partir de sangue coletado em tubos com heparina sódica. Essas 90 amostras de plasma foram empregadas para estabelecer as condições padrões de relação da quantidade de Ecteola-Celulose® necessária para remover a heparina sódica. O procedimento de remoção de heparina sódica das amostras de plasmas foi realizado no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do CPqRR, em Belo Horizonte. Em seguida, as 90 amostras de soro, as 90 amostras de plasma contendo heparina e as 90 amostras de plasma tratadas com Ecteola-Celulose®, denominadas de pseudo-soro, foram encaminhadas ao Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio- Manguinhos (LATEV) /Fiocruz, situado no Rio de Janeiro, para a dosagem de anticorpos neutralizantes contra febre amarela por PRNT. Os níveis de anticorpos neutralizantes e a taxa de soropositividade contra febre amarela foram comparados nas amostras pareadas de soro, plasma contendo heparina e plasma tratado com Ecteola-

Celulose® (ECT) chamado de pseudo-soro. As condições padrões escolhidas foram aquelas que permitiram que os níveis de anticorpos neutralizantes e a taxa de soropositividade das amostras de pseudo-soro se aproximassem dos observados nas amostras de soro (amostra adequada para os ensaios de PRNT).

O segundo grupo foi composto por amostras de crianças de ambos os sexos, com idade variando de 9 meses a 11 anos, pertencentes ao próprio Estudo Matriz. Foram utilizadas cerca de 1.200 amostras de plasma provenientes da coleta de sangue em tubos contendo o anticoagulante heparina sódica. As 1.200 amostras de plasma foram tratadas com Ecteola-Celulose®, nas condições padrões estabelecidos pela análise do grupo anterior para remoção de heparina, no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do CPqRR. Em seguida, as 1.200 amostras de plasma contendo heparina e as 1.200 amostras de plasma tratadas com Ecteola-Celulose®, denominadas de pseudo-soro, foram encaminhadas ao LATEV/Bio-Manguinhos/Fiocruz no Rio de Janeiro para a dosagem de anticorpos neutralizantes contra febre amarela pelo PRNT.

Finalmente, um terceiro grupo de amostras de plasma foi incluído na validação do protocolo de remoção de heparina do plasma com Ecteola-Celulose®, correspondendo às amostras de plasma do Estudo Complementar I que também foram coletadas em tubo contendo heparina sódica. Após o estabelecimento das condições padrões pelos grupos anteriores, essas amostras também foram tratadas com Ecteola-Celulose® e, por apresentarem o controle de coletas pareadas pré e 30 a 45 dias após a vacinação – tempo adequado para a detecção de soroconversão, contribuíram para a finalização do protocolo em questão, incluindo a identificação de um novo ponto de corte para o PRNT quando realizado em amostras de “pseudo-soro”.

Após conclusão do protocolo de remoção de heparina do plasma utilizando Ecteola-Celulose®, os novos testes de PRNT realizados nas amostras de plasma do Estudo Matriz e Estudo Complementar I permitiram avaliar os níveis de anticorpos neutralizantes e a taxa de soropositividade contra febre amarela nos diversos grupos do presente estudo.

#### **3.4.6. Teste Laboratorial – PRNT**

Os títulos de anticorpos neutralizantes dos participantes de pesquisa foram determinados pelo teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT50), conduzido no Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

A primeira etapa do teste consiste na diluição seriada dos soros (fator 2), em placas de 96 orifícios, iniciando-se em 1:5 até 1:640. Um soro padrão proveniente de macaco Rhesus, previamente calibrado frente a um soro de referência internacional da OMS e vacinado (apresentando alto título de anticorpos neutralizantes para febre amarela) é utilizado como controle positivo. Para a etapa seguinte de neutralização, uma suspensão viral – na diluição ideal para que se obtenha uma média de 20-40 placas de lise por orifício (determinada previamente) – é preparada para que, na proporção 1:1, seja adicionada em todos os orifícios da placa; isto é, todas as diluições dos soros recebem a mesma concentração viral. Após 1 hora de neutralização em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, uma suspensão de células Vero (preparada no momento do uso) é adicionada a cada orifício da placa para que ocorra a adsorção dos vírus não neutralizados. Depois de um período de 3 horas de incubação na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante é substituído por um meio semissólido (Meio 199 em carboximetilcelulose a 3%) e as placas são novamente incubadas na estufa por 6 dias. Após esse período, as monocamadas são fixadas com formol a 5%, lavadas até a completamente remoção do meio semissólido e coradas com cristal violeta a 0,04%. A contagem das placas de lise é realizada no analisador BioSpot (CTL Biospot®).

O título de anticorpos neutralizantes é definido como a recíproca da última diluição do soro que reduz em 50% o número de placas de lise em comparação ao controle viral. O título foi determinado por regressão linear, por interpolação das diluições correspondentes ao número de placas de lise imediatamente acima e abaixo do *end-point* determinado – ponto onde há redução de 50% do número das placas de lise em relação ao número destas obtidas no controle de vírus.

O ponto de corte utilizado foi 1:10, definido durante a validação do método de remoção da heparina com Ecteola-Celulose®. A partir desse critério, os participantes de pesquisa foram classificados em 3 grupos de acordo com os títulos de anticorpos obtidos após a vacinação: (i) *soropositivos*, títulos de anticorpos maiores ou iguais a 1:10 na recíproca da diluição; (ii) *indeterminados*, títulos de anticorpos maiores ou iguais a 1:5 e menores que 1:10 na recíproca da diluição; (iii) *soronegativos*, títulos inferiores a 1:5 na recíproca da diluição.

Os resultados de soropositividade contra febre amarela e os títulos médios geométricos fornecidos por este teste de PRNT, realizado nas amostras de plasma do Estudo Matriz e do Estudo Complementar I, tratadas com Ecteola-Celulose®, serão utilizados nas análises de duração de imunidade do presente estudo.

### 3.5. Análise dos Dados

Foram excluídos da análise aqueles que não cumpriram as exigências contidas nos protocolos dos estudos – Matriz e Complementar I – em relação à (i) idade de inclusão fora do intervalo de 9 meses a 12 anos para o Estudo Matriz e de 9 a 23 meses de idade para o Estudo Complementar I; (ii) idade da primovacinação contra febre amarela inferior a 9 meses e superior a 23 meses; (iii) critérios de elegibilidade clínica como doenças autoimunes; imunodepressão transitória ou permanente induzida por doenças ou pelo tratamento; hemoglobinopatias; antecedentes de transfusão de sangue ou de tratamento com soro hiperimune até 90 dias antes da coleta de sangue. Especificamente no estudo Complementar I, no qual ocorreu vacinação contra febre amarela durante o estudo, foram excluídas crianças que receberam alguma vacina no período de 30 dias antes ou depois da referida vacina. A análise estatística foi realizada utilizando os programas estatísticos SPSS® (SPSS Inc., Chicago, Illinois) e R (R Development Core Team 2008).

As variáveis do estudo estão sumarizadas na Tabela 5. A variável-resposta de interesse é o título sérico de anticorpos neutralizantes, em recíproca da diluição e transformado em logaritmos de base 10. A partir dos resultados dos títulos de anticorpos neutralizantes, os participantes de pesquisa foram classificados de acordo com o seu estado sorológico, em “soropositivos”, “indeterminados” e “soronegativos”. A proporção de soropositividade e a média dos títulos de anticorpos foram estimadas, com seus respectivos intervalos de 95% de confiança, para cada grupo de tempo de vacinação. Foi calculada também a média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes contra febre amarela e, para esse fim, os títulos que estavam abaixo do limiar de detecção do método (menor que “5” na recíproca da diluição) foram arbitrados em “1:2,5” por ser o ponto médio entre os valores “0” e “5”. Em relação à categoria aberta (sem limite superior definido, designada “maior que 640”), optou-se por arbitrar o valor da diluição imediatamente acima, “1:1280”, de modo a distinguir os resultados 640 e >640 (recíproca da diluição).

Para a análise das diferenças na resposta imunológica entre os grupos de comparação, a principal variável exploratória de interesse é o tempo em meses após a vacinação. O tempo foi analisado como variável contínua e, posteriormente, classificado em categorias estabelecidas de acordo com o verificado na distribuição dos tempos pós-vacinais de modo a acomodar as variações observadas nos voluntários quanto aos grupos de tempo previstos no protocolo do Estudo Matriz. Assim, as categorias aplicadas à variável tempo após a vacinação foram: “0 a 6 meses” (aproximação da categoria de referência de 30 a 45 dias); “7 a 18

meses” (aproximadamente um ano após a vacinação), “19 a 30 meses” (aproximadamente dois anos após a vacinação), “31 a 72 meses” (aproximadamente quatro anos após a vacinação), “73 a 100 meses” (aproximadamente sete anos após a vacinação) e “acima de 100 meses” (aproximadamente dez anos após a vacinação). A flexibilização na categorização dos tempos de vacinação considerou que os pontos de corte dessa variável contínua foram definidos pelo ponto de inflexão da curva de distribuição, permitindo delimitar melhor subgrupos mais homogêneos internamente.

Variável Resposta	
Título de anticorpos neutralizantes no soro	1. Contínuo, em recíproca da diluição e transformação log 10 2. Categórica: Soropositivo Indeterminado Soronegativo
Variáveis Exploratória Principal	
Tempo após a vacinação	1. Contínua, em dias ou meses 2. Categórica: 0 a 6 meses 7 a 18 meses 19 a 30 meses 31 a 72 meses 73 a 100 meses Acima de 100 meses
Co-variáveis	
Idade	Contínua, em meses
Gênero	Dicotômica masculino ou feminino
Antecedentes de vacinação (aplicação de vacinas injetáveis de vírus vivos atenuados simultaneamente ou em até 30 dias antes da vacina contra febre amarela)	Dicotômica: sim, não
Idade na dose mais recente das vacinas contra tuberculose, hepatite B, poliomielite, difteria-tétano-pertussis, sarampo-rubéola-caxumba, rotavírus, e outras (especificadas)	Contínua, em meses
Antecedentes de doenças graves (internação hospitalar, seqüelas, incapacidade)	Dicotômica: sim, não
Co-morbidade (medicamentos utilizados à época da coleta de sangue)	Dicotômica: sim, não
Antecedentes de viagens a áreas de risco de transmissão de febre amarela	Dicotômica: sim, não

**Tabela 5:** Descrição das variáveis do estudo.

O grupo de “0 a 6 meses após a vacinação” (aproximação do “Grupo 1 - 30 a 45 dias de vacinação”) foi tomado como referência para comparação da proporção de soropositivos nos demais grupos de tempo após vacinação (aproximação dos grupos “2”, “3”, “4”, “5” e “6”, ou seja, com tempo de vacinação de cerca de “1”, “2”, “4”, “7” e “10 anos”). A significância estatística para as diferenças nas proporções de soropositividade entre os tempos foi avaliada pelo teste qui-quadrado de Pearson.

A distribuição dos logaritmos (base 10) dos títulos de anticorpos foi comparada em gráficos *box-plot*. As médias geométricas dos títulos de anticorpos após um ano e mais de

vacinação foram comparadas à média geométrica dos títulos da categoria de 0 a 6 meses do Estudo Matriz.

Para os dados obtidos a partir do Estudo Matriz, análise multivariada do estado sorológico foi usada para ajustar o efeito das covariáveis de interesse na associação entre estado sorológico e tempo de vacinação. A resposta imunológica à vacina contra febre amarela (variável resposta), indicada pelo  $\log_{10}$  dos títulos de anticorpos em recíproca da diluição no modelo de regressão múltipla e pela soropositividade no modelo de regressão logística, foi avaliada em função do tempo desde a primovacinação (variável explicativa), apresentado de forma contínua e categórica (0 a 6 meses; 7 a 18 meses; 19 a 30 meses; 31 a 72 meses; 73 a 100 meses; acima de 100 meses). As covariáveis incluídas no modelo foram idade; gênero; aplicação de vacinas injetáveis de vírus atenuados simultaneamente ou em até 30 dias antes da vacinação contra febre amarela; idade na dose mais recente das vacinas contra tuberculose, hepatite B, poliomielite, difteria-tétano-pertussis, sarampo-caxumba-rubéola, rotavírus e outras; antecedentes de doenças graves; comorbidades; antecedentes de viagens a áreas de risco de transmissão de febre amarela (Tabela 5). Por “viagem para outras áreas de risco para febre amarela” entende-se como viagens a outras áreas com recomendação de vacinação desde a vacinação contra febre amarela e a avaliação da imunogenicidade do presente estudo. Foram considerados como “antecedentes de doenças graves” aqueles agravos à saúde que levaram à hospitalização por mais de um dia e/ou representaram risco de morte iminente ou sequelas permanentes, segundo relato dos responsáveis pelos participantes de pesquisa, na história patológica progressiva. Estava prevista a estratificação pelo estado sorológico para dengue no momento da coleta de sangue para avaliação de imunogenicidade à febre amarela, no entanto, não foi possível realizar sorologia para dengue no Estudo Matriz.

Na análise de regressão linear múltipla, a variável resposta (títulos de anticorpos contra febre amarela na recíproca da diluição) foi inserida em  $\log_{10}$  por ter sido a transformação indicada como a de melhor desempenho para análise, por corrigir assimetrias na distribuição dos dados sorológicos. Iniciou-se com um modelo completo, incluindo todas as variáveis descritas no Quadro 1 do Apêndice 2. No entanto, algumas dessas variáveis apresentavam muitos dados faltantes e não entraram na modelagem. A partir do modelo inicial, chamado de Modelo 1, foram testados outros modelos até a seleção do modelo final. Todo o processo de modelagem, incluindo as saídas dos softwares, está descrito no Apêndice 2.

Análise multivariada foi realizada também por regressão logística, considerando como variável resposta a presença ou ausência de soropositividade à vacina contra febre amarela, de acordo com o tempo de avaliação após a vacinação. As covariáveis consideradas nos modelos foram as mesmas avaliadas por regressão linear múltipla e encontram-se descritas no Quadro 2 do Apêndice 2. Iniciou-se a modelagem com o modelo completo (Modelo 1), incluindo a variável explicativa categórica “tempo desde a vacinação” (categoria de referência foi o grupo de vacinados há 30-45 dias) e as covariáveis possíveis de inserção no modelo.

Os resultados relativos à imunidade humoral foram comparados aos dados parciais de imunidade celular, obtidos a partir de análises realizadas em amostras de sangue total coletadas simultaneamente às amostras objeto do presente protocolo de pesquisa, na qual um grupo de pesquisadores do CPqRR/Fiocruz avaliou o impacto do antígeno vacinal da febre amarela (FA) 17DD na fenotipagem de marcadores de memória imunológica celular e na produção de citocinas solúveis (Campi-Azevedo et al, 2015; Rezende, 2014).

### **3.6. Aspectos éticos**

O protocolo do presente estudo foi elaborado em conformidade com a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública-Fiocruz (CAAE: 45946915.1.0000.5240) – Anexo 8. O protocolo de pesquisa do Estudo Matriz “Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças” havia sido elaborado de acordo com a com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública-Fiocruz (CAAE: 0014.0.031.000-10) – Anexo 5. Os protocolos do “Estudo Complementar da Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças”, também chamado de “Estudo Complementar I” e do processo de remoção da heparina com Ecteola-Celulose® foram elaborados em conformidade com a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqRR (CAAE: 25315213.6.0000.5091 e CAAE: 47136115.0.0000.5091, respectivamente) – Anexos 6 e 7.

No momento da inclusão nos estudos Matriz e Complementar I, foram apresentados termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE; Anexos 1 e 2) aos responsáveis legais pelas crianças, contendo os objetivos, métodos, benefícios e riscos da pesquisa, além de

indicações de como obter esclarecimentos sobre os estudos. Após leitura, esclarecimentos e assinatura daquelas que concordaram em participar, uma cópia foi entregue ao responsável pelo participante de pesquisa. Os procedimentos do estudo envolviam coletas de sangue e de dados pessoais, incluindo histórico de saúde dos participantes de pesquisa, considerados de baixo risco e explicitados no TCLE. O sigilo e confidencialidade dos dados foram e serão mantidos em todas as etapas da pesquisa.

#### **4. RESULTADOS**

A coleta de dados do Estudo Matriz - “Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças” - ocorreu de agosto de 2010 a julho de 2011, nas unidades de saúde “Nacional” e “Petrolândia”, no município de Contagem, e “Expedito Monteiro Assunção” e “Alarico Modesto”, em Ribeirão das Neves, todas localizadas no Estado de Minas Gerais, Brasil (Tabela 6).

Foram incluídos 1195 participantes de pesquisa com idades entre 10 meses e 17 anos e 7 meses. No entanto, considerando a proposta do Estudo Matriz de avaliar amostras de sangue de crianças entre 9 meses e 12 anos de idade, 21 participantes da pesquisa do Estudo Matriz foram excluídos da análise por apresentarem idade superior a 12 anos no momento da coleta de sangue. Assim, estavam elegíveis para análise do presente estudo um total de 1174 crianças, que apresentavam entre 10 meses e 12 anos no momento da avaliação de imunogenicidade pós-vacinal.

De forma semelhante, pelo protocolo do Estudo Matriz, deveriam ser analisadas crianças que receberam vacina contra febre amarela nos primeiros dois anos de idade. Entre os 1195 participantes incluídos, não havia informação sobre data da vacinação contra febre amarela em um deles, não sendo possível, portanto, determinar a idade na vacinação contra febre amarela – critério de elegibilidade para o estudo. Dentre os 1174 participantes de pesquisa elegíveis quanto à idade para inclusão no estudo, 36 haviam sido vacinadas com dois anos ou mais de vida e foram excluídos da análise.

Nenhum participante de pesquisa foi excluído em função dos outros critérios de elegibilidade, como doenças autoimunes, imunodepressão transitória ou permanente induzida por doenças ou pelo tratamento, hemoglobinopatias, e antecedentes de transfusão de sangue ou tratamento com soro hiperimune até 90 dias antes da coleta de sangue

Por conseguinte, o subconjunto sem violação do protocolo, cuja coorte de análise é apresentada no presente estudo, inclui 1138 participantes de pesquisa, os quais apresentavam idade entre 9 meses e 12 anos no momento da avaliação de imunogenicidade e foram primovacinados contra febre amarela nos primeiros 2 anos de vida (até 23 meses e 29 dias de idade).

A coleta de dados do Estudo Complementar I ocorreu de março a agosto de 2015 nas unidades de básicas de saúde “ Expedito Monteiro Assunção” e “Alarico Modesto” do município de Ribeirão das Neves-MG. Nessas unidades, foram incluídas 62 criança, de 9 a 23 meses de idade, não vacinadas contra febre amarela e elegíveis para o estudo, das quais 56 receberam a referida vacina no decorrer do Estudo Complementar I.

#### 4.1. Distribuição dos participantes de pesquisa por unidades de saúde

Houve uma distribuição equilibrada dos participantes de pesquisa do Estudo Matriz entre as unidades de saúde do estudo, tanto para o total de indivíduos incluídos quanto para aqueles que cumpriram os critérios de elegibilidade definidos no protocolo do estudo (Tabela 6).

Unidade de Saúde (Município)	Todos Incluídos		Aderentes ao Protocolo	
	Número	%	Número	%
Alarico Modesto (Ribeirão das Neves)	311	26,0	295	25,9
Expedito Monteiro Assunção (Ribeirão das Neves)	328	27,5	310	27,3
Petrolândia (Contagem)	273	22,8	262	23,0
Nacional (Contagem)	283	23,7	271	23,8
Total	1195	100,0	1138	100,0

**Tabela 6:** Distribuição dos voluntários por unidade de saúde de recrutamento – Estudo Matriz.

O Estudo Complementar I foi conduzido em duas das unidades de saúde do município de Ribeirão das Neves – MG, participantes do Estudo Matriz (Tabela 7), de março a agosto de 2015.

## 4.2. Dados Demográficos

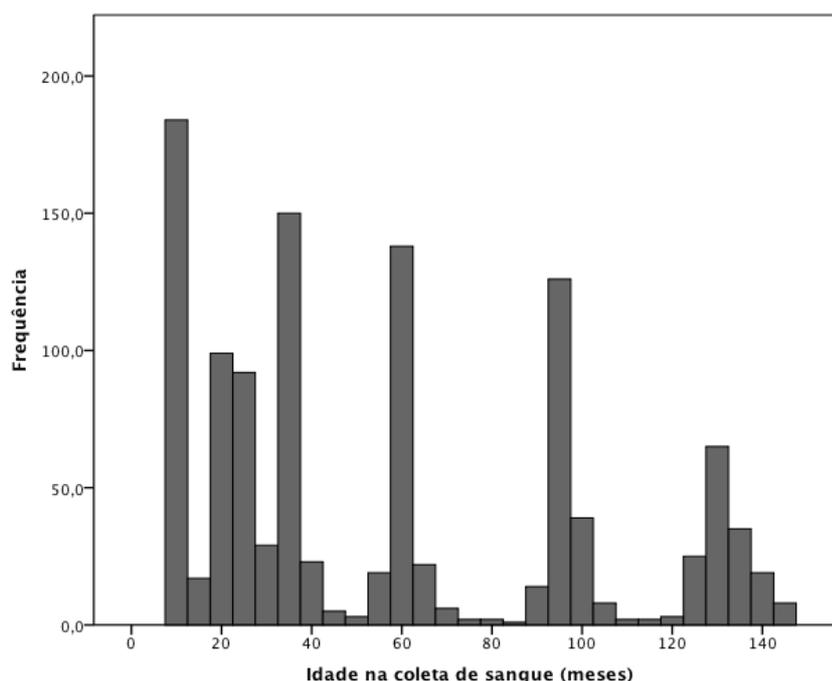
### 4.2.1. Idade

#### *Idade no momento da coleta de sangue para avaliação da imunogenicidade à vacina contra febre amarela*

As idades dos participantes mostram uma configuração multimodal com modas coerentes com os intervalos de vacinação definidos pelo estudo (Figura 9) e média e mediana reduzidas após as exclusões por violação do protocolo descritas acima (Tabela 7).

Participantes de Pesquisa	Número	Idade no dia da coleta de sangue (meses)				
		Mínimo	Máximo	Média	Desvio-padrão	Mediana
Todos Incluídos	1195	10	211	60,2	44,3	46,0
Aderentes ao Protocolo	1174	10	147	58,3	42,1	39,0

**Tabela 7:** Idade dos participantes de pesquisa no momento da inclusão, segundo adesão ao protocolo do estudo.



**Figura 9:** Idade em meses dos participantes de pesquisa elegíveis no momento da inclusão no estudo e coleta de sangue para avaliação de imunogenicidade.

No estudo conhecido como “Estudo Complementar I”, todos os participantes de pesquisa atenderam ao previsto no protocolo do estudo quanto à variável idade de coleta de sangue, não havendo segregação em diferentes coortes de análise.

### *Idade de vacinação contra febre amarela*

A grande maioria das crianças foi vacinada no primeiro ano de vida (Figura 10) sendo aproximadamente 95% dos aderentes ao protocolo vacinados antes dos 15 meses de idade (Tabela 9). A mediana de idade de vacinação contra febre amarela foi de 9 meses, idade mínima rotineiramente preconizada pelo PNI e OMS (Tabela 8; Figura 10).

Participantes de Pesquisa	Idade no dia da vacinação contra febre amarela (meses)					
	Número	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-padrão	Mediana
Todos Incluídos	1194	0*	196	12,5	15,2	9,0
Aderentes ao Protocolo	1145	0**	23	10,0	2,4	9,0

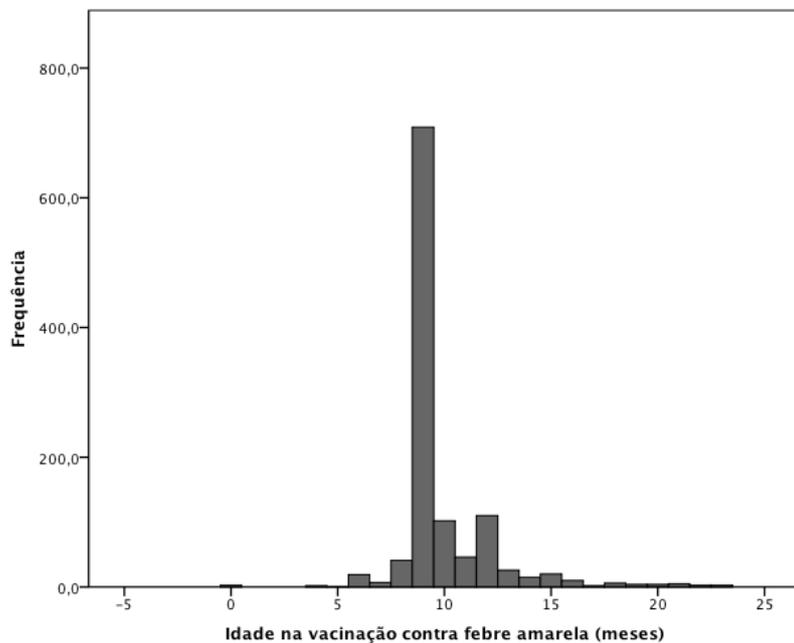
\* 20 dias – provável erro de registro ou de digitação, sem possibilidade de confirmação.

\*\*20 dias - provável erro de registro ou de digitação, sem possibilidade de confirmação.

**Tabela 8:** Idade dos participantes de pesquisa no dia da vacinação contra febre amarela, segundo adesão ao protocolo do estudo.

Entre os participantes de pesquisa considerados como aderentes ao protocolo, ou seja, primovacinados contra febre amarela nos primeiros dois anos de vida e com avaliação do seu perfil imunológico entre 9 meses e 12 anos de idade, dois apresentavam informação de vacinação contra febre amarela aos 20 e 21 dias de vida. Em função da baixa probabilidade de ocorrência desse erro programático de vacinação, consideramos a possibilidade de erro de registro ou de digitação desse dado, o que não foi possível de ser confirmado. Considerado

esses dois registros como falhos e excluindo-os da análise de idade no momento da vacina contra febre amarela, a idade mínima observada foi de 123 dias, com média de 312 dias (10,4 meses) e mediana de 285 dias (9,5 meses).



**Figura 10:** Idade em meses dos participantes de pesquisa elegíveis no momento da vacinação contra febre amarela.

#### **Elegibilidade combinada em relação à idade de inclusão no estudo para avaliação de imunogenicidade à vacina contra febre amarela e idade da primovacinação.**

Dentre os 1174 participantes de pesquisa elegíveis quanto à idade para inclusão no estudo (Tabela 8), 36 haviam sido vacinadas contra febre amarela a partir do segundo ano de vida e, portanto, foram excluídos da análise do presente estudo. Assim, a coorte de análise, apresentada a partir deste ponto, inclui 1138 participantes de pesquisa, com idade entre 9 meses e 12 anos no momento da avaliação de imunogenicidade, e primovacinação contra febre amarela nos primeiros 2 anos de vida (até 23 meses e 29 dias de idade).

#### **4.2.2. Gênero**

Houve uma distribuição equilibrada por gênero entre o total de participantes de pesquisa incluídos no Estudo Matriz e aqueles que cumpriram estritamente os critérios de

elegibilidade (Tabela 9).

<b>Participantes de Pesquisa</b>	<b>Gênero</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Aderentes ao Protocolo	Masculino	561	49,3
	Feminino	577	50,7
	Total	1138	100,0
Todos os Incluídos	Masculino	589	49,3
	Feminino	606	50,7
	Total	1195	100,0

**Tabela 9:** Distribuição dos participantes de pesquisa quanto ao gênero.

Após análise descritiva dos dados demográficos, os resultados referentes aos desfechos de interesse do estudo serão apresentados apenas para aqueles participantes de pesquisa que cumpriram o protocolo do Estudo Matriz e conseqüentemente foram considerados como elegíveis para análise do estudo.

#### **4.3. Intervalo de tempo entre a vacinação contra febre amarela e a coleta de sangue para avaliação de imunogenicidade.**

Eleita como a variável explicativa de interesse maior para o estudo, ou seja, potencialmente capaz de explicar a variação do estado imune após vacinação (hipótese do estudo), aferida pela proporção de soropositividade e média geométrica dos títulos de anticorpos contra febre amarela, o intervalo de tempo entre a vacinação e coleta de sangue para análise do estudo variou de 9 dias a 141 meses (11,8 anos), com média de 46,6 meses, desvio padrão de 40,5 e mediana de 28 meses.

Após análise descritiva global, para todos os indivíduos elegíveis para análise, o intervalo de tempo entre a vacinação contra febre amarela e a coleta de sangue foi distribuída em categorias de tempo que melhor se adequam à curva de distribuição (Figura 9; Tabela 10).

Grupos	Participantes		Tempo após a vacinação				
	Número	%	Intervalo Estimado	Intervalo Observado	Média	Desvio Padrão	Mediana
1	203	17,8	30 a 45 dias	9 a 182 dias*	48,9**	25,0**	42,0**
2	189	16,6	1 ano	7 a 18 meses	13,5	2,0	13,0
3	198	17,4	2 anos	19 a 30 meses	25,2	2,4	25,0
4	201	17,7	4 anos	31 a 72 meses	50,4	5,4	51,0
5	190	16,7	7 anos	73 a 100 meses	85,1	3,4	85,0
6	157	13,8	10 anos	Acima de 100 meses	120,6	5,4	120,0

\*Categoria apresentada nas demais tabelas como de "0 a 6 meses"; \*\* em dias.

**Tabela 10:** Distribuição dos participantes de pesquisa pelos grupos de tempo desde a vacinação contra febre amarela, de acordo com o previsto no protocolo do Estudo Matriz e o observado na análise.

Na categoria de 30 a 45 dias foram incluídas as crianças de até 6 meses após a vacinação, o que pressupõe níveis de anticorpos próximos do máximo induzido pela vacinação (Tabela 10).

Menos de 60% dos participantes de pesquisa apresentavam tempo pós vacinação dentro do previsto para esse grupo (30 a 45 dias). Em função da variação no período em dias entre a vacinação e a coleta de sangue esse grupo chamado de “0 a 6 meses”, não foi considerado como único grupo de referência nesta análise. Para fins de comparação em termos de resposta imune à vacina contra febre amarela entre os diferentes tempos pós-vacinação, o subgrupo de participantes de pesquisa do Grupo 1 do Estudo Matriz, com tempo pós-vacinação dentro do previsto pelo protocolo (30 e 45 dias) e as crianças incluídas no “Estudo Complementar I”, foram considerados neste trabalho como grupos complementares de referência.

A despeito da limitação dos dados do Estudo Complementar I terem sido obtidos em momento diferente dos demais grupos do Estudo Matriz, porém, nas mesmas unidades de saúde e com critérios semelhantes de elegibilidade, ele foi considerado como um dos grupos de referência do presente estudo por ser composto por crianças vacinadas ao longo do estudo, com controle rigoroso dos tempos de coletas de sangue pareadas pré e pós-vacinação e possibilidade de detecção de soroconversão.

#### **4.4. Análise da Imunidade Humoral - PRNT**

No Estudo Matriz, entre os 1138 participantes de pesquisa elegíveis para análise, foi possível realizar a retestagem por PRNT, após tratamento das amostras de plasma com Ecteola-Celulose®, em 824 crianças, para os quais havia material biológico em quantidade suficiente. Houve uma maior proporção de testes não realizados por indisponibilidade de material biológico nas categorias de 19 a 72 meses após a vacinação, porém, as perdas não representaram grande impacto na distribuição das covariáveis mais importantes no subgrupo de 824 participantes analisados em relação ao total de 1138 aderentes ao protocolo do Estudo Matriz (Apêndice 1).

As amostras do estudo complementar em crianças foram coletadas em condições similares ao Estudo Matriz, incluindo a utilização de tubo com heparina e tratamento do plasma com Ecteola-Celulose®. Foram incluídas 56 crianças aderentes ao protocolo do estudo, com idade entre 9 e 23 meses de idade, das quais quatro eram soropositivas pré-vacinação. Entre os 54 participantes de pesquisa com sorologia pré-vacinal negativa, a dosagem de anticorpos neutralizantes pelo PRNT após tratamento do plasma com Ecteola-Celulose® foi realizada em 32, que compõe o grupo de referência do presente estudo.

##### **4.4.1. Proporção de soropositividade segundo tempo após a vacinação contra febre amarela**

###### ***Estudo Matriz***

Entre os indivíduos incluídos no estudo matriz, a proporção de soropositividade para o grupo de referência foi de 86,7%, decrescendo progressivamente até o grupo de 73 a 100 meses após a vacinação contra febre amarela, com ligeira elevação para o último grupo (vacinado há mais de 100 meses), para o qual não se pode descartar a aplicação de uma segunda dose da VFA, pois uma revacinação pode não ter sido registrada em cartão ou pode ter sido omitida pelo responsável pelo participante de pesquisa (Tabela 11).

Tempo após a vacinação	Soronegativo		Indeterminado		Soropositivo		p-valor
	Número	%	Número	%	Número	%	
0 a 6 meses*	9	5,4	13	7,9	143	86,7	0,000
7 a 18 meses	13	9,3	20	14,3	107	76,4	
19 a 30 meses	15	11,0	24	17,7	97	71,3	
31 a 72 meses	28	23,0	22	18,0	72	59,0	
73 a 100 meses	48	35,6	30	22,2	57	42,2	
Acima de 100 meses	36	28,6	32	25,4	58	46,0	

Soronegativo: títulos inferiores a 1:5 na recíproca da diluição

Indeterminado: títulos maiores ou iguais a 1:5 e menores que 1:10 na recíproca da diluição

Soropositivo: títulos maiores ou iguais a 1:10 na recíproca da diluição

**Tabela 11:** Estado sorológico aferido pelo título de anticorpos neutralizantes (PRNT), de acordo com o tempo desde a vacinação.

Entre os 165 indivíduos pertencentes ao grupo 1 (intervalo de 0 a 6 meses após a vacinação), que eram elegíveis pelo protocolo do estudo, 121 (73,3%) apresentaram o tempo pós-vacinal de 30 a 45 dias, considerado como referência para análise do Estudo Matriz. Entre esses, a proporção de soropositividade de 87,6%.

### *Estudo Complementar I*

Proporção de soropositividade semelhante ao encontrado no grupo de referência do Estudo Matriz (Grupo 1) foi observada no Estudo Complementar I (87,5%), ressaltando-se o rigor do controle de soroconversão, propiciado pelas amostras pareadas pré e pós vacinais, previstas nesse último estudo (Tabela 12).

Tempo após a vacinação	Estado Sorológico	Número	%
30 a 45 dias	Soronegativo	3	9,4
	Indeterminado	1	3,1
	Soropositivo	28	87,5
	Total	32	100,0

Soronegativo: títulos inferiores a 1:5 na recíproca da diluição

Indeterminado: títulos maiores ou iguais a 1:5 e menores que 1:10 na recíproca da diluição

Soropositivo: títulos maiores ou iguais a 1:10 na recíproca da diluição

**Tabela 12:** Estado sorológico no período pós-vacinação imediato, aferido pelo título de anticorpos neutralizantes (PRNT).

#### 4.4.2. Médias geométricas dos títulos de anticorpos segundo tempo de vacinação.

##### *Estudo Matriz*

Em relação às médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes contra febre amarela, em recíproca da diluição, obtidos pelo método do PRNT, observou-se uma queda progressiva desde a categoria de referência (“0 a 6 meses”) até a categoria de 73 a 100 meses após a vacinação. Para os vacinados há mais de 100 meses, o título médio geométrico é um pouco maior que a categoria imediatamente anterior (Tabela 13). Conforme mencionado anteriormente, este subgrupo etário pode ter incluído indivíduos com títulos mais elevados pela revacinação não detectada nos registros ou na entrevista.

Quanto à distribuição dos títulos de anticorpos em log<sub>10</sub> por categoria de tempo após a vacinação, observa-se uma menor concentração dos valores dos títulos à direita da linha do ponto de corte para soropositividade (1,0 log<sub>10</sub>) e aumento correspondente no número de indivíduos à esquerda do ponto de corte, representando uma redução da proporção de soropositivos a medida que aumenta o tempo após a vacinação (Figura 11).

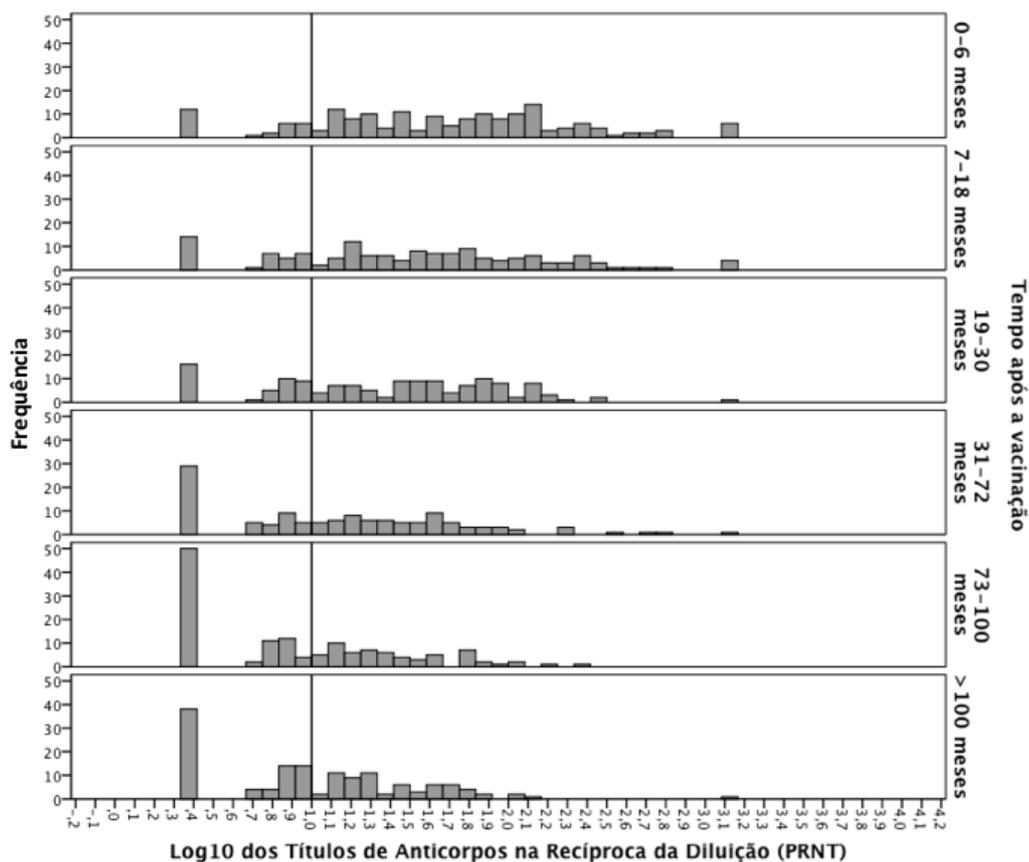
Tempo desde a vacinação	Número	TGM	LI	LS
0 a 6 meses	165	47,9	38,3	59,9
7 a 18 meses	140	33,2	25,9	42,5
19 a 30 meses	136	25,0	20,0	31,2
31 a 72 meses	122	14,8	11,6	19,1
73 a 100 meses	135	8,6	7,1	10,5
Superior a 100 meses	126	10,0	8,2	12,1
Total	824	20,2	18,3	22,3

TGM: Título médio geométrico

LI: limite inferior do intervalo de confiança de 95%

LS: limite superior de intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 13:** Títulos geométricos médios de anticorpos e seus intervalos de confiança de 95%, em recíproca da diluição, segundo o tempo após a vacinação, na coorte que aderiu ao protocolo do estudo.



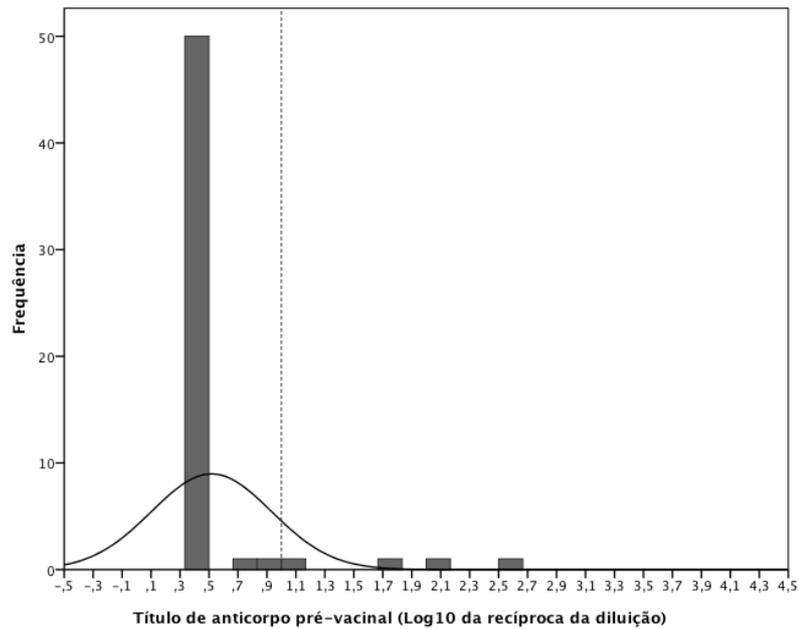
A linha vertical indica o ponto de corte para soropositividade: 1,0 log<sub>10</sub> (10,0 na recíproca da diluição).

**Figura 11:** Distribuição dos títulos de anticorpos (log<sub>10</sub> da recíproca da diluição do PRNT), por tempo após a vacinação.

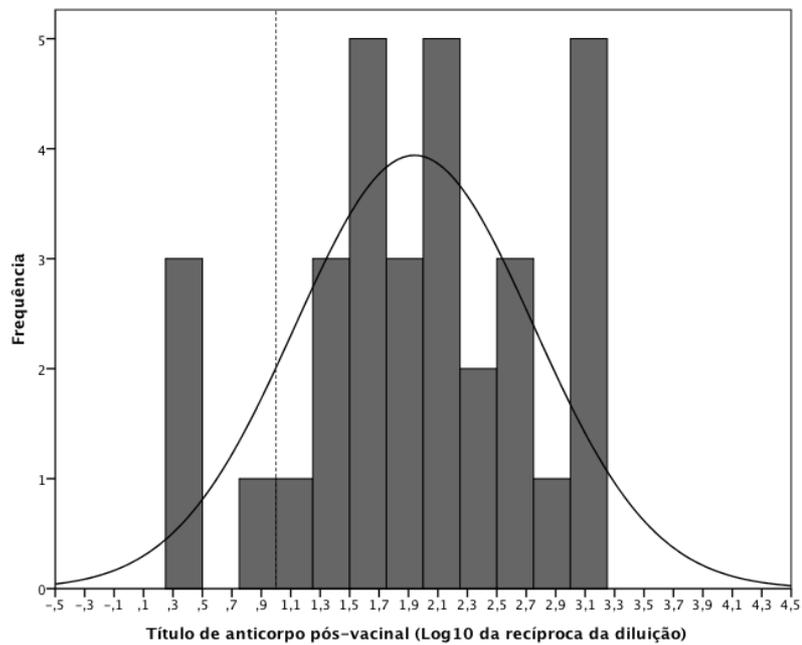
### *Estudo Complementar I*

Cerca de 30 a 45 dias após a vacinação, a média geométrica dos títulos de anticorpos contra febre amarela, em recíproca da diluição, obtidos pelo PRNT após tratamento do plasma com Ecteola-Celulose®, nas crianças vacinadas no Estudo Complementar I e sabidamente soronegativas pré-vacinação foi de 87,1 (IC 95%=44,5; 170,6), valor acima do observado para o grupo de referência do Estudo Matriz (“0 a 6 meses” após a vacinação).

A Figura 12 representa o deslocamento dos títulos de anticorpos contra febre amarela para à direita da linha de ponto de corte para soropositividade no período de 30 a 45 dias após a vacinação (B) em relação ao período pré-vacinal (A).



**A. Pré-Vacinal**



**B. Pós-Vacinal**

Linha vertical pontilhada representa limite de soropositividade.

**Figura 12:** Distribuição dos títulos de anticorpos (log10 da recíproca da diluição do PRNT), nos tempos pré-vacinal e 30-45 dias após vacinação, observado no Estudo Complementar I -

#### 4.4.3. Resumo da imunidade humoral segundo tempo após a vacinação

As Tabelas 14 e 15 e apresentam os valores de soropositividade e média geométrica dos títulos de anticorpos contra febre amarela, em recíproca da diluição, por categoria de tempo pós-vacinação para o Estudo Matriz e para o Estudo Complementar I, respectivamente. É possível observar a semelhança em relação à proporção de soropositividade entre os dois grupos de referência deste estudo (Grupo 1 do Estudo Matriz e Estudo Complementar I), além da redução da soropositividade e média geométrica dos títulos no Estudo Matriz à medida que aumenta o tempo após a vacinação. Chama atenção o valor do TGM do Estudo Complementar I consideravelmente maior que o do grupo de referência do Estudo Matriz, o que pode ser explicado pela inclusão apenas de indivíduos soronegativos pré-vacinação na análise do primeiro.

Grupos	Tempo desde a vacinação	Soropositividade		TGM*	Limites de 95% de Confiança	
		Número	%		Inferior	Superior
1	0 a 6 meses**	143	86,7	47,9	38,3	59,9
2	7 a 18 meses	107	76,4	33,2	25,9	42,5
3	19 a 30 meses	97	71,9	24,4	19,6	30,3
4	31 a 72 meses	72	59	14,8	11,6	19,1
5	73 a 100 meses	57	42,2	8,6	7,1	10,6
6	Superior a 100 meses	58	46	9,9	8,1	12,0

\*TGM: Título médio geométrico

\*\*9 a 190 dias

**Tabela 14:** Soropositividade e título médio geométrico, por categoria de tempo após a vacinação – Resumo Imunogenicidade - Estudo Matriz.

### *Estudo Complementar I*

Grupo	Tempo após a vacinação		Soropositividade		TGM	Limites de 95% de Confiança	
	Intervalo Estimado	Intervalo Observado	Número	%		Inferior	Superior
Estudo Complementar I	30 a 45 dias	30 a 45 dias	28	87,5	87,1	44,5	170,6

**TGM:** Título médio geométrico

**Tabela 15:** Soropositividade e título médio geométrico cerca de 30 a 45 dias após a vacinação, em crianças vacinadas entre 9 e 23 meses de idade – Estudo Complementar I.

#### **4.4.4. Análise Multivariada**

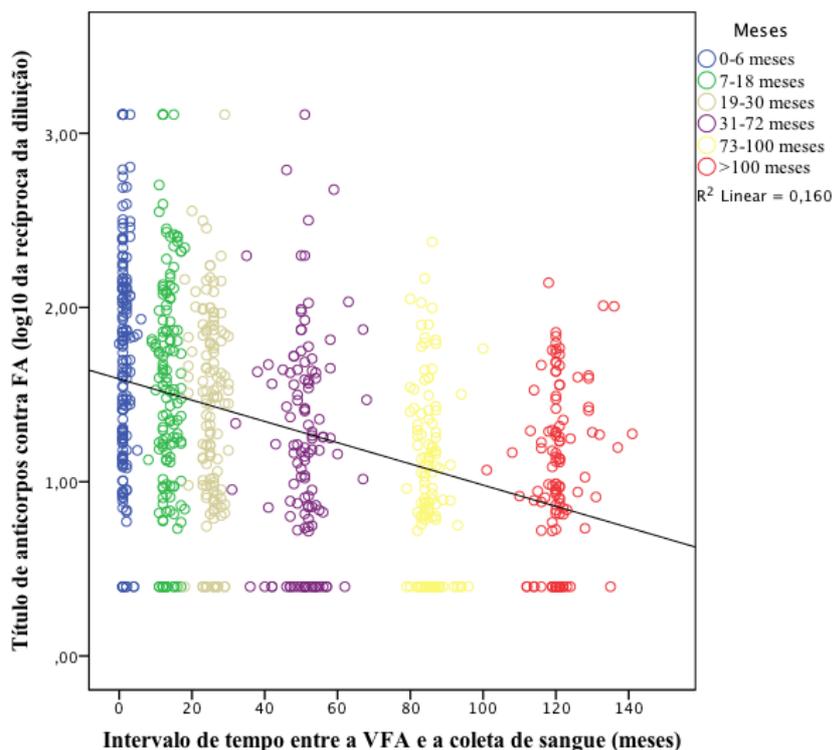
Para os dados obtidos pelo Estudo Matriz, foi realizada análise multivariada com o objetivo de avaliar a relação entre a resposta à vacina contra febre amarela aferida pelos títulos de anticorpos neutralizantes (variável resposta) e o tempo pós-vacinação contra febre amarela (variável explicativa), considerando a presença de covariáveis, estudadas a partir de modelos de regressão linear múltipla e regressão logística. As saídas dos softwares utilizados nessa análise estão sumarizadas no Anexo 9.

##### **4.4.4.1. Regressão Linear Múltipla**

A variável resposta (“títulos de anticorpos contra febre amarela na recíproca da diluição”) foi inserida em log 10 por ter sido a transformação indicada como a de melhor desempenho para análise ao corrigir assimetrias observadas na distribuição dos dados sorológicos ao se utilizar os títulos em escala linear.

A variável independente “tempo desde a vacinação”, considerada como variável explicativa principal neste estudo, foi mantida em todo o processo de modelagem, descrito no Apêndice 2.

A análise exploratória entre a variável explicativa contínua “tempo desde a vacinação” e a variável dependente ou resposta em log10, demonstrou uma correlação significativa, com coeficiente de correlação de Spearman de -0,415 (p-valor=0,000).



**Figura 13:** Diagrama de dispersão dos títulos de anticorpos contra febre amarela ( $\log_{10}$ ) e o tempo após a vacinação.

A Figura 13 demonstra uma tendência de linearidade entre as duas variáveis contínuas, com imagem de cluster ao redor das categorias definidas para o tempo desde a vacinação contra febre amarela e redução dos títulos de anticorpos à medida que aumenta o tempo desde a vacinação em meses. Na análise bivariada observou-se uma associação significativa entre as variáveis dependente e independente, porém, com um baixo coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,16$ ).

Ao considerar a variável explicativa principal em categorias de tempo desde a vacinação, rejeitou-se a hipótese nula de igualdade entre as medidas dos títulos de anticorpos e  $\log_{10}$  (ANOVA,  $p\text{-valor} = 0,000$ ) e a hipótese de homogeneidade das variâncias (Teste de Levene,  $p\text{-valor} = 0,012$ ).

Na análise de regressão linear múltipla, com a variável dependente em  $\log_{10}$ , em função do observado na Figura 13, foi mantida a variável explicativa tempo desde a vacinação contra febre amarela em categorias, com adição das covariáveis passíveis de modelagem, uma a uma. O modelo final selecionado foi o denominado Modelo 6 (Apêndice 2), contendo variável explicativa categórica citada anteriormente e a covariável antecedente de doenças,

além das variáveis do tipo dummy citadas no Apêndice 2 (*Modelo 6:  $y \sim tempVaxFA\_cat + ante\_dça\_grave + dummy + dummy2$* ). Os coeficientes obtidos pelo Modelo 6 estão descritos na Tabela 16.

	Variáveis	Coefficientes	p-valor
Tempo desde a vacinação	0 a 6 meses - Referência		
	7 a 18 meses	-0,06890	0.0885
	19 a 30 meses	-0,07887	0.0548
	31 a 72 meses	-0,20632	1.58e-06
	73 a 100 meses	-0,26066	1.74e-09
	Acima de 100 meses	-0,26872	2.59e-09
Antecedente de doença grave	Não - Referência		
	Sim	-0,06087	0.0507
Dummy	Não - Referência		
	Sim	0,92386	< 2e-16
Dummy 2	Não - Referência		
	Sim	1,09632	< 2e-16

**Tabela 16:** Coeficientes de regressão observados no modelo final da regressão linear múltipla.

O modelo final (Modelo 6) apresentou um poder de explicação de 70,39%, porém, persistiram os problemas nos seus pressupostos, com erros não aleatórios ( $p < 2.2e-16$ , teste de correlação de Pearson), não normalmente distribuídos ( $p\text{-valor} = 2.177e-07$ , teste de Shapiro-Wilk) e com heterocedasticidade ( $p\text{-valor} = 6.627e-05$  para o teste de homocedasticidade). A modelagem não pode resolver algumas das limitações dos dados, como acurácia da variável resposta, distribuição dos tempos pós-vacinação em clusters em torno dos tempos pré-definidos pelo protocolo do Estudo Matriz e a indisponibilidade de variáveis com potencial para explicar as variações nos títulos. No entanto, mesmo assim, a correlação com a variável explicativa de maior interesse não pareceu ameaçada por nenhuma covariável.

#### 4.4.4.2. Regressão Logística

A razão de chances (OR) para a ocorrência de soropositividade à vacina contra febre amarela para cada a variável explicativa e covariáveis elencadas para a regressão logística (OR brutas) estão descritas na Tabela 17.

Pela análise bivariada, considerando as ORs brutas, é possível observar associação estatisticamente significativa para a variável explicativa “Tempo desde a vacinação” e

significância limítrofe para a covariável “Viagem para outras áreas de risco para FA” (limite superior do intervalo de confiança de 95% para a razão de chances próximo a 1,0).

Variáveis	OR	IC 95%	
		Inferior	Superior
Tempo desde a vacinação	0 a 6 meses - Referência		
	7 a 18 meses	0,50	0,28
	19 a 30 meses	0,38	0,21
	31 a 72 meses	0,22	0,13
	73 a 100 meses	0,11	0,06
	Acima de 100 meses	0,13	0,07
Sexo	Masculino - Referência		
	Feminino	0,97	0,73
Antecedente de doença grave	Não - Referência		
	Sim	0,84	0,59
Comorbidade	Não - Referência		
	Sim	0,97	0,64
Viagem para outras áreas de risco para FA	Não - Referência		
	Sim	0,70	0,51
Recebeu vacina viva nos 30 dias antes da vacinação	Não - Referência		
	Sim	0,79	0,46

#### A. Variáveis Categóricas

Variáveis	OR	IC 95% PARA OR	
		Inferior	Superior
Tempo desde a vacinação	0,98	0,98	0,99
Idade na coleta de sangue	0,98	0,98	0,99
Idade na aplicação da vacina BCG	1,00	0,99	1,01
Idade na aplicação da vacina Hepatite B	1,00	1,00	1,01
Idade na aplicação da vacina Poliomielite	0,97	0,97	0,98
Idade na aplicação da vacina Tetravalente	0,99	0,98	1,00
Idade na aplicação da vacina TVV	0,98	0,98	0,99
Idade na aplicação da vacina MenC	0,98	0,97	1,00
Idade na aplicação da vacina Pneumo10	0,93	0,89	0,96
Idade na aplicação de outra vacina 1	1,00	1,00	1,00
Idade na aplicação de outra vacina 2	0,99	0,99	1,00
Idade na aplicação de outra vacina 3	1,00	0,98	1,02

#### B. Variáveis Contínuas

**Tabela 17:** Razão de Chances (Odds Ratio – OR) brutas para a variável explicativa e todas as covariáveis estudadas - categóricas (A) e contínuas (B).

Segundo o descrito no Apêndice 2, essas variáveis foram inseridas num modelo de análise multivariada por regressão logística, e o modelo selecionado pelo seu potencial para explicar variações na variável resposta binária (ausência ou presença de soropositividade pós-vacinal) foi aquele incluindo apenas a variável explicativa “tempo desde a vacinação”, cujas razão de chances para cada uma de suas categorias estão descritas na Tabela 18. A categoria de referência para essa variável explicativa foi aquela composta por indivíduos recém-vacinados (0 a 6 meses após a vacinação).

Variáveis explicativas categóricas		OR	IC 95%		Tabela 18: Razão de Chances
			Inferior	Superior	
Tempo desde a vacinação	0 a 6 meses - Referência	1,00	-	-	
	7 a 18 meses	0,50	0,28	0,90	
	19 a 30 meses	0,38	0,21	0,69	
	31 a 72 meses	0,22	0,13	0,39	
	73 a 100 meses	0,11	0,06	0,20	
	Acima de 100 meses	0,13	0,07	0,23	

(Odds Ratio – OR) variável explicativa incluída no modelo final.

A análise de razão de chances (*odds ratio*) demonstrou uma redução da chance de soropositividade contra febre amarela a medida que aumenta o tempo pós-vacinação, especialmente até a categoria de 100 meses, ou seja, cerca de 8,3 anos após a vacinação.

#### 4.5. Análise Comparativa entre Imunidade Humoral e Imunidade Celular

As análises de imunidade celular, desenvolvida por pesquisadores do CPqRR, e que permitiriam a comparabilidade com os dados de imunidade humoral desta tese, ainda estão em curso. Não foi possível, portanto, realizar análise comparativa entre os dados de imunidade humoral e celular como previsto no projeto de tese. No entanto, os dados parciais disponíveis, citados na seção Introdução, serão discutidos mais adiante em relação aos achados de imunidade humoral.

## 5. DISCUSSÃO

O conhecimento sobre a duração da imunidade contra febre amarela é fundamental para a tomada de decisão a respeito da necessidade de revacinação contra essa doença e o melhor momento para fazê-la. Correlatos sorológicos de proteção para febre amarela não

estão estabelecidos em humanos, porém, evidências de efetividade dos programas de imunização no controle da febre amarela sugerem que os indivíduos soropositivos após a vacinação estão protegidos contra a doença (Monath et al, 2008). Assim, soronegatividade não significa ausência de proteção, no entanto, o aumento na ocorrência de falhas primárias e falhas secundárias são plausíveis com a redução dos níveis de anticorpos.

No ano de 2013, a OMS retirou a recomendação de reforço da vacina contra febre amarela a cada 10 anos, considerando como suficiente, em termos gerais, dose única da vacina (World Health Organization, 2013b). Entretanto, essa decisão sobre a retirada de doses de reforço da vacina contra febre amarela ainda é controversa e necessita de evidências científicas convincentes (Collaborative Group for Studies on Yellow Fever Vaccines, 2014). No Brasil, alguns estudos foram planejados para esse fim e a retirada de reforço ainda não foi adotada, de modo que o Programa Nacional de Imunizações recomenda uma dose de reforço aos 4 anos, após vacinação primária aos 9 meses de idade.

O estudo de duração de imunidade em adultos conduzido no Brasil, com dados de imunidade humoral, concluiu que a revacinação contra febre amarela para esse grupo não seria apenas necessária, como também deveria ser antecipada em função da elevada proporção de indivíduos soronegativos e dos baixos títulos médios geométricos de anticorpos neutralizantes contra febre amarela observados em torno de cinco anos após a vacinação, com queda progressiva até cerca de 10 a 11 anos, em comparação com indivíduos vacinados há até 45 dias antes da avaliação (Collaborative Group for Studies on Yellow Fever Vaccines, 2014).

O presente estudo preencheu uma lacuna de informação sobre duração de imunidade contra febre amarela em crianças vacinadas nos primeiros dois anos de vida, faixa etária etária-alvo para vacinação rotineira em áreas endêmicas de acordo com a recomendação da OMS (World Health Organization, 2013b). A soropositividade mais baixa em lactentes recém-vacinados, comparada à observada em adultos, foi seguida de redução dos títulos de anticorpos neutralizantes ao longo dos anos após a vacinação, com redução substancial da proporção de soropositividade contra febre amarela, assim como dos títulos médios geométricos com a passagem do tempo após a vacinação. A redução foi semelhante, porém mais acentuada do que no estudo em adultos (Collaborative Group for Studies on Yellow Fever Vaccines, 2014). A proporção de soropositividade foi inferior a 60% para o grupo de vacinadas entre 31 e 72 meses atrás (mediana de 51 meses ou 4,25 anos) e inferior a 50% naqueles indivíduos vacinados há 73 a 100 meses antes da coleta de sangue (mediana de 85

meses ou 7 anos). Para o grupo com mediana de tempo desde a vacinação de 120 meses (ou 10 anos) a proporção de soropositividade foi de 46%, ligeiramente superior ao grupo de tempo imediatamente anterior, justificada possivelmente por uma segunda dose não registrada da vacina contra febre amarela, o que seria um critério de exclusão para o presente estudo.

Resultado semelhante ao encontrado em relação às proporções de soropositividade foi observado na análise dos títulos médios geométricos que apresentaram redução progressiva na análise comparativa dos sucessivos intervalos de tempo entre a primovacinação contra febre amarela e a coleta de sangue para avaliação de imunogenicidade, chegando a uma queda de aproximadamente 5 vezes nos títulos daquelas vacinados com cerca de 85 meses (7 anos) em relação ao grupo de recém-vacinado (30 a 45 dias).

As análises bivariada e multivariada, com algumas limitações, demonstraram a atuação do tempo entre a vacinação contra febre amarela e a coleta de sangue para avaliação de imunogenicidade, na explicação das alterações nos títulos de anticorpos contra febre amarela.

Em relação à comparação com dados de imunidade celular em crianças, a despeito dos resultados parciais apresentados por Rezende (2014) sugerirem necessidade de complementação do estudo (como a identificação de novos biomarcadores, a inclusão de um grupo controle composto por crianças não vacinadas e de um grupo com mais de 10 anos de vacinação para avaliação do comportamento da resposta imune a longo prazo), foi possível observar uma coerência em relação aos achados de duração de imunidade obtidos pela análise de anticorpos neutralizantes. Segundo os autores houve uma redução dos índices de  $CD4^+$  *naïve*,  $CD4^+$  memória central e  $CD4^+$  memória efetora especialmente no grupo 4-7 anos pós-vacinação em relação ao grupo de referência, de 30-45 dias após a vacinação, e também em comparação ao grupo de 1 a 2 anos após a vacinação. Observação semelhante ocorreu para o grupo 10 anos após a vacinação em relação aos grupos de 30 a 45 dias e 1 a 2 anos após a vacinação. Esses dados coincidem com a redução da proporção de soropositividade e títulos geométricos médios observados principalmente nos indivíduos vacinados há 4 anos ou mais, em comparação aos recém-vacinados (grupo de referência). Conclusão semelhante, não foi possível observar em relação aos marcadores de memória celular em linfócitos T  $CD8^+$  e ao perfil das suas citocinas ( $TNF-\alpha^+$ ,  $IFN-\gamma^+$  e  $IL-5^+$ ), pois não houve diferença significativa entre os grupos investigados. Entretanto, é possível que as análises complementares sugeridas pelos autores venham colaborar para a elucidação dessas questões.

A coleta de sangue com heparina, demandada pela análise paralela de imunidade celular, representou uma limitação ao Estudo Matriz, em função da incoerência encontrada nos resultados iniciais de análise de imunidade humoral. Entendemos que essas limitações foram resolvidas pelo protocolo de remoção da heparina das amostras de plasma tratados com Ecteola-Celulose® (Martins-Filho OA – no prelo), o qual propiciou nova análise do Estudo Matriz e a obtenção dos resultados aqui apresentados. A configuração de queda nos títulos que havia sido mostrada nos dados gerados por plasma (Figura 8) é semelhante àquela observada com os dados do “pseudo-soro”.

O procedimento de tratamento de plasma com uma enzima de troca para remoção de heparina levou à necessidade do estabelecimento de um novo ponto de corte para o PRNT para febre amarela, diferente daquele utilizado nas análises de Collaborative Group for Studies on Yellow Fever Vaccines (2014) para os adultos. Esse novo ponto de corte foi validado pelo estudo Complementar I, considerado por nós como “padrão-ouro” por apresentar coletas de sangue pré e pós-vacinais, com controle sobre o tempo entre elas e o procedimento de vacinação, e cujas amostras de sangue seguiram os mesmos procedimentos de coleta e processamento. Após aplicação do procedimento de remoção da heparina com Ecteola-Celulose® (Martins-Filho OA – no prelo) e realização do PRNT - considerando o ponto de corte para soropositividade de 10 na recíproca da diluição - para as crianças menores de dois anos primovacinais e soronegativas antes da vacinação (Estudo Complementar I), chegou-se a uma proporção de soropositividade de 87,5% cerca de 30 e 45 dias após a vacinação. Esse valor é semelhante ao que está descrito na literatura para o mesmo grupo etário. Em um estudo multicêntrico de imunogenicidade realizado no Brasil (Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações, 2003), observou-se uma proporção de soroconversão de 88% nas crianças de 12 a 23 meses após vacinação contra febre amarela. Resultado semelhante foi observado em um estudo de imunogenicidade no Peru, que demonstrou uma proporção de soroconversão de 88,5% após vacinação contra febre amarela (vacina 17D) em crianças de 9 a 18 meses de idade (Belmusto-Worn et al, 2005). Em outro estudo multicêntrico de imunogenicidade conduzido no Brasil (Collaborative Group for Studies with Yellow Fever, 2007) 83% das crianças vacinadas no primeiro ano de vida mostraram duplicação dos títulos de anticorpos 30 dias ou mais após a vacinação. Assim, em função das semelhanças entre as respostas à vacina contra febre amarela nos diferentes estudos, na mesma faixa etária, o resultado do Estudo Complementar I foi considerado como importante para a validação do novo ponto de corte de soropositividade utilizado no presente

estudo, como demanda do novo procedimento de remoção de heparina por Ecteola-Celulose®.

Além a coleta das amostras de plasma com heparina e necessidade do seu tratamento com Ecteola-Celulose®, outras limitações do estudo são: (i) diversas coortes foram representadas no estudo seccional com o pressuposto de que as práticas de imunização e a imunogenicidade da vacina não sofreram variações significativas ao longo do tempo, o que parece uma aproximação aceitável para a interpretação do padrão de queda nos títulos; (ii) as limitações na reprodutibilidade do método sorológico (PRNT) são bem conhecidas e a comparação com estudos anteriores ficou limitada por não termos os títulos em unidades internacionais; (iii) por conveniência para obtenção de amostra de crianças vacinadas, o estudo foi realizado em área com recomendação de vacinação de rotina contra febre amarela, em função do potencial presumido de ocorrência de casos. Em relação a esse último ponto, com altas coberturas vacinais, a circulação de vírus selvagem em primatas não humanos dificilmente determinaria a ocorrência de casos, mas poderia significar um “booster natural” que confundiria os resultados sobre níveis de anticorpos pós-vacinação. No entanto, trata-se de área urbana na região metropolitana de Belo Horizonte, onde já não ocorriam casos em humanos por várias décadas antes da implantação da vacinação de rotina, e em cuja região a vigilância de epizootias no Estado de Minas Gerais não tem detectado febre amarela em primatas não humanos (dados não publicados, Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais).

A despeito das limitações citadas, os resultados aqui apresentados são de grande relevância para preencher a lacuna de informação sobre a duração da imunidade contra febre amarela em crianças. Como citado anteriormente, a vacina contra febre amarela apresenta desempenho em crianças inferior ao observado para a adultos. Considerando a vacinação do grupo etário de 9 a 12 meses de idade, incluída nos calendários rotineiros de imunizações, como estratégia prioritária pela OMS para o controle da febre amarela nas áreas endêmicas para a doença (World Health Organization, 2013b), especial atenção deve ser dada a esse grupo etário para a tomada de decisão sobre a necessidade de revacinação. Segundo Hepburn e colaboradores (2006), a duração da imunidade estaria associada à magnitude dos títulos de anticorpos pós-vacinais. Fox & Cabral (1943) já haviam chamado a atenção para respostas menos intensas e de menor duração em crianças menores de 10 anos de idade, enquanto Anderson & Gast-Galvis (1947) observaram proporções superiores a 90% de crianças acima de 6 anos de idade e adultos com persistência de anticorpos neutralizantes até 5 anos após a vacinação. No entanto, esses estudos não abordaram especificamente a duração da imunidade

em indivíduos vacinados nos dois primeiros anos de vida, que representa a maior parte dos primovacinados em áreas em que a vacina é parte do calendário regular de vacinação na infância. O presente estudo abordou especificamente este grupo etário, buscando evidências científicas do comportamento de médio e longo prazo do estado imune após vacinação contra febre de modo a orientar as decisões sobre necessidades de revacinação e as oportunidades para fazê-lo.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram uma queda progressiva dos títulos de anticorpos e redução da proporção de soropositividade ao longo do tempo pós-vacinação, de forma semelhante ao já descrito para adultos primovacinados, destacando-se a queda precoce, partir dos 31 meses pós-vacinação. Isso reforça não só a necessidade de revacinação das crianças residentes em área de risco para febre amarela, primovacinadas entre 9 e 23 meses, como também questiona o intervalo de 10 anos anteriormente preconizado pelo OMS para a dose de reforço.

Considerando a ampliação das áreas com recomendação de vacinação contra febre amarela em função das epizootias, os elevados índices de infestação urbana do vetor *Aedes aegypti*, a facilidade de deslocamento entre as áreas, e elevada letalidade da doença, os dados aqui apresentados chamam a atenção para o potencial impacto negativo em saúde pública da ausência da dose de reforço da vacina contra febre amarela em crianças. Adicionalmente, indicam que a revacinação deve ser recomendada em um intervalo inferior a 10 anos após a primovacinação, idealmente, até 4 anos após a dose inicial aplicada nos primeiros dois anos de vida.

## 7. REFERÊNCIAS:

1. Anderson CR & Gast-Galvis A. Immunity to yellow fever five years after vaccination. American Journal of Hygiene, 1947; 45:302-304.
2. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. J Immunol. 2009 Dec 15; 183(12): 7919-30.

3. Belmusto-Worn et al. Randomized, double-blind, phase III, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever 17D vaccines (Arilvax and YF-VAX) in healthy infants and children in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Feb;72(2):189-97.
4. Bozzini S, Falcone V, Conaldi PG, Visai L, Biancone L, Dolei A, Toniolo A, Speziale P. Heparin-binding domain of human fibronectin binds HIV-1 gp120/160 and reduces virus infectivity. *J Med Virol.*;54(1):44-53, 1998.
5. Camacho LA, Freire MS, Leal ML, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi 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 Oct; 38(5): 671-8.
6. Camacho LAB, Aguiar SG, Freire MS, Leal MF, Nascimento JP, Iguchi T et al. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Rev Saúde Pública* 2005; 39(3): 413-20.
7. Campi-Azevedo AC, de Araújo-Porto LP, Luiza-Silva M, Batista MA, Martins MA, Sathler-Avelar R, da Silveira-Lemos D, Camacho LA, de Menezes Martins R, de Lourdes de Sousa Maia M, Farias RH, da Silva Freire M, Galler R, Homma A, Ribeiro JG, Lemos JA, Auxiliadora-Martins M, Caldas IR, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PLoS One.* 2012;7(12):e49828. doi: 10.1371/journal.pone.0049828. Epub 2012 Dec 10.
8. Campi-Azevedo AC, de Almeida Estevam P, Coelho-Dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Villela-Rezende G, Quaresma PF, Maia Mde L, Farias RH, Camacho LA, Freire MdaS, Galler R, Yamamura AM, Almeida LF, Lima SM, Nogueira RM, Silva Sá GR, Hokama DA, de Carvalho R, Freire RA, Filho EP, Leal Mda L, Homma A, Teixeira-Carvalho A, Martins RM, Martins-Filho OA. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. *BMC Infect Dis.* 2014 Jul 15;14:391. doi: 10.1186/1471-2334-14-391.
9. Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, Santos RA, Batista MA, Campos FM, Pacheco-Porto L, Júnior OA, Hossell DM, Coelho-Dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Costa-Silva MF, de Oliveira JG, Farias RH, Noronha TN, Lemos JA, von Doellinger VD, Simões M, de Souza MM, Malaquias LC, Persi HR, Pereira JM, Martins JA, Dornelas-Ribeiro M, Vinhas AA, Alves

- TR, Maia ML, Freire MD, Martins RM, Homma A, Romano AP, Domingues CM, Tauil PL, Vasconcelos PF, Rios M, Caldas IR, Camacho LA, Martins-Filho OA. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccin Immunother.* 2015 Sep 11:0.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2002; vol 51 (RR-17).
  11. Centers for Disease Control and Prevention. Health Information for International Travel 2005-2006. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta.
  12. Centers for Disease Control and Prevention. Yellow fever vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2010; 59(RR-7).
  13. Chan RC, Penney DJ, Little D et al. Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet* 2001; 358: 121-2.
  14. Collaborative Group for Studies with Yellow Fever, 2007. 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(16):3118-23
  15. Collaborative group for studies on yellow fever vaccines. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine.* 2014 Sep 3;32(39):4977-84. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.021.
  16. Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine. A randomised double-blind clinical trial of two yellow fever vaccines prepared with substrains 17DD and 17D-213/77 in children nine-23 months old. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2015; 110(6): 771-780.  
Couto AM, Salomão MR, Schermann MT. Transmission of yellow fever vaccine virus through breast-feeding – Brazil, 2009. *MMWR*, 2009; 59 (5), 130-132.
  17. Cumming AM, Jones GR, Wensley RT, Cundall RB. In vitro neutralization of heparin in plasma prior to the activated partial thromboplastin time test: an assessment of four heparin antagonists and two anion exchange resins. *Thromb Res.*1986 Jan 1;41(1):43-56.
  18. De Madrid AT, Porterfiel JS. A Simple Micro-culture Methos for the Study of Group B Arboviruses. *Bull. Wld Hlth Org.* 1969; 40: 113-121.
  19. Doblaz A, Domingo C, Bae HG et al. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease and death in Spain. *Journal of Clinical Virology* 2006; 36: 156-8.

20. Ferguson M, Heath A. Collaborative study to assess the suitability of a candidate International Standard for yellow fever vaccine. *Biologicals* 2004; 32 (4):195-205.
21. Fox JP, Penna HA. Behavior of 17D yellow fever virus in rhesus monkeys. Relation to substrain, dose and neural or extraneural inoculation. *Am J Hyg* 38:152, 1943.
22. Freestone DS, Ferris RD, Weinberg AL, Kelly A. Stabilized strain yellow fever vaccine: dose response studies, clinical reactions and effects on hepatic function. *J. Biol. Stand.* 1977;5 (3):181-6.
23. Fox JP & Cabral AS. The duration of immunity following vaccination with the 17D strains of yellow fever virus. *American Journal of Hygiene*, 1943; 37:93-120.
24. Galler R, Pugachev KV, Santos CLS, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG et al. Phenotypic and a molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology* 2001;290:309-19.
25. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med.* 2008 Dec 22; 205(13): 3119-31.
26. Gerasimon G, Lowry K. Rare case of fatal yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease. *Southern Medical Journal* 2005; 98 (6): 653-6.
27. Gotuzzo E, Yactayo S, Córdova E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Sep; 89(3): 434-44.
28. 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.* in *VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva.* Brasília-DF: 2003.
29. Hayes EB. Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 967-71.
30. Hepburn MJ, Kortepeter MG, Pittman PR et al. [Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17d yellow fever vaccine.](#) *Vaccine* 2006; 24(15):2843-2849.
31. Hoffmann JJ, Meulendijk PN. Evaluation of a heparin neutralizer. *Thromb Res.* 1980 Jun 15; 18(6): 897-900.
32. Johansson MA, Vasconcelos PF, Staples JE. The whole iceberg: estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Aug; 108(8): 482-7. doi: 10.1093/trstmh/tru092.

33. Khromava AY, Eidex RB, Weld LH et al. Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine* 2005; 23:3256-63.
34. Lawrence GL, Burgess MA, Kass RS. Age-related risk of adverse events following yellow fever vaccination in Australia. *Communicable Diseases Intelligence* 2004; 28:244-248.
35. Lopes OS, Guimarães SSSA, Carvalho R. Studies on yellow fever vaccine III- dose response in volunteers. *J. Biol. Stand.* 1988; 16 (2):77-82.
36. Martin M, Tsai TF, Cropp B et al. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of a case. *Lancet*, 2001; 358: 98 - 104.
37. Martins-Filho OA. Avaliação dos níveis de anticorpos neutralizantes e a taxa de soropositividade antiamarílica em plasma contendo heparina. Protocolo de pesquisa. Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. No prelo.
38. Martins RM, Galler R, Freire MS, Camacho LA, de Lourdes S Maia M, Homma A. Yellow fever vaccination: Some thoughts on how much is enough. *Vaccine* 2007; 25 (1):10-1.
39. Martins RM, Maia MLS, Santos EM, Cruz RLS, Santos PRG, Carvalho SMD et al. Yellow fever vaccine post-marketing surveillance in Brazil. *Procedia in Vaccinology* 2010; 2: 178-183.
40. Martins RM, Maia ML, Farias RH, Camacho LA, Freire MS, Galler R, et al. 17DD yellow fever vaccine: a double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Apr; 9(4): 879-88.
41. McMahon, AW, Eidex, RB, Marfin AA et al. Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: A report of 15 cases. *Vaccine* 2007; 25: 1727–1734.
42. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação das Doenças Transmissíveis no Brasil – Febre Amarela Silvestre 2004. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
43. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2005 - (MS. Normas e Manuais Técnicos).
44. Ministério da Saúde. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
45. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica – 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p. - (A. Normas e Manuais Técnicos).

46. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Nota Técnica. Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 2011; 20(1):101-106.
47. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Aspectos epidemiológicos da febre amarela silvestre e a vigilância intensificada durante período de monitoramento, Brasil, 2012/2013 - Brasília: Ministério da Saúde; 2014a; 45(7): 1-10.
48. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações. Nota Informativa N102/CGPNI/DEVIT/SVS/MS. Recomendar uma dose por toda a vida da vacina contra febre amarela, após a declaração mundial da saúde.– Brasília: Ministério da Saúde; 2014b.
49. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal. - Brasília: Ministério da Saúde; 2015; 46(29): 1-10.
50. 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.
51. Monath TP. Yellow Fever Vaccine. In Plotkin, SA, Orenstein, WA (eds). *Vaccines*. 4<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Saunders, 2004, p. 1095 - 1176.
52. Monath TP, Cetron MS, Teuwen DE. Yellow fever vaccines. In : Plotkin S, Orenstein W, Offit P. *Vaccines*, 5th ed, Saunders Elsevier, China, 2008, p. 959-1055.
53. Monath TP, Gershman M, Staples JE, Barrett ADT. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 6th ed. Elsevier Saunders Inc; 2013 [Chapter 38].
54. Nascimento Silva JR, Camacho LAB, Siqueira MM, Freire M de S, Castro YP, Maia M de L, et al.; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Mutual interference on the immune response to yellow fever vaccine and a combined vaccine against measles, mumps and rubella. *Vaccine* 2011; 29:6327-34.

55. 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 and International Health* 1999; 4(12):867-871.
56. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'age-Stehr J. 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. *J Med Virol.* 1998 Oct;56(2):159-67).
57. Rezende, GV. Avaliação da duração da imunidade antiamarílica 17DD em crianças: 2014. 28 f. Relatório Parcial PIBIC – Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, 2014.
58. Simões M, Camacho LAB, Yamamura AMY, Miranda EH, Cajaraville ACRA, Freire MS. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals* 2012;40:399–404.
59. Spector S, Tauraso NM. Yellow Fever Virus. I. Development and Evaluation of a Plaque Neutralization Test. *Applied Microbiology* 1968; 16 (11): 1770-1775.
60. Staples JE, Bocchini JA Jr, Rubin L, Fischer M. Yellow Fever Vaccine Booster Doses: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015 Jun 19;64(23):647-50.
61. Struchiner CJ, Luz PM, Dourado I, Sato HK, Aguiar JGL, Ribeiro R et al. Risk of fatal adverse events associated with 17DD yellow fever vaccine. *Epidemiology and Infection* 2004; 132: 939-946.
62. Thompson AR, Counts RB. Removal of heparin and protamine from plasma. *J Lab Clin Med.* 1976 Dec; 88(6): 922-9.
63. Van den Besselaar AM, Meeuwisse-Braun J. Enzymatic elimination of heparin from plasma for activated partial thromboplastin time and prothrombin time testing. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 4(4):635-8, 1993.
64. Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, Monath TP, Rodrigues SG, Laval C, Costa ZG, Vilela MF, Santos CL, Papaiordanou PM, Alves VA, Andrade LD, Sato HK, Rosa ES, Froguas GB, Lacava E, Almeida LM, Cruz AC, Rocco IM, Santos RT, Oliva OF; Brazilian Yellow Fever Vaccine Evaluation Group. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two

- cases. *Lancet*. 2001 Jul 14;358(9276):91-7. Erratum in: *Lancet* 2001 Sep22;358(9286):1018. Papaiordanou, CM [corrected to Papaiordanou, PM]. *Lancet* 2001 Jul 28;358(9278):336
65. Vasconcelos PF. Febre Amarela. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(2):275-93.
  66. Wilder-Smith A, Hill DR, Freedman DO. The revised International Health Regulations (2005): impact on yellow fever vaccination in clinical practice. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Mar; 78(3): 359-60.
  67. World Health Organization. Requirements for yellow fever vaccine (Requirements for Biological Substances No. 3, revised 1995) – Geneva: World Health Organization; 1998 - (WHO Technical report 872, Annex 2).
  68. World Health Organization. International health regulations; 2005. Disponível em:<http://www.who.int/ihr/9789241596664/en/index.html>,<http://www.who.int/ith/updates/20140605/en/>.
  69. World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for yellow fever vaccine. Geneva: WHO; 2008. (WHO. Requirements for Biological Substances n° 3).  
World Health Organization. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, April 2013 – conclusions and recommendations. *Weekly epidemiological record*, 2013a; 88: 201–216.
  70. World Health Organization. Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO position paper – June 2013. *Weekly epidemiological record* 2013b; 88: 269–84.
  71. Zahn A, Allain JP. Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography. *J Gen Virol*. 86(Pt 3):677-85, 2005.

# **ANEXOS**

# **ANEXO 1**

## **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Estudo Matriz)**

## **Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Fiocruz/Ministério da Saúde – Secretaria Estadual de Saúde-MG

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 e Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais com o objetivo de analisar a persistência da proteção pela vacina contra a febre amarela. 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 vacina contra febre amarela tem segurança e eficácia comprovadas pelo controle da doença nas regiões onde tem sido aplicada. Os dados sobre a vacina em adultos indicam que a proteção é prolongada, mas em crianças ainda há pouca informação. Esta pesquisa é para saber sobre a duração da imunidade pela vacina contra a febre amarela quando ela é aplicada em crianças com menos de 2 anos de idade. Neste tipo de pesquisa, se fazem exames e observações nos vacinados para medir a quantidade de anticorpos contra a febre amarela no sangue comparando grupos com diferentes tempos de vacinação.

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 um grupo de crianças que tomaram a vacina contra febre amarela nos postos de saúde quando tinham menos de dois anos de idade. Para participar nós pedimos às pessoas para (1) trazer o cartão de vacinação da criança; (2) responder a algumas perguntas sobre a saúde do seu filho; e (3) fazer um exame de sangue para medir os anticorpos. A comparação da quantidade de anticorpos contra a febre amarela no sangue em diferentes tempos depois da vacinação permite confirmar a proteção dada pela vacina. Não serão administradas vacinas ou remédios nesta pesquisa, mas os resultados dos exames poderão indicar necessidade de reforço da vacina contra febre amarela.

O exame de sangue pode produzir um certo incômodo, mas não representa risco importante para a saúde. 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 da criança. 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 e dengue).

Nos locais de vacinação haverá um responsável pelo estudo para esclarecer dúvidas. Se preferir, pode contactar o Dr. \_\_\_\_\_, telefones \_\_\_\_\_ (2ª a 6ª de 8h às 17 h) ou o Dr. \_\_\_\_\_, telefones \_\_\_\_\_.

o Dr. Luiz Antonio B. Camacho , telefone (21) 2598 2630, ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública - CEP / ENSP :

Rua Leopoldo Bulhões, 1.480, sala 314, Manguinhos. Rio de Janeiro-RJ. CEP. 21041-210  
Tel./ Fax : (21) 2598-2863 (horário de atendimento ao público do CEP/ENSP :14h – 17h).

Endereço eletrônico : [cep@ensp.fiocruz.br](mailto:cep@ensp.fiocruz.br) ; <http://www.ensp.fiocruz.br/etica>.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública – Fiocruz, onde este estudo foi analisado e aprovado e onde você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

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 2010.

Assinatura do responsável. *Assinatura do responsável pela pesquisa no posto de vacinação*

## **ANEXO 2**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Estudo Complementar em Crianças)**

## Estudo Complementar da Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FIOCRUZ/Ministério da Saúde – Secretaria Estadual de Saúde-MG

**Pesquisador Responsável: Dr. Olindo Assis Martins-Filho**

Este documento procura dar ao Sr. (a Sra.) informações e pedir a participação do seu filho(a) nesta pesquisa patrocinada pelo Ministério da Saúde e Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais com o objetivo de analisar a persistência da proteção pela vacina contra a febre amarela. 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 vacina contra febre amarela tem segurança e eficácia comprovadas pelo controle da doença nas regiões onde tem sido aplicada. Os dados sobre a vacina em adultos indicam que a proteção é prolongada, mas em crianças ainda há pouca informação. Esta pesquisa é para saber sobre a duração da imunidade pela vacina contra a febre amarela quando ela é aplicada em crianças com menos de 2 anos de idade. Neste tipo de pesquisa, se fazem exames e observações nos vacinados para medir a quantidade de anticorpos contra a febre amarela no sangue comparando grupos com diferentes tempos de vacinação.

Nos estamos convidando para participar da pesquisa um grupo de 60 crianças com idade menor que 2 anos atendidas nos postos de saúde. Estas crianças serão avaliadas no período pré-vacinal e no período 30-45 dias pós-primovacinação contra febre amarela. Para participar nós pedimos as pessoas para (1) trazer o cartão de vacinação da criança; (2) responder a algumas perguntas sobre a saúde do seu filho; e (3) fazer um exame de sangue para medir os anticorpos. A comparação da quantidade de anticorpos contra a febre amarela no sangue em diferentes tempos depois da vacinação permite confirmar a proteção dada pela vacina. Não serão administradas vacinas ou remédios nesta pesquisa, mas os resultados dos exames poderão indicar necessidade de reforço da vacina contra febre amarela.

O exame de sangue pode produzir um certo incômodo, mas não representa risco importante para a saúde. 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 da criança. 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).

Nos locais de vacinação haverá um responsável pelo estudo para esclarecer dúvidas. Se preferir, pode contactar o Dr. \_\_\_\_\_, telefones \_\_\_\_\_ (2ª a 6ª de 8h as 17 h) ou o Dr. \_\_\_\_\_, telefones \_\_\_\_\_.

o Dr. Olindo Assis Martins-Filho, telefone (31) 3349 7764, ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou:

Av. Augusto de Lima, 1.715, Barro Preto, Belo Horizonte, MG. CEP. 30.190-002 Tel.: (31) 3349-7700, Fax: (31) 3295-3115.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, onde este estudo foi analisado e aprovado e onde você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

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 201\_\_\_\_.

(local)

\_\_\_\_\_  
*ASSINATURA DO RESPONSÁVEL*

\_\_\_\_\_  
*ASSINATURA DO RESPONSÁVEL PELA PESQUISA NO POSTO DE VACINAÇÃO*

## **ANEXO 3**

### **Formulário de Coleta de Dados (Estudo Matriz)**



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

[ *Bairro, CEP* ]

[*Ponto de referência*]

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

\_\_\_\_\_  
*Telefone para contato*

Ao formular as perguntas, referir o nome da criança para evitar confusão

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 (anos/meses)*

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

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

dia

mês

ano

9. Depois da vacinação contra febre amarela, a criança residiu ou viajou para outros municípios ?

Sim ..... 1

Não ..... 2

Não sabe ... 9

**Em caso afirmativo, quais?**

[*indicar nome dos municípios/estados, ano de cada uma das viagens e duração de cada estadia*]

10.

Município/estado onde residiu ou viajou	Mês e ano	Duração da estadia ou tempo de residência

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 e preencha os itens abaixo copiando do cartão.**

11. a. Tomou BCG ?

Sim ..... 1  
Não ..... 2  
Indeterminado ..... 9

***Em caso afirmativo, verificar cicatriz vacinal***

11. b. Cicatriz de BCG

Sim ..... 1  
Não ..... 2  
Indeterminado ..... 9

11. c. Data da vacinação BCG (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

***Em caso afirmativo,***

12. b. Data da última dose da vacina contra poliomielite (ou idade em que tomou a dose mais recente)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

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

Sim ..... 1  
Não ..... 2  
Indeterminado ..... 9

***Em caso afirmativo,***

13. b. Data da última dose de DTP-Hib (ou idade em que tomou a dose mais recente)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

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

Sim ..... 1  
Não ..... 2  
Indeterminado ..... 9

***Em caso afirmativo,***

14. b. Data da última dose (ou idade em que tomou a dose mais recente)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

15. a. Tomou vacina contra hepatite B?

Sim ..... 1  
Não ..... 2  
Indeterminado ..... 9

***Em caso afirmativo,***

15. b. Data da última dose da vacina contra hepatite B (ou idade em que tomou a dose mais recente)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

16. a. Tomou vacina contra pneumococos (conjugada 10-valente)?

Sim ..... 1

Não ..... 2

Indeterminado ..... 9

Em caso afirmativo,

16. b. Data da última dose vacina contra pneumococos (ou idade em que tomou a dose mais recente)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

17. a. Tomou vacina contra meningite meningocócica conjugada do sorogrupo C?

Sim ..... 1

Não .....

Indeterminado ..... 9

Em caso afirmativo,

16. b. Data da última dose vacina contra meningite C (ou idade em que tomou a dose mais recente)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

17. a. Tomou alguma outra vacina ? [por exemplo, pneumocócica polissacarídica, meningocócica A e C contra raiva, varicela etc.]

Sim ..... 1

Não ..... 2

Indeterminado ..... 9

Em caso afirmativo,

Quais ?

17.b. \_\_\_\_\_  
*nome da outra vacina*

17.c. Data da última dose (ou idade em que tomou a dose mais recente)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

15.7. \_\_\_\_\_  
*nome da outra vacina*

17.e. Data da última dose (ou idade em que tomou a dose mais recente)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

17.f. \_\_\_\_\_  
*nome da outra vacina*

17. g. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose)

\_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_

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** Qual o mais recente ?

18.B. \_\_\_\_\_  
*nome do soro*

18.c. Data da última dose (ou idade em que tomou a dose mais recente) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

18.d. Motivo (diagnóstico) para aplicação do soro ou da transfusão \_\_\_\_\_

19. 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

Observações relevantes sobre problemas de saúde atuais:

20. A criança já esteve internada em hospital alguma vez na vida?

Sim ..... 1

Não ..... 2

Não sabe .. 9

21. 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			
E			

Outras observações relevantes, como incapacidade ou limitações em consequência de problemas de saúde que a criança já apresentou:

## **ANEXO 4**

### **Formulário de Coleta de Dados**

#### **(Estudo Complementar I)**



**ESTUDO COMPLEMENTAR DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO  
CONTRA FEBRE AMARELA EM CRIANÇAS**

(1)

Etiqueta de cadastro

Unidade de saúde:

**QUESTIONÁRIO DE INCLUSÃO NA PESQUISA (QIP)**

1 - O responsável assinou o TCLE?

Sim  Não

2 - A criança tem idade entre 9 meses e 23 meses e 29 dias?

Sim  Não

3 - A criança está em dia com o calendário vacinal preconizado pelo PNI (Programa Nacional de Imunizações)?

Sim  Não

4 - A princípio, a criança terá disponibilidade para participar do estudo durante 2 meses?

Sim  Não

Obs.: Caso alguma das respostas acima seja "NÃO", não incluir na pesquisa.

5 - Já recebeu vacina febre amarela?

Sim  Não

6 - A criança está participando de outro estudo ou pesquisa?

Sim  Não

7 - A criança recebeu vacina do PNI ou outras nos últimos 30 dias? (Omar comprovante de vacinação)

Sim  Não

8 - A criança está ou teve temperatura axilar maior ou igual a 37,5°C nos últimos três dias?

Sim  Não

9 - A criança recebeu transfusão de sangue, usou imunoglobulinas ou soro hiperimune nos últimos 90 dias?

Sim  Não

10 - A criança já apresentou sangramentos anormais após injeções?

Sim  Não

11 - A criança usa ou usou corticóides em doses imunossupressoras (maior ou igual a 1mg/kg/dia de Prednisona por mais de 14 dias) ou usou outros imunossupressores nos últimos 6 meses? (Obs.: Uso de corticóide por menos de 2 semanas, uso tópico ou por inalação, não indicam exclusão. Registrar na ficha de observações complementares)

Sim  Não

12 - A criança é alérgica a ovo, eritromicina, kanamicina ou tem história de choque anafilático, asma, urticária ou outras reações alérgicas às vacinações anteriores?

Sim  Não

13 - A criança fez uso de injeções antialérgicas com antígenos (vacinas antialérgicas) nos últimos 14 dias?

Sim  Não

14 - A criança tem qualquer outra afecção que, na opinião do pesquisador, possa interferir na análise dos objetivos do estudo?

Sim  Não (Se SIM, detalhe na ficha de observações complementares)

Obs.: Caso alguma das respostas das questões 5 à 14 seja "SIM", não incluir na pesquisa.

Preenchido por: \_\_\_\_\_ Código:   Data da visita:  /  /

Revisado por: \_\_\_\_\_ Código:   Data:  /  /   **9636228983**

**ESTUDO COMPLEMENTAR DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO  
CONTRA FEBRE AMARELA EM CRIANÇAS**

(2)

Etiqueta de cadastro

Unidade de saúde:

**QUESTIONÁRIO DE INCLUSÃO NA PESQUISA (QIP)**

15 - A criança residiu ou viajou para fora do Brasil?

- Não  
 Sim, em países SEM registro de casos de febre amarela  
 Sim, em país COM registro de casos de febre amarela (Em caso de dúvida, consultar documento próprio)

Pais onde residiu ou viajou	Estado	Mês e Ano	Duração da estadia ou tempo de residência
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia

16 - A criança residiu ou viajou, para outros municípios do Brasil?

- Não  
 Sim, em município SEM registro de casos de febre amarela  
 Sim, em município COM registro de casos de febre amarela (Em caso de dúvida, consultar documento próprio)

Outros municípios onde residiu ou viajou	Estado	Mês e Ano	Duração da estadia ou tempo de residência
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia

17 - A criança é elegível para o estudo?

- Sim  Não

Preenchido por: \_\_\_\_\_ Código:   Data da visita:  /  /

Revisado por: \_\_\_\_\_ Código:   Data:  /  /  **1198095294**

**ESTUDO COMPLEMENTAR DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO  
CONTRA FEBRE AMARELA EM CRIANÇAS**

Etiqueta de cadastro

Unidade de saúde:

**ANTECEDENTES VACINAIS**

Peso atual:      gramas

Preencher os itens abaixo copiando do cartão de vacinação.

Nome da vacina	Vacinação	Data da última dose	Se SIM, verificar se:
BCG	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Tem cicatriz da BCG? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado
POLIO	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> VIP <input type="checkbox"/> VOP <input type="checkbox"/> Indeterminado
DTP/HB/Hib (Pentavalente)	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
DTP	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
Tríplice Viral (Sarampo, rubéola, caxumba)	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
Hepatite B	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
Pneumococo (Conj. 10 Valente)	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
Meningocócica Conj. C	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
Hepatite A	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
Tetraviral (Sarampo, rubéola, caxumba, varicela)	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
Alguma outra? (Pneumocócica polissacarídica, meningocócica AC, raiva, varicela)	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Especifique: _____
Alguma outra? (Pneumocócica polissacarídica, meningocócica AC, raiva, varicela)	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Especifique: _____

Mãe já recebeu a vacina Febre Amarela?

Sim  Não  Não sabe

Se SIM, especifique a data:  /  /

Preenchido por: \_\_\_\_\_ Código:   Data da visita:  /  /

Revisado por: \_\_\_\_\_ Código:   Data:  /  /  **2267496792**

**ESTUDO COMPLEMENTAR DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO  
CONTRA FEBRE AMARELA EM CRIANÇAS**

Etiqueta de cadastro

Unidade de saúde:

**ANTECEDENTES PATOLÓGICOS**

1 - A criança fez algum tratamento prolongado ou teve algum problema de saúde importante? (Doenças auto-imunes, hemoglobinopatias, drogas imunossupressoras, radioterapia, etc...)

Sim  Não  Não sabe (Se SIM, descreva abaixo).

Problema(s) de saúde atual(is)*	Data(s) de início
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>

*(Caso tenha tomado algum medicamento preencher a ficha de medicamentos. Observações relevantes sobre problemas de saúde atuais, registrar na ficha de observações complementares)*

2 - A criança já esteve internado em hospital alguma vez na vida?

Sim  Não  Não sabe (Se SIM, descreva abaixo).

Problema(s) que levou(aram) a(s) internação(ões)	Data(s) da(s) internação(ões)	Dia(s) de internação(ões)
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/>

*(Observações relevantes, como incapacidade ou limitações em consequência de problemas de saúde que o participante já apresentou, registrar na ficha de observações complementares)*

3 - A criança já tomou soro anti-tetânico, anti-rábico, algum outro tipo de soro hiperimune ou transfusão de sangue?

Sim  Não  Não sabe (Se SIM especifique abaixo)

Qual o mais recente:

Data:  /  /  Motivo:

4 - A criança está em boas condições de saúde?

Sim  Não

5 - A criança é elegível?

Sim  Não

Preenchido por: \_\_\_\_\_ Código:  Data da visita:  /  /

Revisado por: \_\_\_\_\_ Código:  Data:  /  /  8427283981

■ ESTUDO COMPLEMENTAR DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO  
CONTRA FEBRE AMARELA EM CRIANÇAS ■

Etiqueta de cadastro

Unidade de saúde:

**FICHA DE COLETA DE SANGUE**

COLETA PRÉ VACINAÇÃO

COLETA PÓS VACINAÇÃO

DATA DA VACINAÇÃO:   /   /

1 - Data da Coleta:   /   /

Número da coleta

2 - Hora da Coleta:   h :   min

3 - Volume Total:   ,  mL

4 - Ocorreu alguma intercorrência durante ou após o procedimento?

SIM  NÃO (Se SIM, descrever na ficha de observação complementar)

5 - Coletado por: \_\_\_\_\_ Código:

Preenchido por: \_\_\_\_\_ Código:   Data da visita:   /   /

Revisado por: \_\_\_\_\_ Código:   Data:   /   /     **7003323121** ■

**ESTUDO COMPLEMENTAR DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO  
CONTRA FEBRE AMARELA EM CRIANÇAS**

Etiqueta de cadastro

Unidade de saúde:

Data da vacina:   /   /

**AVALIAÇÃO PARA COLETA PÓS VACINAÇÃO**

No período entre a dose de vacina contra Febre Amarela, e hoje, o dia da coleta de sangue pós vacinal, a criança:

1 - Recebeu alguma outra vacina ou soro hiperimune?

Não  Sim (Se SIM, detalhe na folha de observações complementares).

2 - Desenvolveu quadro de imunossupressão permanente ou transitória?

Não  Sim (Se SIM, detalhe na folha de observações complementares).

3 - Residiu ou viajou para outros municípios ou para fora do país?

Não  Sim

Se SIM, preencher o quadro abaixo:

Pais ou municípios onde residiu ou viajou	Estado	Mês e Ano	Duração da estadia ou tempo de residência
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> dias <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> dia

4 - Teve alguma intercorrência médica no período?

Não  Sim (Se SIM, detalhe na folha de observações complementares).

5 - Fez uso de algum medicamento?

Não  Sim (Se SIM, preencher ficha de medicamentos).

Preenchido por: \_\_\_\_\_

Código:

Data da visita:   /   /

Revisado por: \_\_\_\_\_

Código:

Data:   /   /

**4807307717**



**ESTUDO COMPLEMENTAR DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO  
CONTRA FEBRE AMARELA EM CRIANÇAS**

Etiqueta de cadastro

Unidade de saúde:

**MEDICAMENTOS**

Ocorrência:  
 Contato 1    Contato 2    Extra

1. Nome do medicamento: <input type="text"/>		Início: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Fim: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
<b>Categoria:</b> <input type="checkbox"/> Antiérgicos <input type="checkbox"/> Antieméticos <input type="checkbox"/> Broncodilatadores <input type="checkbox"/> Antitérmicos <input type="checkbox"/> Analgésicos <input type="checkbox"/> Corticóides <input type="checkbox"/> Antiinflamatório <input type="checkbox"/> Antibióticos <input type="checkbox"/> Anticonvulsivantes <input type="checkbox"/> Outros (especificar abaixo): <input type="text"/>		<b>Via administrada:</b> <input type="checkbox"/> Oral <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Intravenosa <input type="checkbox"/> Subcutânea <input type="checkbox"/> Retal <input type="checkbox"/> Otológica <input type="checkbox"/> Inalatória <input type="checkbox"/> Tópica <input type="checkbox"/> Oftálmica	

2. Nome do medicamento: <input type="text"/>		Início: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Fim: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
<b>Categoria:</b> <input type="checkbox"/> Antiérgicos <input type="checkbox"/> Antieméticos <input type="checkbox"/> Broncodilatadores <input type="checkbox"/> Antitérmicos <input type="checkbox"/> Analgésicos <input type="checkbox"/> Corticóides <input type="checkbox"/> Antiinflamatório <input type="checkbox"/> Antibióticos <input type="checkbox"/> Anticonvulsivantes <input type="checkbox"/> Outros (especificar abaixo): <input type="text"/>		<b>Via administrada:</b> <input type="checkbox"/> Oral <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Intravenosa <input type="checkbox"/> Subcutânea <input type="checkbox"/> Retal <input type="checkbox"/> Otológica <input type="checkbox"/> Inalatória <input type="checkbox"/> Tópica <input type="checkbox"/> Oftálmica	

3. Nome do medicamento: <input type="text"/>		Início: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Fim: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
<b>Categoria:</b> <input type="checkbox"/> Antiérgicos <input type="checkbox"/> Antieméticos <input type="checkbox"/> Broncodilatadores <input type="checkbox"/> Antitérmicos <input type="checkbox"/> Analgésicos <input type="checkbox"/> Corticóides <input type="checkbox"/> Antiinflamatório <input type="checkbox"/> Antibióticos <input type="checkbox"/> Anticonvulsivantes <input type="checkbox"/> Outros (especificar abaixo): <input type="text"/>		<b>Via administrada:</b> <input type="checkbox"/> Oral <input type="checkbox"/> Intramuscular <input type="checkbox"/> Intravenosa <input type="checkbox"/> Subcutânea <input type="checkbox"/> Retal <input type="checkbox"/> Otológica <input type="checkbox"/> Inalatória <input type="checkbox"/> Tópica <input type="checkbox"/> Oftálmica	

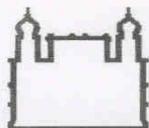
Preenchido por: \_\_\_\_\_ Código:        Data da visita:  /  /

Revisado por: \_\_\_\_\_ Código:        Data:  /  /        **9737520913**



## **ANEXO 5**

**Parecer Comitê de Ética da Escola Nacional de Saúde  
Pública  
(Estudo Matriz)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

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



Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2010.

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 13/10**  
**CAAE: 0014.0.031.000-10**

**Título do Projeto:** “Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças”

**Classificação no Fluxograma:** Grupo III

**Pesquisador Responsável:** Luiz Antonio Bastos Camacho

**Instituição onde se realizará:** Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/FIOCRUZ/ENSP

**Data de recebimento no CEP-ENSP:** 18 / 01 / 2010

**Data de apreciação:** 10 / 02 / 2010

**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 pesquisador justificar caso o mesmo venha a ser interrompido.

  
Isis Nascimento de Carvalho Reis  
Coordenadora Adjunta  
Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP/ENSP

## **ANEXO 6**

**Parecer Comitê de Ética da Escola Nacional de Saúde**

**Pública**

**(Estudo Complementar I)**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo Complementar da Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças

**Pesquisador:** Martins-Filho OA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 25315213.6.0000.5091

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/

**Patrocinador Principal:** Secretaria de Vigilância em Saúde

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 961.889

**Data da Relatoria:** 23/02/2015

**Apresentação do Projeto:**

A F.A. é uma arbovirose de evolução aguda, de amplo espectro clínico que inclui formas leves com sintomatologia febril inespecífica de início súbito e formas graves com letalidade superior a 30% (Vasconcelos, 2003). É uma das doenças-alvo do Regulamento Sanitário Internacional sujeitas à notificação Internacional (WHO, 2005).

No Brasil, a maior parte dos casos ocorre em homens adultos com ocupações profissionais ou em atividades de lazer e turismo em regiões de floresta, que os expõem ao contato com mosquitos infectados (MS, 2005).

Embora não se registrem casos de F.A. urbana no Brasil desde 1942, a ocorrência de epidemias da F. A. silvestre nas regiões Sul e Sudeste e a abundância do mosquito "Aedes aegypti" em zonas urbanas próximas de zonas enzoóticas tem sido considerado uma ameaça de re-urbanização. Não há tratamento específico e a vacina constitui a melhor forma de controle da doença. Vacinas anti-tamariílicas estão disponíveis desde a década de 1930 e as que estão em uso atualmente são de vírus vivos atenuados, produzidos pelo sistema de lote semente que limita o número de passagens do vírus, diminuindo o risco de mutações.

As vacinas contra F.A. existentes são consideradas altamente imunogênicas e seguras para a imunização de residentes de áreas endêmicas ou ameaçadas, bem como de turistas, alvos de

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715

**Bairro:** Barro Preto

**CEP:** 30.190-002

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3349-7825

**Fax:** (31)3349-7825

**E-mail:** cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 961.889

infecção em seu retorno para áreas susceptíveis. Esta é uma recomendação do Programa Nacional de Imunização do MS do Brasil e OMS(M.S., 2005;Camacho et al. 2008).

Embora correlatos sorológicos de proteção não estejam disponíveis, as evidências de efetividade dos programas de imunização no controle da F.A. sugerem que os indivíduos soropositivos após a vacinação estejam protegidos contra a doença (Monath,2008).

Em estudo multicêntrico de imunogenicidade (Collaborative Group For Studies With Yellow Fever, 2007), a vacina mostrou desempenho em crianças inferior ao observado nos adultos: soroconversão de 97% no grupo 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 crianças de 9 a 11 meses e 82% nas crianças de 6 a 8 meses.

A duração da imunidade induzida pela vacina parece ser longa e a OMS recomenda reforço a cada dez anos, mas os dados que apolam esta recomendação são limitados.

Poland e col(1981) observaram persistência de anticorpos neutralizantes em 78,4% de veteranos de guerra com vacinação presumida há 30 anos ou mais e em 18,2% dos veteranos considerados não vacinados. Niedrieg e col(1999) demonstraram que a proporção de indivíduos com anticorpos neutralizantes caiu de 94% no primeiro ano para 74,5% após 10 anos, indicando que a duração da imunidade parece associada aos níveis de anticorpos pós-vacinação. Em um estudo realizado com crianças, Fox & Cabral (1943) chamaram a atenção para respostas menos intensas e de menor duração em crianças abaixo de 10 anos comparadas aos adultos. Já Anderson & Gast-Galvis (1947) observaram altas (>90%) proporções de crianças acima de 6 anos de idade e adultos com persistência de anticorpos neutralizantes até 5 anos após a vacinação. Contudo, os dados dos estudos descritos anteriormente não abordaram especificamente a duração da imunidade em indivíduos vacinados nos dois primeiros anos de vida e a necessidade da re-vacinação após 10 anos da primovacinação antiamarílica.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Hipótese:

Crianças primovacinaadas apresentarão perfil de memória celular (fenótipo celular de memória e padrão de citocinas) compatível com níveis de anticorpos neutralizantes associados à eficácia vacinal.

Objetivo Primário:

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 961.889

Consolidar aspectos da resposta imune humoral (anticorpos neutralizantes) e celular (parâmetros fenotípico-funcionais de células T e B de memória), por meio de investigação longitudinal complementar em crianças de 9 a 23 meses de idade não vacinadas e 30-45 dias após primovacinação.

Objetivo Secundário:

1. Estimar e comparar a proporção de positividade e a média geométrica dos títulos plasmáticos de anticorpos neutralizantes contra febre amarela imediatamente antes e 30-45 dias após primovacinação contra febre amarela, em crianças de 9 a 23 meses de idade sem antecedentes de vacinação contra febre amarela.
2. Avaliar, por caracterização imunofenotípica, a frequência de linfócitos T e B de memória, induzida *in vitro* pelo antígeno vacinal 17DD imediatamente antes e 30-45 dias após primovacinação contra febre amarela, em crianças de 9 a 23 meses de idade sem antecedentes de vacinação contra febre amarela.
3. Quantificar, por caracterização funcional, citocinas intracitoplasmáticas de linfócitos T CD8+, induzidas "in vitro" pelo antígeno vacinal 17DD imediatamente antes e 30-45 dias após primovacinação contra febre amarela, em crianças de 9 a 23 meses de idade sem antecedentes de vacinação contra febre amarela.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Critério de Inclusão:** Serão elegíveis para o estudo as crianças de 9 a 23 meses de idade, de ambos os sexos, que serão vacinadas contra febre amarela, cujos pais ou responsáveis assinarem o termo de consentimento.

**Critério de Exclusão:** Não serão incluídas crianças que receberem outras vacinas no intervalo de 30 dias antes ou depois da vacina contra febre amarela, que apresentem

imunodepressão permanente ou transitória, inclusive aquelas em tratamento com corticosteróides em doses acima de 2 mg/kg de peso, e aquelas com doenças auto-imunes, imunodepressão transitória ou permanente, induzida por doenças (neoplasias, AIDS, etc) ou pelo tratamento (drogas imunossupressoras, radioterapia, etc). Uso de corticosteróides (p.ex., prednisona, dexametasona) por menos de 2 semanas, ou de uso tópico ou por inalação, não indicam exclusão do estudo, mas deverão ser registrados no questionário constante no Anexo II do projeto apresentado. Também não serão incluídas crianças com hemoglobinopatias e crianças com antecedentes de transfusão de sangue ou de tratamento com soro hiperimune até 90 dias antes da coleta de sangue.

Riscos:

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 961.889

Por se tratar de trabalho envolvendo coleta de sangue, as crianças estarão expostas ao risco de hematoma no local da punção. A escolha de profissionais bem treinados pode diminuir a ocorrência de efeitos. O uso de luvas e materiais estéreis descartáveis evitará a ocorrência de possíveis contaminações associadas ao procedimento.

O risco de contaminação por material biológico durante o transporte será evitado com o uso de caixas de transporte adequadas.

**Benefícios:**

Os participantes poderão se beneficiar com o resultado da pesquisa uma vez que esse tipo de abordagem poderá contribuir para melhor compreensão dos mecanismos imunológicos associados ao procedimento de vacinação contra F.A. A pesquisa poderá estabelecer proposições futuras para o calendário de imunização, junto ao Ministério da Saúde.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo de coorte não controlado com análises imunológicas pareadas antes e após vacinação contra a F.A. Para tal, serão necessárias 60 amostras pareadas (60 amostras no período pré-vacinal e 60 amostras no período 30-45 dias pós-primovacinação) de crianças de ambos os sexos com idade entre 9 e 23 meses, residentes em áreas onde a vacina contra F.A. compõe o calendário básico de imunizações e que receberão a vacina na rotina das unidades básicas de imunização, nos dois primeiros anos de vida.

Em 2009, o protocolo "Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Crianças" foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/ENSP – No 13/10).

Naquele momento, o objetivo era avaliar a variação do estado imune para febre amarela de 1 mês a 10 anos após a vacinação, em crianças vacinadas nos dois primeiros anos de vida. No entanto, apesar de terem sido coletadas amostras de aproximadamente 1.400 crianças, segregadas segundo o tempo de pós-vacinação: 30-45 dias, 1, 2, 4, 7 e 10 anos, não foram coletadas amostras de crianças no período pré-vacinal, também denominadas amostras de crianças não vacinadas (NV). Em um protocolo posterior "Duração da Imunidade pós vacinal antiamarílica em adultos", os autores tiveram a oportunidade de avaliar em estudo pareado amostras de indivíduos não vacinados (NV) e com re-avaliação 30-45 dias após primovacinação. Neste estudo ficou evidente que dos 21 biomarcadores de memória avaliados, 19 biomarcadores foram selecionados como possíveis indicadores de proteção aos 30-45 dias após primovacinação (exceto CD4 de memória central e LB+IL-10+). Essa seleção prévia permitiu a monitoração mais segura de biomarcadores no contexto da duração da imunidade antiamarílica, sendo possível comparar a frequência desses biomarcadores, considerados "referência" nos diferentes períodos

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 961.889

pós-vacinação em relação ao período 30-45 dias. Dessa forma, há necessidade da inclusão de um grupo referência de crianças não vacinadas (NV), pareado a um grupo com 30-45 dias pós-primovacinação, para seleção de

possíveis indicadores de proteção em crianças. Esses biomarcadores serão empregados em estudo comparativo com os demais períodos pós vacinação já analisados em crianças durante a primeira fase em estudo financiado pelo Ministério da Saúde.

Os resultados do estudo poderão subsidiar os protocolos sobre a vacinação e decisões técnicas do PNI.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE está redigido de forma correta e de fácil compreensão a ser assinado pelo responsável da criança. Constam as informações necessárias que podem esclarecer o objetivo da pesquisa, seus riscos e seus benefícios.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os autores apresentam justificativas para a emenda ao projeto inicialmente apresentado e aprovado pelo CEP-Rene Rachou, que são apresentados a seguir:

1-A emenda foi necessária principalmente porque foi alterado o número de participantes na pesquisa (de 100 para 60 crianças). Além disso, a coleta de amostras para o estudo será realizada apenas no município de Ribeirão das Neves e não mais em Contagem e Ribeirão das Neves. Outros questionários e formulários foram incluídos. A equipe do projeto foi ampliada e ajustes no projeto foram feitos para seguir a formatação do Protocolo de Pesquisa. 2-As alterações realizadas no projeto original estão destacadas em amarelo no Protocolo de Pesquisa anexado ao projeto e apresentado na Plataforma.

Essas alterações não apresentam implicações éticas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após submissão e análise criteriosa do protocolo em questão, constatamos que o estudo atende

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 961.889

aos aspectos fundamentais da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela aprovação da Emenda do projeto de pesquisa proposto. Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios semestrais e final, bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

BELO HORIZONTE, 24 de Fevereiro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Naftale Katz**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br

## **ANEXO 7**

**Parecer Comitê de Ética da Escola Nacional de Saúde**

**Pública**

**(Tratamento das amostras de plasma do estudo matriz**

**com Ecteola-Celulose®)**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos níveis de anticorpos neutralizantes e a taxa de soropositividade anti-amarílica em plasma contendo heparina

**Pesquisador:** Martins-Filho OA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47136115.0.0000.5091

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.249.195

**Apresentação do Projeto:**

Este projeto visa estabelecer um protocolo específico para uso de amostras de plasma, obtidas de sangue coletado em heparina sódica, na avaliação dos níveis de anticorpos neutralizantes contra o vírus da febre amarela bem como na taxa de soropositividade anti-amarílica. Isto é relevante já que a heparina pode interferir nos níveis destes anticorpos (resultados falso-positivos). Para tal, a metodologia proposta envolve utilizar um reagente ( Celulose-Ecteola) que é capaz de remover cerca de 90% da heparina presente em amostras de plasma. Isto vai permitir utilizar plasmas heparinizados para a dosagem correta de anticorpos neutralizantes anti-amarílicos. Para tal, o projeto envolve 1290 amostras (90 de Bambuí e 1200 de BH, áreas com cobertura de vacinação anti-amarílica) as quais encontram-se armazenadas no biorrepositório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR). A metodologia proposta envolve (i) estabelecer condições padrões para remoção de 90% ou mais da heparina sódica presente em amostras de plasma, empregando Celulose-Ecteola (ECT) e (ii) comparar a resposta de anticorpos neutralizantes contra febre amarela de amostras de plasma, obtidas de sangue coletado em heparina sódica e tratadas com ECT, imediatamente antes da primovacinação e 30-45 dias, 1, 2, 5, 7 e 10 anos após primovacinação (plasmas de crianças de 9 a 23 meses). Acredita-se que o conjunto de informações do estudo subsidiarão o Ministério da Saúde na

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cprr@cpqr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.249.195

definição do calendário de imunizações do Brasil, garantindo a manutenção da revacinação aos 10 anos de idade ou aderindo a nova recomendação da Organização Mundial da Saúde, que implicaria em uma única dose contra febre amarela sem indicação de revacinação.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo principal da pesquisa será o de estabelecer um protocolo específico para uso de amostras de plasma, obtidas de sangue coletado em heparina sódica, na avaliação dos níveis de anticorpos neutralizantes e a taxa de soropositividade anti-amarela.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Considerados reduzidos já que se pretende trabalhar com amostras de plasma congeladas (nenhuma nova coleta está sendo apresentada). NESTA VERSÃO REVISADA, A EQUIPE ENVOLVIDA ESCLARECEU QUE VAI GARANTIR O SIGILO EM RELAÇÃO a identidade dos envolvidos).

Benefícios:

Os dados obtidos serão importantes para subsidiar o Ministério da Saúde na definição do calendário de imunizações do Brasil, garantindo a manutenção da revacinação aos 10 anos de idade ou aderindo a nova recomendação da Organização Mundial da Saúde, que implicaria em uma única dose contra febre amarela sem indicação de revacinação.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A proposta apresentada pelo proponente é relevante, já que visa validar resultados prévios da equipe sobre a duração da resposta imune induzida contra a febre amarela. OS esclarecimentos solicitados – em relação aos riscos e ao biorepositório - foram respondidos. Portanto, pode se considerar aprovado o projeto.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Este projeto envolve amostras de plasma de indivíduos que encontram-se armazenadas no biorrepositório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR). Os pesquisadores solicitam a dispensa do TCLE já que o grupo não tem mais como rastrear uma vez que estes indivíduos ou já vieram a óbito e/ou pela impossibilidade de localização dos mesmos ou de seus familiares.

**Recomendações:**

Aprovar. Todas as pendências foram esclarecidas. Particularmente com a inclusão de um

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.249.195

regulamento que estabelece as normas de funcionamento e de armazenamento dos materiais biológicos coletados no âmbito do projeto de pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovar, pendências resolvidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após submissão e análise criteriosa do protocolo em questão, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPQRR/FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios anuais e final, bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_552430.pdf	14/08/2015 08:28:52		Acelto
Outros	Biorrepositorio.Projeto.Olindo.Avallacao.Niveis.R1.doc	14/08/2015 08:27:14		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROTOCOLO DE PESQUISA.Olindo.Assis.Avallacao.Niveis.R1.docx	14/08/2015 08:25:25		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_552430.pdf	10/07/2015 13:52:51		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	10/07/2015 13:48:20		Acelto
Outros	Biorrepositorio.Projeto.Olindo.Avallacao.Niveis.doc	10/07/2015 13:48:11		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROTOCOLO DE PESQUISA.Olindo.Assis.Avallacao.Niveis.docx	10/07/2015 13:47:35		Acelto
Folha de Rosto	Folha.Rosto.Avallacao.Niveis.pdf	10/07/2015 13:44:03		Acelto

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 1.249.195

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 29 de Setembro de 2015

---

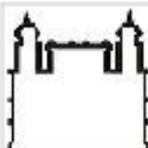
**Assinado por:**  
**Naftale Katz**  
(Coordenador)

## **ANEXO 8**

**Parecer Comitê de Ética da Escola Nacional de Saúde**

**Pública**

**(Projeto de Tese)**



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Duração da imunidade pós-vacinação contra febre amarela em crianças - estudo complementar sobre imunidade humoral.

**Pesquisador:** Tatiana Guimarães de Noronha

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 45946915.1.0000.5240

**Instituição Proponente:** Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

**Patrocinador Principal:** CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO  
Financiamento Próprio  
FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.152.643

**Data da Relatoria:** 01/07/2015

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Doutorado em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, da aluna Tatiana Guimarães de Noronha com orientação de Luiz Antonio Bastos Camacho, qualificado em 05 de fevereiro de 2015. O período de coleta de dados é entre julho a agosto de 2015, sendo a apresentação da tese para 2015. O orçamento do projeto é de R\$18.584,00 com financiamento do CNPq e Funasa.

Segundo a proponente este estudo é um acréscimo ao estudo matriz "Estudo de Duração da Imunidade Pós-Vacinação contra Febre Amarela em Crianças". Este projeto prevê um procedimento laboratorial adicional para avaliação do componente humoral da imunidade "tratamento do plasma com Ecteola Celulose" nas amostras já coletadas e análise adicional dos dados."

#### Objetivo da Pesquisa:

A proponente descreve como objetivos:

Objetivo Geral:

"Avaliar a duração da imunidade para febre amarela em crianças de 9 meses a 12 anos de idade,

**Endereço:** Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.041-210

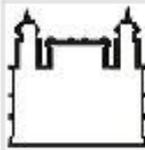
**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)2598-2863

**Fax:** (21)2598-2863

**E-mail:** cep@ensp.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.152.643

vacinadas nos dois primeiros anos de vida, e classificadas segundo o tempo pósvacinação nas seguintes categorias: (a) 30 a 45 dias; (b) 1 ano após vacinação; (c) 2 anos após vacinação; (d) 4 anos pós-vacinação; (e) 7 anos após vacinação; (f) 10 anos após vacinação. Estimar e comparar a proporção de soropositividade e a média geométrica dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes contra febre amarela em crianças vacinadas anteriormente (nos dois primeiros anos de vida) com única dose de vacina contra febre amarela, com idade atual entre 9 meses a 12 anos, categorizadas de acordo com o tempo pósprimovacinação em: (a) 30 a 45 dias após vacinação; (b) 1 ano após vacinação; (c) 2 anos após vacinação; (d) 4 anos pós-vacinação; (e) 7 anos após vacinação; (f) 10 anos após vacinação."

**Objetivo Específico:**

"Comparar a proporção de soropositividade e a média geométrica dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes, com os resultados da análise de imunidade celular realizada pelo CPqGM em amostras de sangue coletadas simultaneamente na mesma população de estudo, nos seguintes intervalos de tempo: (a) 30 a 45 dias após a vacinação; (b) 1 ano após vacinação; (c) 2 anos após vacinação; (d) 4 anos pós-vacinação; (e) 7 anos após vacinação; (f) 10 anos após vacinação.- Analisar a exposição ao vírus da dengue e sua correlação com os resultados dos testes sorológicos para febre amarela."

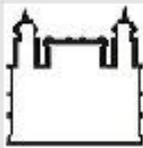
**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A proponente descreve:

**Benefícios:** "O benefício direto para os participantes da pesquisa será a verificação da imunidade contra febre amarela, que exige exames especiais e não disponíveis no SUS. Os resultados dos exames de sangue feitos durante a pesquisa serão informados ao sujeito de pesquisa, por escrito, e uma nova dose de vacina será recomendada aos que não tiverem anticorpos contra febre amarela detectados."

**Riscos:** "O presente projeto de pesquisa corresponde à introdução de um procedimento laboratorial não previsto no protocolo do estudo original, sem coleta de informações adicionais, seja através de questionários ou coleta de material biológico. Será feita retestagem laboratorial das amostras de sangue coletadas anteriormente, sem riscos adicionais àqueles contemplados no projeto de pesquisa original."

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2598-2863 Fax: (21)2598-2863 E-mail: csp@ensp.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.152.643

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O protocolo de pesquisa apresentado possui os elementos necessários à apreciação ética.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A proponente apresentou os seguintes documentos:

Folha de Rosto

Formulário de encaminhamento do projeto

PB\_Informações\_básicas\_do\_projeto

Projeto matriz aprovado pelo CEP/ENSP em 26fev2010

Projeto de doutorado de Tatiana Noronha

Parecer CEP/ENSP de 26fev2010

Cronograma

Orçamento

Termo de autorização para acesso ao banco de dados

Termo de compromisso de utilização dos dados

**Recomendações:**

No PB\_Informações\_Básicas encontra-se a informação de formação de biorrepositório, porém o TCLE do estudo matriz continha a informação de que as amostras seriam utilizadas somente para os testes previstos. Assim, ao término do estudo as mesmas devem ser descartadas.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

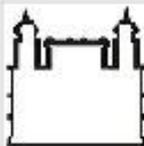
O projeto acrescenta um procedimento laboratorial, que complementa as análises do projeto matriz.

Este projeto é um sub-projeto, pois não altera objetivos e não tem impacto aos participantes. Os objetivos e metodologia descritos são os do projeto matriz. Apesar do cronograma no PB estar com início 02 de julho, no cronograma anexo está por mes enfatizando que o projeto inicia após aprovação do CEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2598-2863 Fax: (21)2598-2863 E-mail: cep@ensp.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.152.643

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- \* Em atendimento ao subitem II.19 da Resolução CNS nº 466/2012, cabe ao pesquisador responsável pelo presente estudo elaborar e apresentar relatório final "[...] após o encerramento da pesquisa, totalizando seus resultados". O relatório deve ser enviado ao CEP pela Plataforma Brasil em forma de "notificação". O modelo de relatório que deve ser seguido se encontra disponível em [www.ensp.fiocruz.br/etica](http://www.ensp.fiocruz.br/etica).
- \* Qualquer necessidade de modificação no curso do projeto deverá ser submetida à apreciação do CEP, como emenda. Deve-se aguardar parecer favorável do CEP antes de efetuar a modificação.
- \* Justificar fundamentadamente, perante o CEP, caso haja interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

RIO DE JANEIRO, 17 de Julho de 2015

---

**Assinado por:**  
**Carla Lourenço Tavares de Andrade**  
**(Coordenador)**

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2598-2863 Fax: (21)2598-2863 E-mail: [cep@ensp.fiocruz.br](mailto:cep@ensp.fiocruz.br)

# **APÊNDICE 1**

## **Análise Complementar de Perdas para o Reteste**

Participantes de Pesquisa	Idade no dia da coleta de sangue (meses)					
	Número	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-padrão	Mediana
Aderentes ao protocolo estudo matriz	1138	10	147	56,5	41,3	37
Testados após Ecteola (Pseudo-soro)	824	10	147	56,7	42,3	37

**Tabela 19:** Distribuição por idade de todos os participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo.

Participantes de Pesquisa	Gênero	Número	%
Aderentes ao protocolo estudo matriz	Masculino	561	49,3
	Feminino	577	50,7
	Total	1138	100,0
Testados após Ecteola (Pseudo-soro)	Masculino	408	49,5
	Feminino	416	50,5
	Total	824	100,0

**Tabela 20:** Distribuição por gênero de todos os participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo.

Participantes de Pesquisa	Viagem para área de risco	Número	%
Aderentes ao protocolo estudo matriz	Não	782	68,7
	Sim	305	26,8
	Sem informação	51	4,5
	Total	1138	100,0
Testados após Ecteola (Pseudo-soro)	Não	560	68,0
	Sim	223	27,1
	Sem informação	41	5,0
	Total	824	100,0

**Tabela 21:** Distribuição dos participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo, segundo informação de viagem para outras áreas de risco para febre amarela.

Participantes de Pesquisa	Tempo após a vacinação em meses					Mediana
	Número	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-padrão	
Aderentes ao protocolo estudo matriz	1138	0	141	46,6	40,5	28,0
Testados após Ecteola (Pseudo-soro)	824	0	141	46,7	42,1	27,0

**Tabela 22:** Distribuição dos participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo, segundo tempo após vacinação contra febre amarela em meses.

Participantes de Pesquisa	Categorias de tempo após a vacinação	Número	%
Aderentes ao protocolo estudo matriz	0-6 meses	203	17,8
	7-18 mese	189	16,6
	19-30 meses	198	17,4
	31-72 meses	201	17,7
	73-100 meses	190	16,4
	> 100 meses	157	13,8
	Total	1138	100,0
Testados após Ecteola (Pseudo-soro)	0-6 meses	165	20,0
	7-18 mese	140	17,0
	19-30 meses	136	16,5
	31-72 meses	122	14,8
	73-100 meses	135	16,4
	> 100 meses	126	15,3
	Total	824	100,0

**Tabela 23:** Distribuição dos participantes de pesquisa que aderiram ao protocolo do estudo matriz e do subgrupo para os quais havia amostra biológica suficiente para análise do presente estudo, segundo categorias de tempo desde a vacinação contra febre amarela.

Tempo após a vacinação	Soronegativo		Indeterminado		Soropositivo		Teste não realizado	
	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
0 a 6 meses	9	4,4	13	6,4	143	70,5	38	18,7
7 a 18 meses	13	6,9	20	10,6	107	56,6	49	25,9
19 a 30 meses	15	7,6	24	12,1	97	49,0	62	31,3
31 a 72 meses	28	13,9	22	11,0	72	35,8	79	39,3
73 a 100 meses	48	25,3	30	15,8	57	30,0	55	28,9
Superior a 100 meses	36	22,9	32	20,4	58	36,9	31	19,8

**Tabela 24:** Status sorológicos dos participantes de pesquisa por tempo desde a vacinação contra febre amarela, incluindo aqueles sem informação por indisponibilidade de material biológico para análise do presente estudo (“Teste não realizado”).

## **APÊNDICE 2**

### **Análise Multivariada – Procedimentos de Modelagem**

## REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA

Dicionários das Variáveis Incluídas no Estudo	
Variáveis	Descrição das Variáveis
Resposta “reteste” ou “log_teste2”	Título de anticorpos contra febre amarela em recíproca da diluição (“reteste”) ou em $\text{Log}_{10}$ (“log_teste2”)
Explicativa “tempo_meses_Col_VFA” ou “tempVaxFA_cat”	Intervalo de tempo desde a vacinação (contínua = “tempo_meses_Col_VFA” ou categórica = “tempVaxFA_cat”)
Covariável 1 “idade_meses_coleta”	Idade em meses no momento da coleta de sangue (contínua)
Covariável 2 “sexo”	Gênero (masculino ou feminino)
Covariável 3 “idade-BCG”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra tuberculose (contínua)
Covariável 4 “idade-hepB”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra hepatite B (contínua)
Covariável 5 “idade-pólio”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra poliomielite (contínua)
Covariável 6 “idade-tetra”	Idade em meses na dose mais recente da vacina tetravalente (contínua)
Covariável 7 “idade-tv”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra sarampo-caxumba-rubéola (contínua)
Covariável 8 “idade-menC”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra meningocócica (contínua)
Covariável 9 “idade-pneu10”	Idade em meses na dose mais recente da vacina Pneumocócica (contínua)
Covariável 10 “idade-ouvac1”	Idade em meses na dose mais recente de outras vacinas relatadas (contínua)
Covariável 11 “idade-ouvac2”	Idade em meses na dose mais recente de outras vacinas relatadas (contínua)
Covariável 12 “idade-ouvac3”	Idade em meses na dose mais recente de outras vacinas relatadas (contínua)
Covariável 13 “ante_dça_grave”	Antecedentes de doenças graves (sim ou não)
Covariável 12 “Comorbidade”	Comorbidades (sim ou não)
Covariável 13 “viagemareariscofa”	Antecedentes de viagens a áreas de risco de transmissão de febre amarela (sim ou não)
Covariável 14	Aplicação de vacinas injetáveis de vírus atenuado

“vacinaviva_30dias”	simultaneamente ou em até 30 dias antes da vacinação contra febre amarela (sim ou não)
---------------------	--

**Quadro 2:** Dicionário de variáveis para os modelos de regressão linear múltipla.

**Modelo 1 – Modelo Completo:**

Modelo 1:  $y \sim$  tempo\_meses\_Col\_VFA + idade\_meses\_coleta + sexo + idade\_BCG + idade\_hepB + idade\_polio + idade\_tetra + ante\_dça\_grave + Comorbidade + viagemareariscofa + vacinaviva\_30dias)

```
Resíduos:
      Min      1Q   Median      3Q      Max
-1.37817 -0.44308 -0.00566  0.40299  1.90667

Coeficientes:
              Estimate   Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercepto)      1.5212179   0.0975494  15.594 <2e-16 ***
tempo_meses_Col_VFA -0.0184251   0.0097303  -1.894  0.0586 .
idade_meses_coleta  0.0129207   0.0095935   1.347  0.1784
sexo2              0.0080825   0.0416108   0.194  0.8460
idade_BCG          -0.0003197   0.0006098  -0.524  0.6002
idade_hepB         -0.0001489   0.0002368  -0.629  0.5297
idade_polio        -0.0028319   0.0016249  -1.743  0.0818 .
idade_tetra        0.0027524   0.0016692   1.649  0.0996 .
ante_dça_grave1    -0.0462830   0.0538963  -0.859  0.3907
Comorbidade1      -0.0100851   0.0628252  -0.161  0.8725
viagemareariscofa1 -0.0246424   0.0482842  -0.510  0.6099
viagemareariscofa9 -0.1431318   0.1020495  -1.403  0.1611
vacinaviva_30dias1 -0.0775852   0.0818041  -0.948  0.3432
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.5867 on 787 degrees of freedom
(4 observations deleted due to missingness)
Multiple R-squared:  0.1768,    Adjusted R-squared:  0.1643
F-statistic: 14.09 on 12 and 787 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

Verificou-se que a maioria das variáveis não é significativa e o modelo possui um poder de explicação baixo (16,43%). Foi feita, então, a retirada das variáveis não significativas do modelo, uma a uma, com a ordem de saída dada pelos seus p-valores (p-valor de 0,10 como referencia inicial). As variáveis permanentes, significativas foram incluídas no Modelo 2, descrito a seguir.

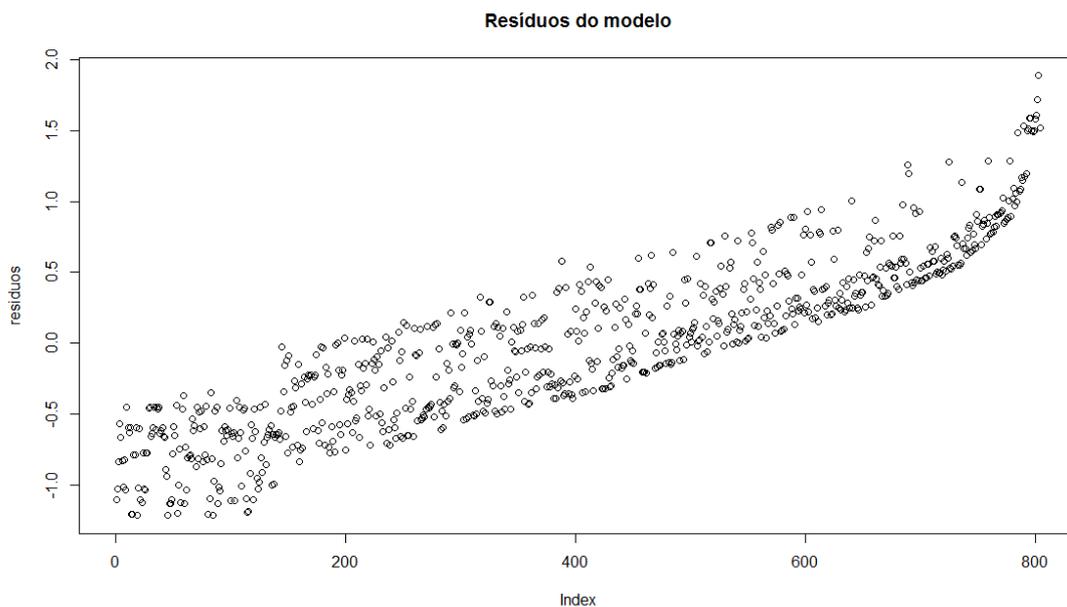
## Modelo 2 – Modelo reduzido, com as variáveis significativas provenientes do Modelo 1.

```
Modelo 2: y ~ dados$tempo_meses_Col_VFA + dados$idade_polio
```

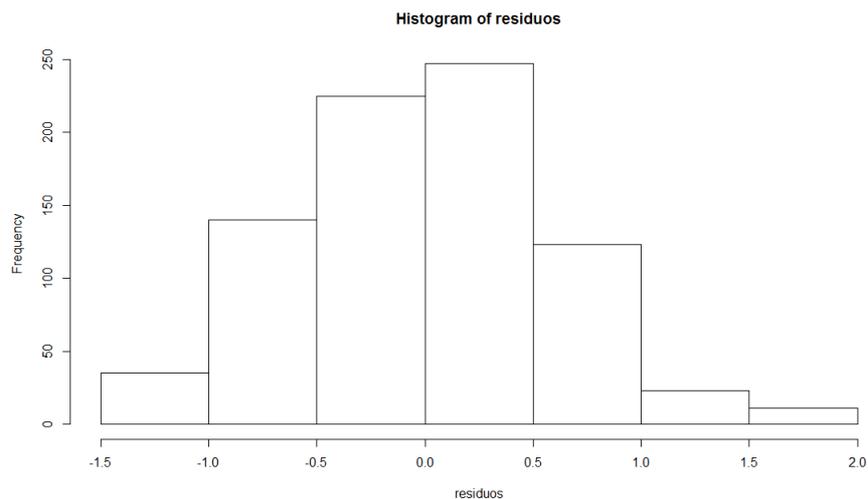
```
Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.21609 -0.45499  0.00448  0.40916  1.88788

Coefficients:
                Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      1.6354829   0.0375358   43.57 < 2e-16 ***
dados$tempo_meses_Col_VFA -0.0049213   0.0008398   -5.86 6.76e-09 ***
dados$idade_polio    -0.0031839   0.0015998   -1.99  0.0469 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.5863 on 801 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.1653,    Adjusted R-squared:  0.1632
F-statistic: 79.31 on 2 and 801 DF,  p-value: < 2.2e-16
```



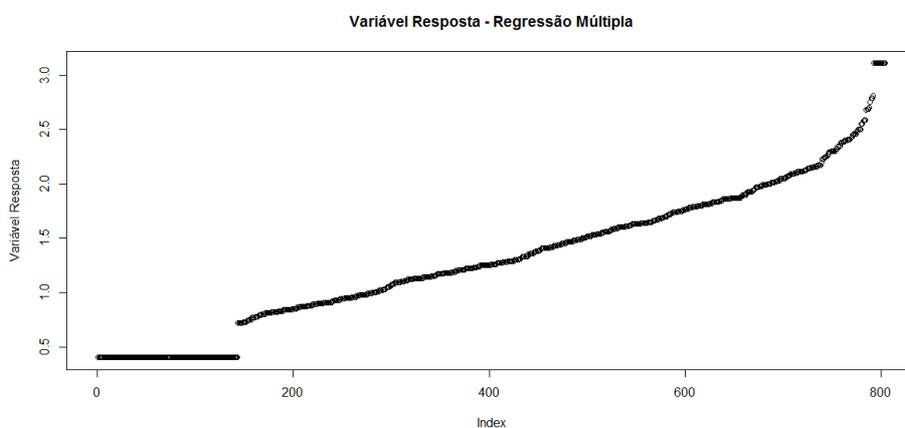
**Figura 14:** Análise de resíduos do Modelo 2



**Figura 15:** Distribuição dos resíduos - Modelo 2

No Modelo 2, as variáveis “tempo\_meses\_Col\_VFA” e “idade\_polio” foram significativas, e o seu aumento está associado à redução da variável resposta. Entretanto, esse modelo permanece com um baixo poder de explicação (16,32%) e não atende aos pressupostos de normalidade dos erros ( $p$ -valor =  $3.78e-05$ , Teste de Shapiro), os resíduos não são aleatórios ( $p$ -valor <  $2.2e-16$ , Teste de Correlação de Pearson) e possui problemas de heterocedasticidade ( $p$ -valor = 0.00041).

Como foi observada uma quebra estrutural da variável resposta, que muda abruptamente de comportamento no ponto equivalente a 0,5 da variável “log\_teste2” (Figura 15), além das variáveis do Modelo 1, foi acrescentada uma variável *dummy*, chamada de “Dummy 1”, com o objetivo de captar os casos em que o “log\_teste2” foi inferior a 0,5.



**Figura 16:** Distribuição da variável resposta em log 10.

Assim, chegou-se ao Modelo 3, que contemplou 3 variáveis que se apresentaram como significativas após a inclusão da variável “Dummy 1”.

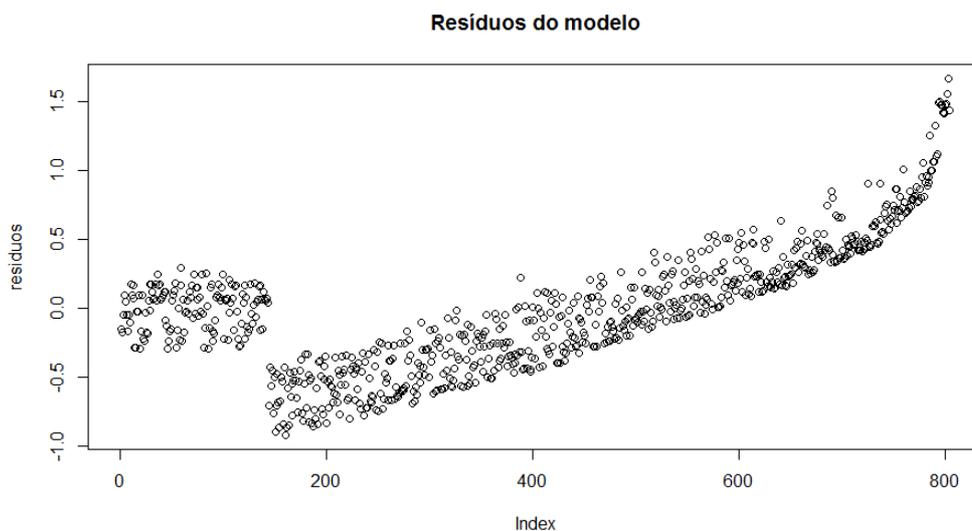
**Modelo 3** – Composto por variáveis selecionadas a partir do Modelo 1, com acréscimo da variável dummy, chamada “Dummy1”

Modelo 3:  $y \sim \text{tempo\_meses\_Col\_VFA} + \text{idade\_polio} + \text{ante\_d\c{a}\_grave} + \text{dummy}$

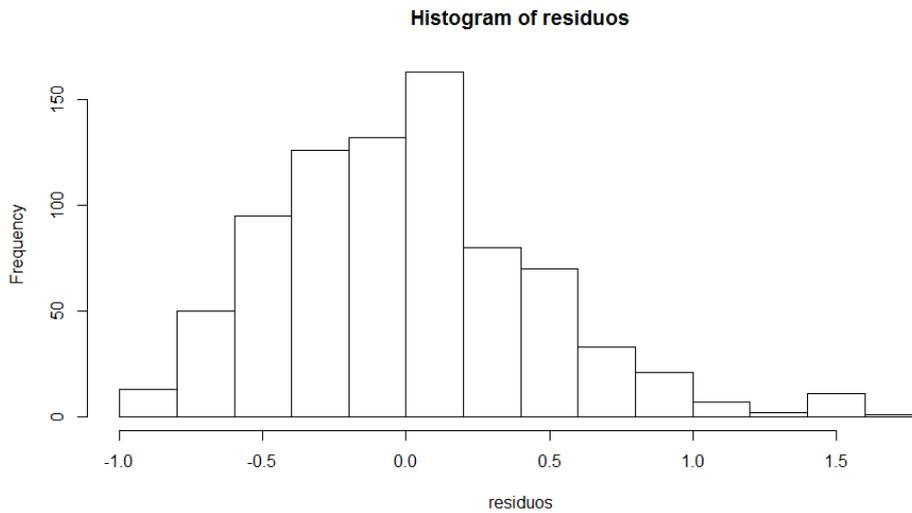
```
Resíduos:
      Min      1Q   Median      3Q      Max
-0.91522 -0.32543 -0.02203  0.24672  1.66608

Coeficientes:
                Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      1.7044598  0.0300044  56.807 < 2e-16 ***
tempo_meses_Col_VFA -0.0028533  0.0006585  -4.333 1.66e-05 ***
idade_polio        -0.0022554  0.0012432  -1.814  0.0700 .
ante_d\c{a}\_grave1 -0.0731673  0.0403354  -1.814  0.0701 .
dummy              -0.9998785  0.0435200 -22.975 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.4553 on 799 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.4978,    Adjusted R-squared:  0.4953
F-statistic:  198 on 4 and 799 DF,  p-value: < 2.2e-16
```



**Figura 17:** Distribuição de Resíduos – Modelo 3



**Figura 18:** Histograma de Resíduos - Modelo 3

Com a introdução da variável “dummy1”, as três variáveis do Modelo 3 “tempo\_meses\_Col\_VFA”, “idade\_polio” e a variável “ante\_dça\_grave” foram significativas e demonstraram uma relação inversa com a variável dependente. Ou seja, o aumento das variáveis contínuas (“tempo\_meses\_Col\_VFA” e “idade\_polio”), assim como a presença de antecedente de doença grave, levam a uma redução da variável resposta.

O poder de explicação do Modelo 3 (49,53%) foi maior que o do Modelo 2, porém, também não atendeu aos pressupostos de normalidade dos erros ( $p$ -valor =  $7.426e-11$ , teste de Shapiro-Wilk), os resíduos não são aleatórios ( $p$ -valor <  $2.2e-16$ , teste de correlação de Pearson) e possui problemas de heterocedasticidade ( $p$ -value <  $2.2e-16$  para o teste de homocedasticidade).

Assim, partiu-se para o Modelo 4, mantendo a variável “dummy1”, com retirada de alguns valores atípicos, com o objetivo de verificar se esses casos estão contribuindo para o modelo não atender aos pressupostos. Para tal, foram desconsiderados 11 casos com títulos de anticorpos acima de 1280 na recíproca da diluição.

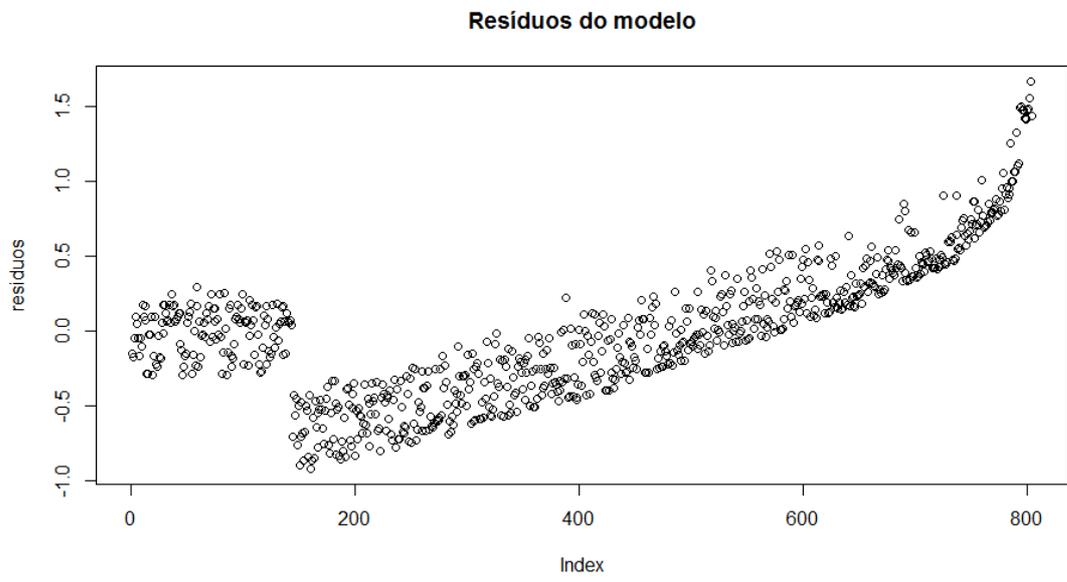
**Modelo 4** – Composto por variáveis selecionadas a partir do Modelo 1, com acréscimo da variável dummy, chamada “Dummy1” e remoção de valores atípicos da variável “reteste”.

```
Modelo 4:y ~ tempo_meses_Col_VFA + idade_polio + ante_dça_grave + dummy
```

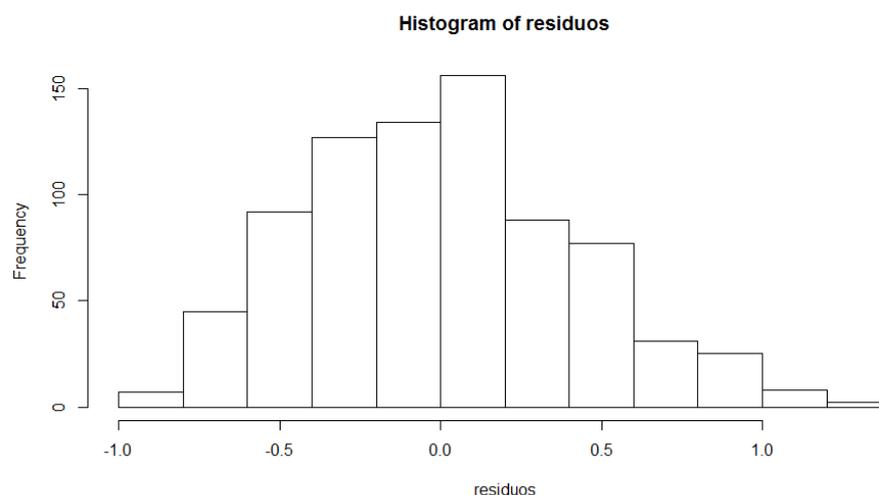
```
Resíduos:
      Min      1Q   Median      3Q      Max
-0.86982 -0.30494 -0.01378  0.25423  1.34726

Coeficientes:
              Estimate   Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    1.657074    0.027943  59.301 < 2e-16 ***
tempo_meses_Col_VFA -0.002543  0.000607  -4.189 3.12e-05 ***
idade_polio     -0.002028  0.001147  -1.768  0.0775 .
ante_dça_grave1 -0.071508  0.037392  -1.912  0.0562 .
dummy          -0.983654  0.040098 -24.531 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.4193 on 787 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.5236,    Adjusted R-squared:  0.5212
F-statistic: 216.3 on 4 and 787 DF,  p-value: < 2.2e-16
```



**Figura 19:** Distribuição de Resíduos – Modelo 4



**Figura 20:** Histograma de Resíduos - Modelo 4

No Modelo 4, novamente as variáveis “tempo\_meses\_Col\_VFA”, “idade\_polio” e “ante\_dça\_gravel” foram significativas, de modo que o seu aumento ou ocorrência (no caso específico do antecedente de doença-grave) levaram à redução da variável resposta. Houve um pequeno aumento do poder de explicação (52,12%) em relação aos modelos anteriores, entretanto, o modelo permaneceu sem atender aos pressupostos de aleatoriedade dos erros ( $< 2.2e-16$ , teste de correlação de Pearson), normalidade ( $p$ -valor =  $1.367e-06$ , teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade ( $p$ -value =  $2.791e-08$  para o teste de homocedasticidade).

Em seguida, foram acrescentadas à modelagem duas variáveis do tipo *dummy*: “dummy1”, para os casos em que o “log\_teste2” era menor que 0,5; “dummy2” para os casos em que o “log\_teste2” maior ou igual a 2,2. Isso se justifica pela quebra estrutural da variável resposta que muda de comportamento nesses dois pontos (Figura 16).

**Modelo 5** – Variáveis significativas identificadas anteriores mais duas variáveis do tipo *dummy*.

```
Modelo 5: y ~ tempo_meses_Col_VFA + ante_dça_grave + dummy + dummy2
```

```
Resíduos:
      Min      1Q   Median      3Q      Max
-0.73847 -0.24831 -0.01793  0.22208  0.92730

Coeficientes:
              Estimate   Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    1.5058250   0.0204930  73.480 < 2e-16 ***
tempo_meses_Col_VFA -0.0023350   0.0003177  -7.350 4.91e-13 ***
ante_dça_grave1  -0.0669831   0.0309782  -2.162  0.0309 *
dummy          -0.9344158   0.0335332 -27.865 < 2e-16 ***
dummy2         1.1032264   0.0465813  23.684 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.3497 on 799 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.7037,    Adjusted R-squared:  0.7023
F-statistic: 474.5 on 4 and 799 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

No modelo 5, as variáveis significativas foram apenas “tempo\_meses\_Col\_VFA” e “ante\_dça\_grave1”, demonstrando que o aumento do intervalo de tempo entre a vacinação e avaliação de imunogenicidade, assim como a ocorrência de antecedente de doença grave, levam a uma redução do valor da variável resposta, ou seja, da transformação logarítmica do título de anticorpos pós-vacinação contra febre amarela em recíproca da diluição. Com a introdução das variáveis do tipo “dummy” no modelo, houve um aumento considerável no seu poder de explicação do modelo (70,23%). Entretanto, persistem os problemas com os seus pressupostos, pois os erros não são aleatórios (< 2.2e-16, teste de correlação de Pearson) e normalmente distribuídos (p-valor = 2.231e-07, teste de Shapiro-Wilk), além da heterocedasticidade (p-valor = 0.00013 para o teste de homocedasticidade).

Em seguida, realizou-se a modelagem considerando a variável explicativa tempo desde a vacinação contra febre amarela como categórica, no chamado Modelo 6.

**MODELO 6** – Variável explicativa que era de tempo contínua pela categórica e mantiveram-se as dummies.

```

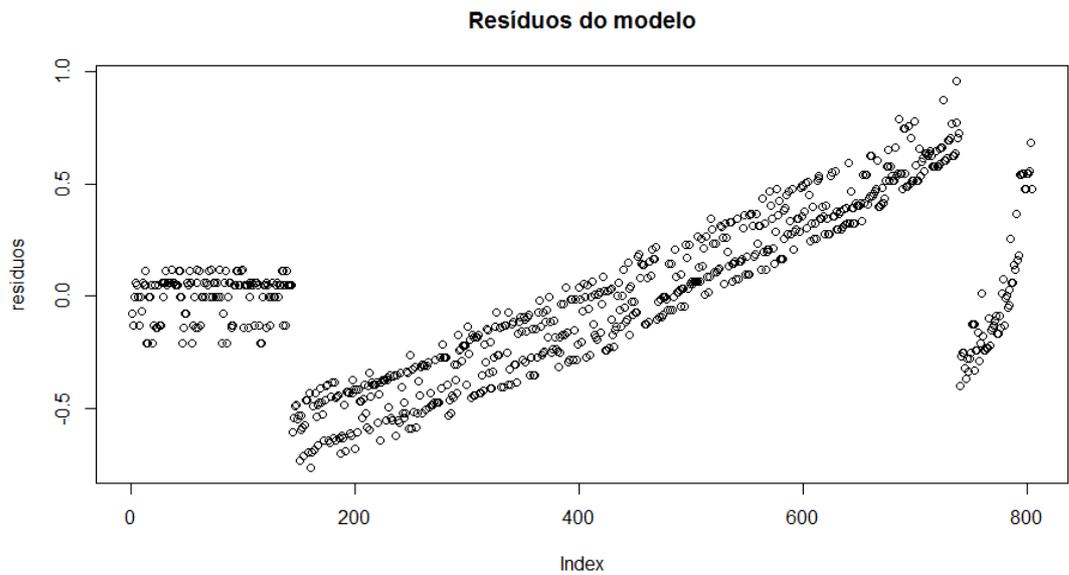
Modelo 6: y ~ tempVaxFA_cat + ante_dça_grave + dummy + dummy2)

Resíduos:
      Min      1Q   Median      3Q      Max
-0.76421 -0.25363 -0.00403  0.24801  0.95731

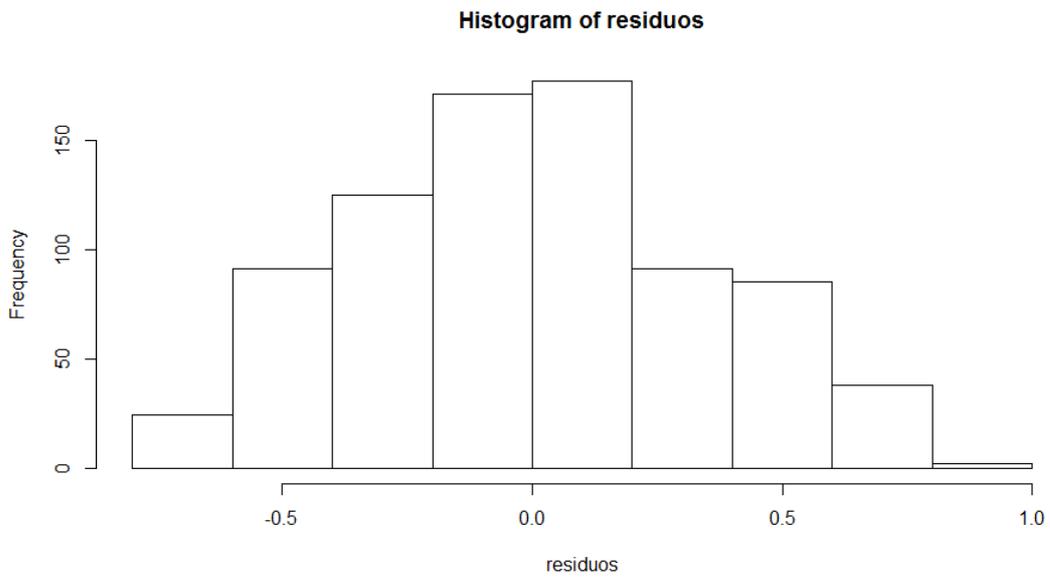
Coeficientes:
              Estimate   Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercepto)   1.53421     0.02887  53.147 < 2e-16 ***
tempVaxFA_cat1 -0.06890     0.04041  -1.705  0.0885 .
tempVaxFA_cat2 -0.07887     0.04101  -1.923  0.0548 .
tempVaxFA_cat3 -0.20632     0.04266  -4.837 1.58e-06 ***
tempVaxFA_cat4 -0.26066     0.04279  -6.092 1.74e-09 ***
tempVaxFA_cat5 -0.26872     0.04461  -6.024 2.59e-09 ***
ante_dça_grave1 -0.06087     0.03110  -1.957  0.0507 .
dummy          -0.92386     0.03371 -27.403 < 2e-16 ***
dummy2         1.09632     0.04681  23.423 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.3488 on 795 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.7069,    Adjusted R-squared:  0.7039
F-statistic: 239.7 on 8 and 795 DF,  p-value: < 2.2e-16

```



**Figura 21:** Distribuição de Resíduos - Modelo 6.



**Figura 22:** Histograma de Resíduos - Modelo 6

## REGRESSÃO LOGÍSTICA

Variáveis	Descrição das Variáveis
Resposta “soropositividade_reteste_10”	Soropositividade à vacina contra febre amarela (sim ou não) “soropositividade_reteste_10”
Explicativa “tempo_meses_Col_VFA” ou “tempVaxFA_cat”	Intervalo de tempo desde a vacinação (contínua - “tempo_meses_Col_VFA” ou categórica - “tempVaxFA_cat”)
Covariável 1	Idade em meses no momento da coleta de sangue (contínua)

“idade_meses_coleta”	
Covariável 2 “sexo”	Gênero (masculino ou feminino)
Covariável 3 “idade-BCG”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra tuberculose (contínua)
Covariável 4 “idade-hepB”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra hepatite B (contínua)
Covariável 5 “idade-pólio”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra poliomielite (contínua)
Covariável 6 “idade-tetra”	Idade em meses na dose mais recente da vacina tetravalente (contínua)
Covariável 7 “idade-tv”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra sarampo-caxumba-rubéola (contínua)
Covariável 8 “idade-menC”	Idade em meses na dose mais recente da vacina contra meningocócica (contínua)
Covariável 9 “idade-pneu10”	Idade em meses na dose mais recente da vacina Pneumocócica (contínua)
Covariável 10 “idade-ouvac1”	Idade em meses na dose mais recente de outras vacinas relatadas (contínua)
Covariável 11 “idade-ouvac2”	Idade em meses na dose mais recente de outras vacinas relatadas (contínua)
Covariável 12 “idade-ouvac3”	Idade em meses na dose mais recente de outras vacinas relatadas (contínua)
Covariável 13 “ante_dça_grave”	Antecedentes de doenças graves (sim ou não)
Covariável 14 “Comorbidade”	Comorbidades (sim ou não)
Covariável 15 “viagemareariscofa”	Antecedentes de viagens a áreas de risco de transmissão de febre amarela (sim ou não)
Covariável 16 “vacinaviva_30dias”	Aplicação de vacinas injetáveis de vírus atenuado simultaneamente ou em até 30 dias antes da vacinação contra febre amarela (sim ou não)

**Quadro 3:** Dicionário de variáveis para os modelos de regressão logística.

## Modelo 1- Modelo completo.

```
Deviance Resíduos:
  Min      1Q  Median      3Q      Max
-2.0688 -1.0651  0.5475  0.8192  1.6299

Coeficientes:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercepto)      1.7137082  0.3360166   5.100  3.4e-07 ***
(tempVaxFA_cat, ref = "0")1 -0.9166831  0.3858369  -2.376  0.0175 *
(tempVaxFA_cat, ref = "0")2 -1.3555872  0.5590194  -2.425  0.0153 *
(tempVaxFA_cat, ref = "0")3 -2.4776609  1.0250696  -2.417  0.0156 *
(tempVaxFA_cat, ref = "0")4 -3.9225230  1.7123459  -2.291  0.0220 *
(tempVaxFA_cat, ref = "0")5 -4.6448238  2.3989465  -1.936  0.0528 .
idade_meses_coleta      0.0213016  0.0200612   1.062  0.2883
sexo2                   -0.1328925  0.1606286  -0.827  0.4081
idade_BCG                -0.0037193  0.0038493  -0.966  0.3339
idade_hepB                0.0049425  0.0086934   0.569  0.5697
idade_polio              -0.0006334  0.0070422  -0.090  0.9283
idade_tetra               0.0009143  0.0059104   0.155  0.8771
(ante_dça_grave, ref = "0")1 -0.0493588  0.2035364  -0.243  0.8084
(Comorbidade, ref = "0")1  -0.0872681  0.2438351  -0.358  0.7204
(viagemareariscofa, ref = "0")1 -0.0475405  0.1820205  -0.261  0.7940
(viagemareariscofa, ref = "0")9 -0.7599901  0.3716698  -2.045  0.0409 *
(vacinaviva_30dias, ref = "0")1 -0.0596435  0.3203087  -0.186  0.8523
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 1034.67 on 799 degrees of freedom
Residual deviance: 923.31 on 783 degrees of freedom
(4 observations deleted due to missingness)
AIC: 957.31

Number of Fisher Scoring iterations: 7
```

<b>DEVIANCE</b>						
	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)	
NULL			799	1034.67		
(tempVaxFA_cat, ref = "0")	5	101.653	794	933.02	<2e-16	***
idade_meses_coleta	1	0.951	793	932.07	0.3296	
sexo	1	0.581	792	931.49	0.4461	
idade_BCG	1	2.098	791	929.39	0.1475	
idade_hepB	1	1.448	790	927.94	0.2288	
idade_polio	1	0.007	789	927.93	0.9327	
idade_tetra	1	0.009	788	927.92	0.9238	
(ante_dca_grave, ref = "0")	1	0.067	787	927.86	0.7965	
(Comorbidade, ref = "0")	1	0.201	786	927.66	0.6536	
(viagemareariscofa, ref = "0")	2	4.313	784	923.34	0.1157	
(vacinaviva_30dias, ref = "0")	1	0.035	783	923.31	0.8525	
---						
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

O modelo completo apresenta muitas variáveis não significativas e problemas de multicolinearidade, evidenciados valores muito elevados de VIF. Assim, seguiu-se com a retirada das variáveis não significativas do modelo, uma a uma, com ordem de saída dada pelos seus p-valores (superiores a 0,10). Se pelo menos uma categoria fosse significativa, a variável deveria permanecer no modelo.

## MODELO 2 – Variáveis significativas identificadas a partir do Modelo 1

<b>VIF</b>			
	GVIF	Df	GVIF^(1/(2*Df))
(tempVaxFA_cat, ref = "0")	1.041353	5	1.004060
(viagemareariscofa, ref = "0")	1.041353	2	1.010182

<b>DEVIANCE</b>						
	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)	
NULL			803	1041.84		
(tempVaxFA_cat, ref = "0")	5	100.247	798	941.59	< 2e-16	***
(viagemareariscofa, ref = "0")	2	5.184	796	936.40	0.07487	.

Deviance Resíduos:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.0131	-1.0801	0.5317	0.8259	1.6468

Coefficientes:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercepto)	1.88493	0.23043	8.180	2.84e-16 ***
(tempVaxFA_cat, ref = "0")1	-0.65553	0.30618	-2.141	0.03227 *
(tempVaxFA_cat, ref = "0")2	-0.92301	0.29948	-3.082	0.00206 **
(tempVaxFA_cat, ref = "0")3	-1.45260	0.29817	-4.872	1.11e-06 ***
(tempVaxFA_cat, ref = "0")4	-2.11825	0.29072	-7.286	3.19e-13 ***
(tempVaxFA_cat, ref = "0")5	-2.05035	0.30567	-6.708	1.98e-11 ***
(viagemareariscofa, ref = "0")1	-0.06172	0.17974	-0.343	0.73130
(viagemareariscofa, ref = "0")9	-0.82464	0.36611	-2.252	0.02429 *

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 1041.8 on 803 degrees of freedom

Residual deviance: 936.4 on 796 degrees of freedom

AIC: 952.4

Number of Fisher Scoring iterations: 4

### Cálculo de Razão de Chances (Odds Ratio – OR)

#### MODELO 1 - COMPLETO

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
tempVaxFA_cat			13,207	5	0,022			
tempVaxFA_cat(1)	-0,941	0,395	5,675	1	0,017	0,39	0,18	0,846
tempVaxFA_cat(2)	-1,493	0,568	6,918	1	0,009	0,225	0,074	0,684
tempVaxFA_cat(3)	-2,71	1,043	6,748	1	0,009	0,067	0,009	0,514
tempVaxFA_cat(4)	-4,213	1,744	5,833	1	0,016	0,015	0	0,452
tempVaxFA_cat(5)	-4,957	2,445	4,111	1	0,043	0,007	0	0,847
sexo(1)	-0,112	0,165	0,459	1	0,498	0,894	0,647	1,235
idade_hepB	0,005	0,009	0,352	1	0,553	1,005	0,988	1,023
idade_polio	0,001	0,007	0,005	1	0,942	1,001	0,986	1,015
idade_tetra	0,001	0,006	0,036	1	0,849	1,001	0,989	1,013
ante_dça_grave(1)	-0,01	0,209	0,002	1	0,962	0,99	0,657	1,491
Comorbidade(1)	-0,165	0,251	0,43	1	0,512	0,848	0,518	1,388
viagemareariscofa(1)	-0,049	0,182	0,072	1	0,789	0,952	0,666	1,362
vacinaviva_30dias(1)	-0,002	0,336	0	1	0,995	0,998	0,516	1,929
idade_meses_coleta	0,023	0,02	1,307	1	0,253	1,024	0,983	1,066
idade_BCG	-0,004	0,004	0,936	1	0,333	0,996	0,989	1,004
Constant	1,699	0,344	24,372	1	0	5,468		

a Variable(s) entered on step 1: tempVaxFA\_cat, sexo, idade\_hepB, idade\_polio, idade\_tetra, ante\_dça\_grave, Comorbidade, viagemareariscofa, vacinaviva\_30dias, idade\_meses\_coleta, idade\_BCG.

## MODELO 2 – FINAL

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
tempVaxFA_cat			87,996	5	0			
tempVaxFA_cat(1)	-0,695	0,303	5,252	1	0,022	0,499	0,275	0,904
tempVaxFA_cat(2)	-0,961	0,297	10,44	1	0,001	0,383	0,214	0,685
tempVaxFA_cat(3)	-1,507	0,294	26,31	1	0	0,222	0,125	0,394
tempVaxFA_cat(4)	-2,185	0,288	57,676	1	0	0,112	0,064	0,198
tempVaxFA_cat(5)	-2,031	0,291	48,871	1	0	0,131	0,074	0,232
Constant	1,872	0,229	66,803	1	0	6,5		

a Variable(s) entered on step 1: tempVaxFA\_cat.