Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Avaliação da Interferência da Vacinação contra Febre Amarela na Vacinação contra Rubéola

por

Juliana Romualdo do Nascimento da Silva

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientador principal: Prof. Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho
Segunda orientadora: Prof.ª Dr.ª Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira

Rio de Janeiro, junho de 2008.

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta dissertação, intitulada

"Avaliação da Interferência da Vacinação contra Febre Amarela na Vacinação contra Rubéola"

apresentada por

Juliana Romualdo do Nascimento da Silva

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.ª Dr.ª Guacira Corrêa de Matos

Prof. Dr. José Fernando de Souza Verani

Prof. Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho – Orientador principal

Dissertação defendida e aprovada em 11 de junho de 2008.

AGRADECIMENTOS

Não ao Deus barbudo sentado em uma nuvem branca, mas à força interior que motiva e constrói, tenha ela o nome que tiver.

Ao meu estimado orientador, Dr. Camacho, minha profunda admiração por seu trabalho, sua dedicação e sua extrema paciência nesses dois anos. Certamente aprendi com ele mais do que métodos epidemiológicos: aprendi sobre integridade, sobre seriedade e sobre a extrema relevância de ser preciso naquilo que se diz. Você fez diferença substancial em minha formação, foi estatisticamente significante!

À minha co-orientadora Dra. Marilda e sua equipe – principalmente Daise e Jaluzy - por estarem sempre disponíveis para responder minhas dúvidas sobre laboratório e para tantas amostras e retestes.

À equipe do Ministério da Saúde, especialmente da Coordenação Geral do PNI, de Bio-Manguinhos e da Secretaria de Saúde do DF, co-responsáveis pela elaboração do protocolo, financiamento do projeto, coleta e análise dos dados.

Aos professores dessa Escola, onde não só aprendi sobre métodos, mas também tive muitos exemplos de profissionalismo em que certamente me inspirarei.

À minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e, como não poderia ser diferente, em mais esta conquista.

Aos meus amigos, sempre fiéis, como só se promete em casamentos: na saúde e na doença, na alegria e na tristeza... Brindemos então, meus caros, a esta vitória!

A todos que participaram da minha vida nesses dois anos e que sabem como foi minha caminhada até aqui; todos vocês foram igualmente importantes.

Um agradecimento especial à minha filha Mariana, pessoa extremamente amada, mas que teve muitas vezes que ser preterida para que este trabalho fosse finalizado. Estou lhe devendo muitos e muitos passeios e brincadeiras...

ABSTRACT

The simultaneous administration of several vaccines in the same visit to the health care unit is widely recommended as a strategy to avert missing opportunities of vaccination. In Brazil, the yellow fever vaccine and a combined vaccine against measles, rubella and mumps (MRM) are given simultaneously to children at 12 months of age, on a routine basis, only in Distrito Federal. In other Brazilian states simultaneous administration of those vaccines is recommended for those who missed immunization against yellow fever at 9 months of age. Interference of other attenuated live virus vaccines was hypothesized to explain a suboptimal immune response to yellow fever vaccine in infants and was thought to be relevant when the country is deeply engaged in control of rubella. To evaluate the interaction of the yellow fever vaccine and the rubella vaccine combined with measles and mumps vaccines, a double-blind randomized trial with 17D/213 and 17DD yellow fever vaccine strains administered simultaneous to MRM (in separate injections) or with 30 days of interval was conducted. Children with 12 to 23 month old eligible for vaccination against yellow fever and rubella were invited to participate that study in public health care units of Distrito Federal. Serum samples obtained before and 30 days after vaccination were tested for antibodies against the target diseases. In children who were vaccinated simultaneously 90,6% and 66,8% seroconverted for rubella and yellow fever, respectively Among those vaccinated against yellow fever 30 days after MRM, seroconversion rates were 97,3% and 85,9% respectively. Consistently, geometric mean titers of rubella and of yellow fever antibodies were significantly lower in children vaccinated simultaneously. The immune response did not differ substantially across vaccine substrains. The study indicated that reciprocal interference in the immune response to the rubella component of MRM and the yellow fever vaccine justified a revision of vaccination schedules and recommendations of the Brazilian National Immunization Program.

Keywords: yellow fever vaccine, MMR vaccine, interaction/interference.

RESUMO

A administração simultânea de várias vacinas em uma mesma visita a um serviço de saúde é amplamente recomendada como uma estratégia de evitar a perda de oportunidades de vacinação. No Brasil, a vacina contra febre amarela e a vacina combinada contra sarampo, rubéola e caxumba (triviral) são dadas simultaneamente na rotina para crianças de 12 meses de idade apenas no Distrito Federal. Em outros estados brasileiros a administração simultânea dessas vacinas é recomendada para aqueles que não foram imunizados contra febre amarela aos 9 meses de idade**.** A interferência de outras vacinas de vírus vivos atenuados pode explicar a baixa resposta imune contra febre amarela em crianças e isto pode ser bastante relevante quando o país está fortemente engajado no controle da rubéola. Para avaliar a interação da vacina contra febre amarela e da vacina contra rubéola combinada com sarampo e caxumba foi conduzido um ensaio clínico randomizado duplo-cego com as vacinas 17D/213 e 17DD administradas concomitantemente com a vacina triviral (em injeções separadas) ou com 30 dias de intervalo. Crianças com 12 a 23 meses de idade elegíveis para vacinação contra febre amarela e rubéola foram convidadas a participar do estudo em unidades públicas de saúde do Distrito Federal. Amostras de soro obtidas antes e 30 dias após a vacinação foram testadas para anticorpos contra essas doenças. Em crianças vacinadas simultaneamente, 90,6% e 66,8% soroconverteram para rubéola e febre amarela, respectivamente. Entre os vacinados contra febre amarela 30 dias após a triviral, as proporções de soroconversão foram 97,3% e 85,9% respectivamente. Consistentemente, os títulos médios geométricos dos anticorpos contra rubéola e febre amarela foram significativamente menores nas crianças vacinadas simultaneamente. A resposta imune não diferiu entre as subcepas vacinais de febre amarela. O estudo indica que a interferência recíproca entre a resposta imune para o componente rubéola da triviral e para a vacina contra febre amarela justifica uma revisão dos calendários vacinais e recomendações do Programa Nacional de Imunizações brasileiro.

Palavras-chaves: vacina contra febre amarela, vacina triviral, interação/interferência.

SUMÁRIO

1. Introdução..... 1

1.1. Rubéola e Síndrome da Rubéola Congênita (SRC)..... 1

1.2 Vacina contra rubéola..... 2

1.3 Vigilância Epidemiológica da Rubéola..... 3

1.4 Febre amarela..... 5

1.5 Vacina contra febre amarela..... 9

1.6 Programa de Controle de Febre Amarela e Dengue..... 10

2. Justificativa..... 12

3. Objetivos..... 14

3.1. Objetivo geral..... 14

3.2. Objetivos específicos..... 14

4. Sujeitos e métodos..... 14

4.1. Delineamento geral do estudo..... 14

4.2. População de estudo..... 15

4.3. Critérios de elegibilidade..... 18

4.4. Critérios de exclusão..... 18

4.5. Vacinação..... 18

4.6. Alocação randomizada e "cega" das vacinas contra febre amarela..... 20

4.7. Recrutamento de participantes..... 22

4.8. Coleta de dados..... 23

4.9. Métodos laboratoriais..... 24

4.10. Acompanhamento pós-vacinação..... 25

4.11. Controle de qualidade dos dados..... 26
4.12. Plano de análise..... 27
4.13. Tamanho de amostra..... 29
4.14. Considerações sobre a eticidade do estudo..... 30

5. Resultados..... 32
5.1. Resposta imune ao componente rubéola da vacina triviral..... 35
5.2. Resposta imune à vacina contra febre amarela..... 40
5.3. Eventos adversos..... 44

6. Discussão..... 47

7. Considerações finais..... 52

8. Referências bibliográficas..... 53

9. Anexos..... 60
Anexo I: Processamento das amostras de soro e PRNT para febre amarela..... 60
Anexo II: ELISA para rubéola..... 62
Anexo III: Questionário pré-vacinal; questionário pós-vacinal; termo de consentimento livre e esclarecido..... 64
Anexo IV: Calendário básico de vacinação da criança..... 79

LISTA DE QUADROS

página

Quadro 1: Procedimentos da pesquisa por comparecimento do participante..... 17

Quadro 2: Formulação das vacinas contra febre amarela empregadas no estudo..... 19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição segundo grupo de comparação dos indivíduos excluídos da análise..... 32

Tabela 2: Distribuição de algumas características pré-randomização dos participantes segundo tipo de vacina e tempo entre vacinação contra febre amarela e tríplice viral (coorte completa)..... 35

Tabela 3: Situação sorológica para rubéola antes e após vacina combinada contra sarampo, rubéola e caxumba na coorte completa..... 36

Tabela 4: Proporção de soroconversão e média geométrica dos títulos (TMG) de anticorpos após a vacinação para rubéola – coorte completa e subgrupo que aderiu ao protocolo..... 37

Tabela 5: Variáveis relevantes do modelo logístico multivariado para soroconversão de rubéola..... 39

Tabela 6: Variáveis relevantes do modelo linear multivariado para log10 título pós-vacinal de rubéola..... 39

Tabela 7: Proporção de soroconversão e média geométrica dos títulos (TMG) de anticorpos após a vacinação para febre amarela – coorte completa e subgrupo que aderiu ao protocolo..... 41

Tabela 8: Variáveis relevantes do modelo logístico multivariado para soroconversão de febre amarela..... 43

Tabela 9: Variáveis relevantes do modelo linear multivariado para log10 título pós-vacinal de febre amarela..... 43

Tabela 10: Freqüência de eventos adversos segundo tempo entre as vacinas triviral e contra febre amarela..... 44

Tabela 11: Início dos sintomas segundo tempo entre as vacinas..... 45

Tabela 12: Duração dos sintomas segundo tempo entre as vacinas..... 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Áreas de risco para febre amarela silvestre – Brasil, 2003..... 7
Figura 2: Fluxograma do recrutamento e acompanhamento dos sujeitos na pesquisa... 16
Figura 3: Rótulo da vacina da vacina contra febre amarela usada no trabalho de campo..... 22
Figura 4: Fluxograma dos voluntários no estudo de avaliação da interferência da vacinação contra febre amarela na vacinação contra rubéola..... 33
Figura 5: Logaritmo dos títulos (log UI/mL) de anticorpos contra rubéola antes e após a vacinação..... 36
Figura 6: Distribuição cumulativa reversa do log 10 do título de anticorpos contra rubéola após a vacina tríplice viral segundo tipo de vacina contra febre amarela e intervalo entre as vacinas..... 38
Figura 7: Logaritmo dos títulos (recíproca da diluição) de anticorpos contra febre amarela antes e após a vacinação..... 40
Figura 8: Logaritmo dos títulos (mUI/mL) de anticorpos contra febre amarela antes e após a vacinação..... 40
Figura 9: Distribuição cumulativa reversa do log 10 do título de anticorpos para febre amarela após a vacinação, segundo tipo de vacina contra febre amarela e o intervalo entre as vacinas..... 42
Figura 10: Proporção de eventos adversos segundo intervalo entre as vacinas contra febre amarela e triviral..... 45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Cenepi – Centro Nacional de Epidemiologia

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DTP – difteria-toxóide tetânico-pertussis

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

FA – febre amarela

FA-TV – febre amarela-triviral

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Funasa – Fundação Nacional de Saúde

GSK – Glaxo SmithKline

HI – inibição de hemaglutinação

IC – intervalo de confiança

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LATEV – Laboratório de Vírus de Bio-Manguinhos

LI – limite inferior

LS – limite superior

MMR – measles-mumps-rubella vaccine

MSD – Merck, Sharp & Dohme

OD – densidade óptica

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *odds ratio* ou razão de chances

PACS – Programa de Agentes Comunitários de Saúde

PCFAD – Programa de Controle de Febre Amarela e Dengue

PNI – Programa Nacional de Imunizações

PRNT – Plaque Reduction Neutralization Test

PSF – Programa de Saúde da Família

SRC – Síndrome da Rubéola Congênita

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

$TCDI_{50}$ – *median tissue culture infective doses*

TMG – título médio geométrico

UI – Unidades Internacionais

VTV – vacina triviral

WHO – World Health Organization

Avaliação da interferência da vacinação contra febre amarela na vacinação contra rubéola

1. Introdução

1.1. Rubéola e Síndrome da Rubéola Congênita (SRC)

A rubéola é uma doença viral exantemática aguda que apresenta alta contagiosidade, atingindo preferencialmente crianças [1].

O agente etiológico pertence ao gênero *Rubivirus* da família *Togaviridae*. É transmitida de pessoa a pessoa através do contato com secreções nasofaríngeas de infectados. A transmissão indireta é baixa e ocorre através de contato com objetos contaminados por secreções nasofaríngeas infectadas [1].

A susceptibilidade é geral. A imunidade passiva ocorre pela transmissão de anticorpos maternos à criança, conferindo proteção durante 6 a 9 meses de vida. A imunidade ativa é através da infecção natural ou da vacinação [2].

A infecção pelo vírus da rubéola geralmente é branda e ocorre de forma subclínica. Os sintomas mais comuns são exantema maculopapular, febre baixa, adenopatia cervical posterior ou suboccipital e artralgia ou artrite. Estes sintomas podem ser confundidos com outras doenças exantemáticas, de forma que um diagnóstico definitivo só pode ser feito através de métodos laboratoriais específicos [3]. Artrite crônica também pode ser relatada após a infecção. Outras complicações menos comuns são trombocitopenia e encefalite, que pode ser fatal [2].

O período de incubação da rubéola é de 14-21 dias, com o surgimento do exantema em 14-17 dias após a exposição viral. A primeira semana pós-exposição é assintomática. Na segunda semana pode ser observada linfadenopatia, particularmente occipital e retroauricular e também surgem vírus no sangue. Culturas de vírus neste período revelam a presença de vírus na nasofaringe. Em seguida ocorre o período prodrômico, que consiste de febre baixa (<39°C), fadiga e conjuntivite branda. A linfadenopatia se apresentará neste período caso ainda não tenha se manifestado [2].

No fim do período de incubação, surge exantema maculopapular eritematoso na face e no pescoço. Durante o curso de 1 a 3 dias o exantema se espalha em direção

crânio-caudal e começa a diminuir. A excreção de vírus pode continuar por mais 1-2 semanas, mas a viremia termina com o surgimento do exantema [2].

A importância epidemiológica e clínica da rubéola se dá pela possibilidade de ocorrência da infecção congênita, decorrente da infecção materna e tendo em vista a ação teratogênica do vírus. Na infecção congênita pode haver a invasão do complexo placenta-feto pelo vírus, com disseminação pelos tecidos embrionários, podendo resultar no aborto espontâneo ou no nascimento a termo de crianças apresentando manifestações relacionadas à Síndrome da Rubéola Congênita (SRC) [4].

A ação teratogênica do vírus da rubéola sobre o organismo do feto se faz por meio de dois mecanismos: a infecção crônica, que pode se prolongar por vários meses após o nascimento, e a inibição da atividade mitótica das células embrionárias, afetando o crescimento e a diferenciação celular, podendo resultar na ausência completa de órgãos ou na formação defeituosa destes [5]. A infecção do feto durante o primeiro trimestre da gestação aumenta em 50% o risco de ocorrência de aborto espontâneo e causa um percentual ainda mais elevado de anomalias relacionadas com a SRC [6].

As manifestações da SRC podem ser transitórias - tais como hepato-esplenomegalia, hepatite, púrpura trombocitopênica, icterícia, anemia hemolítica, adenopatia, meningoencefalite, miocardite, osteopatia de ossos longos e exantema crônico - ou permanentes - entre elas catarata, glaucoma, microftalmia, surdez sensorial, anormalidades cardiovasculares, displasia da retina, coriorretinite, microcefalia, lesão cerebral e retardo mental [1] -, ou ainda manifestações tardias como é o caso da *diabetes mellitus* [4, 6].

1.2. Vacina contra rubéola

A vacina contra rubéola tem sido aplicada geralmente em combinação com as vacinas contra sarampo e caxumba – vacina tríplice viral - de vírus vivos atenuados, apresentada sob a forma liofilizada, em frasco-ampola com uma ou múltiplas doses [7].

Existem várias formulações da tríplice viral, com diferentes cepas para sarampo e para caxumba. A MMR II® (Merck Sharp & Dohme) contém a cepa Moraten para sarampo (1,000 *median tissue culture infective doses* [$TCID_{50}$]), Jeryl Lynn para caxumba (5,000 $TCID_{50}$), e a cepa RA27/3 para rubéola (1,000 $TCID_{50}$); a Pluserix® (GlaxoSmithKline) contém a cepa Schwarz para sarampo (1,000 $TCID_{50}$), cepa Jeryl Lynn-like para caxumba (20,000 $TCID_{50}$), e a cepa RA 27/3 para rubéola (1,000

$TCID_{50}$); a Trimovax® (Sanofi Pasteur) contém a cepa Schwarz para sarampo (1,000 $TCID_{50}$), a cepa Urabe para caxumba (20,000 $TCID_{50}$), e a cepa RA27/3 para rubéola (1,000 $TCID_{50}$); a Morupar® (Chiron) contém as mesmas cepas, mas a concentração do vírus para caxumba é aproximadamente 5,000 $TCID_{50}$. Também existe a combinação de sarampo e rubéola produzida pela Sanofi Pasteur. Outro grande produtor é o Serum Institute of India, que produz três diferentes formulações contendo rubéola: vacina somente contra rubéola (Wistar RA 27/3; 1,000 $TCID_{50}$), sarampo-rubéola (com a adição da cepa Edmonston Zagreb para sarampo; 1,000 $TCID_{50}$) e a triviral (Trestivac®, com a adição da cepa L-Zagreb para caxumba; 5,000 $TCID_{50}$) [2].

Em todo o mundo se usa a cepa RA 27/3 nas vacinas contra rubéola, com exceção do Japão, que usa a TO-336 [2].

A resposta imune induzida pela tríplice viral é similar à resposta imune pela vacina monovalente para rubéola. Weibel e colaboradores [8] verificaram respostas semelhantes em crianças que receberam a vacina tríplice viral formulada com a cepa RA27/3 e com a cepa RA27/3 isolada. A soroconversão para rubéola em formulações de triviral com diferentes combinações das cepas para sarampo e para caxumba fica entre 97% e 98% [9, 10].

Os eventos adversos mais comuns da vacina combinada contra sarampo, caxumba e rubéola são febre e erupção cutânea de curta duração, ocorrendo habitualmente entre o 5° e o 10º dia após a vacinação; artralgias e artrites, mais freqüentes nas mulheres adultas. A freqüência dos eventos varia de acordo com a cepa vacinal utilizada, particularmente em relação à vacina contra a caxumba [7].

É contra-indicada a aplicação da vacina triviral nos seguintes casos: antecedente de reação anafilática sistêmica após a ingestão de ovo de galinha; gravidez; administração de imunoglobulina humana normal (gamaglobulina), sangue total ou plasma nos três meses anteriores [7].

1.3. Vigilância Epidemiológica da Rubéola

A vigilância da rubéola e da síndrome da rubéola congênita no Brasil iniciou-se em 1996 quando a notificação de caso passou a ser compulsória [11, 12]. Sua efetividade variou de acordo com a localidade. Como parte importante para a eliminação regional do sarampo nas Américas em 2000, a vigilância da rubéola foi intensificada em 1999 e integrada à vigilância do sarampo [1]. Com a melhoria da vigilância da rubéola e da

síndrome da rubéola congênita (SRC), surtos entre adultos jovens foram notificados durante 1999-2000 [13]. Para prevenir a ocorrência de SRC, a campanha de vacinação contra rubéola direcionada a mulheres entre 12 a 30 anos de idade em todo o país foi conduzida em duas fases durante 2001-2002 [1].

A imunização em massa contra a rubéola no Brasil foi implantada gradualmente em unidades primárias de saúde nos Estados, entre 1992 e 2000, com campanhas direcionadas a crianças entre 1 e 11 anos de idade. Em 2000, todos os estados brasileiros haviam iniciado a rotina com o uso da vacina combinada de sarampo, caxumba e rubéola, com uma dose aos 15 meses de idade. Em 2003, a idade de vacinação foi alterada para 12 meses com uma dose de reforço aos 4 – 6 anos [1].

Uma das indicações da vacina é para controlar e eliminar a síndrome da rubéola congênita (SRC), ou seja, primariamente deve proteger a mulher em idade fértil, evitando que ela adquira a infecção durante a gravidez e a conseqüente transmissão ao concepto nas primeiras 12-16 semanas de gestação.

Para que tal meta possa ser alcançada, várias estratégias são utilizadas em saúde pública: emprego rotineiro e com ampla cobertura da vacina tríplice viral contra sarampo-caxumba-rubéola nas crianças de 15 meses de idade; campanhas de vacinação com a tríplice viral (sarampo-caxumba-rubéola) ou dupla viral (sarampo-rubéola), voltadas basicamente para o controle do sarampo e destinadas à população infantil entre 12 meses e com menos de 11 anos de idade; vacinação seletiva de adolescentes do sexo feminino e de todas as mulheres no pós-parto e pós-aborto imediatos. Nos dois primeiros casos, a vacina contra a rubéola acompanha programas voltados principalmente para o controle ou até erradicação do sarampo, mas obtém-se também proteção individual contra rubéola e diminuição da circulação do vírus, o que poderá ajudar a proteger da infecção as mulheres férteis. Para que essas duas estratégias ajudem no combate a SRC, é importante que as coberturas vacinais sejam altas e homogêneas, pois a diminuição de circulação do vírus selvagem da rubéola poderá levar a mudança da faixa etária de adoecimento das crianças para adultos jovens, com aumento do risco de rubéola congênita [7].

No caso da tríplice viral, a adoção desta vacina combinada aumenta a relação custo-benefício, uma vez que são aplicados simultaneamente três antígenos virais, além de facilitar o monitoramento da cobertura vacinal.

1.4. Febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa não-contagiosa que se mantém endêmica nas florestas tropicais da América e África e periodicamente causa surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto na saúde pública [14].

Sob o ponto de vista epidemiológico, divide-se a febre amarela em duas formas - silvestre e urbana - que diferem entre si quanto à espécie do vetor e dos hospedeiros vertebrados e quanto à localidade onde foi infectado. Enquanto no ciclo urbano a transmissão é direta homem-mosquito, no ciclo silvestre a transmissão envolve primatas não-humanos [15].

O agente etiológico é um vírus que pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, integrando o grupo dos arbovírus. O vírus é inoculado no homem pela picada de insetos hematófagos da família *Culicidae*. O *Aedes aegypti* é o vetor urbano, enquanto na África o gênero *Aedes* e na América os gêneros *Haemagogus e Sabethes* são os vetores silvestres [15].

A susceptibilidade é geral. Imunidade passiva é transmitida pela mãe ao recém-nato, porém não persiste além do primeiro ano de vida. Imunidade duradoura só ocorre após infecção natural ou pela vacinação dos indivíduos [12].

O espectro clínico da febre amarela pode variar desde uma doença subclínica a grave doença sistêmica, caracterizada por hepatite, falência renal, hemorragias e colapso cardiovascular. Em sua forma clássica, apresenta-se como febre hemorrágica de elevada letalidade [14, 16].

Estima-se que pelo menos 90% dos casos da febre amarela com expressão clínica sejam das formas classificadas como leve e oligossintomática - raramente diagnosticadas - e que somente 10% sejam das formas graves associadas com elevada letalidade. A infecção assintomática ocorre em 40-65% dos casos, enquanto as formas leves e moderadas de 20-30%, as formas graves de 10-20% e as formas malignas de 5-10% [15].

Após a inoculação pelo transmissor, o vírus atinge os linfonodos regionais e desaparece da circulação nas 24h seguintes. Nos linfonodos, o vírus infecta preferencialmente células linfóides e macrófagos, aí realizando o ciclo replicativo. O processo de viremia inicia-se com a liberação de partículas virais pelas células, carreadas dos vasos linfáticos até a corrente sanguínea. Pela via hemática, o vírus atinge

o fígado. Este período de viremia coincide com a febre e corresponde ao início do período prodrômico da doença [15].

Os sintomas das formas leves são febre baixa ou moderada de início súbito acompanhada ou não de cefaléia discreta, astenia ou indisposição passageira e tontura. Esse quadro evolui por até dois dias, com recuperação total do paciente [15].

Nas formas moderadas, o paciente apresenta febre e cefaléia, podendo ter também náuseas com ou sem vômitos, mialgias e artralgias. Ocorre epistaxe, ligeira albuminúria e subicterícia. Às vezes ocorre o sinal de Faget, que é a ocorrência de bradicardia acompanhando a febre elevada. A recuperação mostra-se completa e sem seqüelas [15].

Na forma grave o quadro clínico se inicia de forma abrupta com cefaléia intensa e febre elevada. O sinal de Faget é evidente e as dores musculares são generalizadas. As náuseas e os vômitos são freqüentes. Há icterícia franca e albuminúria persistente, acompanhada ou não de oligúria. Também podem ocorrer hemorragias, especialmente hematêmese e sangramento uterino. Ao menos um dos sintomas clássicos, tais como hematêmese, icterícia ou oligúria/anúria podem ser observados [15].

Na forma maligna os pacientes apresentam os três sintomas clássicos que caracterizam a falência hepato-renal. Inicialmente surge febre elevada e de início abrupto. Pouco tempo após o início da febre surge cefaléia holocraniana intensa, acompanhada de dores musculares generalizadas, náuseas e vômitos intensos. Esse quadro evolui por dois a três dias e corresponde ao período prodrômico, fase infecciosa ou de viremia da enfermidade; completa-se pela presença de astenia, anorexia, prostração e tontura [15].

Seguindo-se este período ocorre em muitos pacientes, além da remissão da febre, o que se caracteriza por sensação de melhora e cura iminente. Este período de remissão pode durar de algumas horas até 1-2 dias. Estes pacientes repentinamente apresentam piora do quadro [15].

Inicia-se então o período de intoxicação, toxêmico ou fase de localização, onde o vírus deixa de circular no sangue, sendo encontrado principalmente no fígado e baço, mas também no coração, linfonodos e outros órgãos. As náuseas e os vômitos se agravam, tornando-se hemorrágicos. Outras manifestações hemorrágicas ocorrem, tais como hemorragias do tegumento, das gengivas e do ouvido. No trato gastro-intestinal observa-se melena. Acompanhando ou antecedendo a hemorragia há plaquetopenia. No quadro também ocorre icterícia e insuficiência renal [15].

A maioria dos pacientes falece entre o sétimo e o décimo dia de doença devido à falência hepato-renal ou devido a hemorragias não-controladas. Os sobreviventes se recuperam lentamente, mas de forma completa e sem seqüelas. Durante a fase convalescente a astenia, a indisposição e as dores musculares persistem por mais de duas semanas [15].

A letalidade global da febre amarela varia de 5% a 10%, percentual elevado quando comparado à de outras viroses inclusive o dengue; entre os casos graves que evoluem com síndromes ictero-hemorrágica e hepato-renal, a letalidade pode chegar a 50% [15].

Os indivíduos acometidos geralmente são jovens do sexo masculino que realizam atividades agropecuárias e de extração de madeira, bem como ecoturistas que entram nas matas sem vacinação prévia [17].

No Brasil admitem-se três áreas epidemiológicas: área endêmica, área de transição – também conhecida como epizoótica - e área indene.

Figura 1: Áreas de risco para febre amarela silvestre – Brasil, 2003.

A área enzoótica ou endêmica corresponde à área onde o vírus amarílico circula entre os hospedeiros naturais, principalmente macacos, marsupiais e outros, há a presença de vetores silvestres e o homem é infectado de forma acidental. Abrange os estados das regiões Centro-Oeste e Norte e a parte pré-amazônica do Maranhão, área correspondente a mais de 2/3 do território nacional [18].

A área epizoótica ou de transição corresponde à área onde no início do século passado havia intensa circulação do vírus amarílico entre os hospedeiros naturais. No entanto, com o crescente processo de desmatamento, acredita-se que o nicho ecológico tenha sido alterado e nos últimos 30 anos a circulação viral foi evidenciada de forma esporádica no Estado de Minas Gerais. Abrange uma faixa na área noroeste de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, oeste de Santa Catarina e noroeste do Rio Grande do Sul e também as partes ocidentais do Piauí e da Bahia, no Nordeste [18].

A área indene corresponde à área onde não há circulação do vírus amarílico. Abrange os estados das regiões Nordeste, Sudeste e Sul. Corresponde à costa brasileira, indo desde o Piauí até o Rio Grande do Sul [18].

É preocupante o potencial de epidemias urbanas de febre amarela na América Latina, em virtude do aumento da infestação de *Aedes aegypti*, do aumento da entrada de pessoas em áreas florestais e da baixa cobertura vacinal nas áreas indenes [19, 20].

Em zonas urbanas, o combate aos vetores e o uso de medidas de proteção individual são recomendadas para prevenir a ocorrência da doença. Como o combate aos vetores silvestres é inviável, deve-se investir no combate ao vetor urbano *Aedes aegypti*. Devido à complexidade dessas áreas - com elevada concentração populacional e aumento da pobreza, além de problemas com o lixo urbano - torna-se difícil viabilizar a curto e médio prazo a eliminação ou o controle efetivo do *Aedes aegypti* em todo o continente americano. Medidas de proteção individuais como o uso de repelentes e de mosquiteiros carece de importância em saúde pública [15].

A vacinação dos indivíduos susceptíveis é a alternativa mais eficaz para a redução do número de casos da doença e controle de surtos, já que interrompe o ciclo de transmissão [18].

1.5. Vacina contra febre amarela

As vacinas contra febre amarela recomendadas atualmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) são produzidas com as subcepas 17D e 17DD, consideradas seguras e imunogênicas [16, 21]. Essas subcepas apresentam pequenas diferenças na seqüência de nucleotídeos [22].

Como a passagem contínua seqüencial pode provocar mudanças na imunogenicidade da subcepa viral usada na produção da vacina, desde 1940 criou-se o sistema de lote-semente, a fim de se evitar alterações indesejadas nas propriedades biológicas da vacina; esse sistema consiste na preparação de um grande lote de vírus que é aliquotado e estocado para suprir a produção das vacinas [16].

A vacina contra febre amarela é constituída de vírus vivos atenuados, apresentada sob a forma liofilizada em frasco de múltiplas doses, acompanhada de diluente (solução salina apirogênica) [7].

A vacina contra febre amarela é considerada segura e os sinais e sintomas mais freqüentemente atribuídos à vacinação são inespecíficos - cefaléia, febre baixa, mialgia e fraqueza muscular -, levando à interrupção das atividades normais em menos de 0,5% dos vacinados. Essas reações ocorrem 5 a 7 dias após a vacinação e são, na maioria das vezes, brandas e com evolução favorável espontânea [16, 23].

Reações de hipersensibilidade são extremamente raras, ocorrendo em indivíduos com história de alergia a ovo. Sinais de envolvimento neurológico - como irritabilidade, convulsões, paralisia facial etc. - têm sido reportados na literatura, embora raramente, e têm acometido mais freqüentemente lactentes com menos de 6 meses de idade [24].

Tem como contra-indicação a aplicação em indivíduos com história de hipersensibilidade a ovos de galinha e seus derivados, idade inferior a 6 meses, gestação (exceto em situações de emergência epidemiológica), doença infecciosa aguda em estado febril acima de 38,5ºC e estados de imunodepressão [7].

Entre os fatores que podem afetar a resposta imunológica da vacina 17D incluem: imunidade pré-existente a antígenos relacionados, proteção cruzada contra flaviviroses, como o dengue; imunossupressão devido a tratamentos medicamentosos ou a doenças; desnutrição severa; gravidez [25].

No Brasil, o Programa Nacional de Imunizações recomenda a vacinação contra febre amarela no calendário básico em zonas endêmicas e epizoóticas e para viajantes que se dirijam a estas regiões [7].

1.6. Programa de Controle de Febre Amarela e Dengue

A vigilância epidemiológica da febre amarela é um dos componentes do Programa de Controle de Febre Amarela e Dengue (PCFAD), cujo objetivo é manter erradicada a febre amarela urbana e evitar surtos de febre amarela silvestre [26].

A febre amarela é uma doença de notificação compulsória internacional, objeto de vigilância pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional. Os objetivos da vigilância da febre amarela são: manter em zero a incidência de febre amarela urbana; reduzir a incidência de febre amarela silvestre; detectar precoce e oportunamente a circulação viral; conhecer o estado imunológico para estimar a população sob risco de adoecer; conhecer o comportamento epidemiológico da febre amarela [18].

Em 2001, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), à época, Cenepi/Funasa, implementou o Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle da Febre Amarela com o objetivo de reduzir a incidência da forma silvestre e impedir a ocorrência da forma urbana, erradicada desde 1942. A febre amarela do tipo silvestre não pode ser erradicada, já que o vírus circula naturalmente nas matas entre os macacos e vetores silvestres - mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* - que transmitem a doença para seres humanos depois de picar os macacos contaminados.

Especial atenção é dada pelo Plano ao fortalecimento da vigilância epidemiológica da doença nos estados e municípios do País. Para isso, profissionais da área de saúde foram capacitados em todos os estados, tanto em vigilância específica da febre amarela como no manejo de primatas não-humanos (macacos), o que possibilitou a implantação da vigilância de epizootias (morte de macacos). Em geral, epizootias causadas por febre amarela antecedem a ocorrência de casos humanos, e a atenção dos profissionais de saúde para esses eventos pode evitar surtos e epidemias. A SVS também aumentou a capacidade para diagnóstico da febre amarela em 19 laboratórios da rede pública nacional [26].

Outro ponto em que se baseiam as ações da SVS para o controle e prevenção da doença é a vacinação (Ministério da Saúde, 2000). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que sejam vacinadas todas as pessoas hígidas, com mais de seis meses de idade, que residam nas áreas de risco ou que se dirijam a elas. Uma única dose da vacina protege o individuo por pelo menos 10 anos, quando então é recomendada a

nova vacinação. Estudos sorológicos em comunidades vacinadas uma única vez, e vivendo fora da área de risco, demonstraram índices neutralizantes por várias décadas; esse achado sugere que uma única vacinação confere imunidade de longa duração, talvez definitiva [23, 25].

No Brasil, a vacinação está indicada a partir dos nove meses de idade para todos os residentes das áreas de risco - endêmica, transição e risco potencial - e para viajantes que se dirigem para estas. A vacina é gratuita e está disponível em postos de saúde de todos os municípios do País [26].

A cobertura vacinal varia de acordo com a área, sendo acima de 80% nas áreas endêmicas e de transição e baixa na área indene. Excetuando-se algumas localidades dos estados de São Paulo e Paraná, que adotaram programas de vacinação sistemática de toda a população, é provável que no máximo 20% da população na área de transição seja vacinada; em números, teríamos cerca de 7 a 8 milhões de pessoas não-vacinadas em áreas endêmicas e epizoóticas, principalmente nas capitais, e 70 a 100 milhões na área indene [15].

A meta de vacinação é atingir 100% da população em todos os municípios das regiões endêmicas, de transição e de risco potencial para a doença. Além das salas de vacinação distribuídas por todo o território brasileiro, a vacina também é dada de casa em casa aos moradores de zonas rurais, postos são montados em escolas e existe uma mobilização social feita em conjunto com o Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) e o da Saúde da Família (PSF). Outras estratégias relacionadas com a vacinação incluem o monitoramento rápido da cobertura nos municípios, avaliação sistemática dos eventos adversos da vacina e atividades de sensibilização para vacinação de adultos e de populações vulneráveis, como bóias-frias, pessoas assentadas ou que moram em acampamentos dos sem-terra, caminhoneiros e população indígena [26].

2. Justificativa

Na vacinação combinada dois ou mais agentes são administrados numa mesma preparação, enquanto na vacinação simultânea, duas ou mais vacinas são administradas em diferentes locais ou por diferentes vias num mesmo atendimento [27].

A administração de várias vacinas num mesmo atendimento permite imunizar contra o maior número possível de doenças em reduzido número de contatos da pessoa com o serviço de saúde. As aplicações simultâneas são recomendadas desde que não aumentem a freqüência e a gravidade dos efeitos adversos e não reduzam o poder imunogênico que cada componente possui quando administrado isoladamente.

A vacina contra rubéola, monovalente ou na forma combinada (vacina triviral) pode ser administrada simultaneamente com a vacina DTP (difteria - toxóide tetânico - pertussis), vacina contra *Haemophilus influenzae*, vacina inativada contra poliovírus, vacina contra hepatite B, vacina oral contra poliovírus [28], e vacina contra varicela [29].

Já a vacina contra febre amarela tem sido aplicada simultaneamente ou combinada com as vacinas contra sarampo [30-35], hepatite A [36], hepatite B [37-39], febre tifóide [40, 41] e poliomielite [42], sem interferências na imunização ou na segurança das vacinas.

O desempenho da vacina nos lactentes no estudo multicêntrico [43] contrariou os achados de estudos anteriores com vacinas das subcepas 17DD [35] e 17D [31, 32], em que a proteção de lactentes vacinados simultaneamente contra sarampo e febre amarela não foi afetada.

A aplicação simultânea da vacina anti-variólica não produziu resultados favoráveis quando a vacina contra febre amarela foi aplicada com técnicas de escarificação ou punções múltiplas [24].

Quando aplicada simultaneamente ou combinada com a vacina contra varicela, apresentou alta imunogenicidade, embora estudos de campo posteriores tenham apresentado soroconversão abaixo de 70% [24].

Não há estudos avaliando a interferência da vacinação da febre amarela pelos componentes rubéola e caxumba da vacina triviral.

Como é conhecido, existe a possibilidade de interferência na imunogenicidade de vacinas de vírus vivos atenuados quando aplicadas simultaneamente devido à produção de interferon após a vacinação, já que este pode inibir a replicação do outro

vírus vacinal [44, 45]. Pode ocorrer redução da resposta imune para uma das vacinas mesmo quando os antígenos são aplicados em sítios diferentes na mesma visita [27].

A vacina triviral já foi amplamente estudada e não há evidências de interferência entre seus componentes virais [8, 46, 47].

No Distrito Federal as vacinas triviral e contra febre amarela já vêm sendo aplicadas simultaneamente aos 12 meses de idade desde 1996. A possibilidade de interferência na resposta à vacina contra febre amarela por três antígenos virais atenuados, embora biologicamente plausível, nunca foi verificada.

Mesmo nas áreas em que a vacina contra febre amarela é recomendada aos 9 meses de idade (Anexo IV), crianças com esquema de vacinação em atraso podem receber esta vacina simultaneamente à vacina triviral (sarampo, rubéola e caxumba), de modo a não perder a oportunidade de imunização.

Desta forma, é da maior relevância para as recomendações do calendário básico de imunizações (Anexo IV) analisar a interferência da vacinação contra febre amarela na vacinação contra rubéola. Se forem confirmados níveis de soronegatividade pós-vacinais da ordem de 20% ou se apresentarem títulos de anticorpos mais baixos em crianças vacinadas simultaneamente com estas vacinas, as recomendações atuais de vacinação deverão ser revistas.

Embora a vacina contra rubéola no PNI esteja restrita à apresentação combinada com as vacinas contra sarampo e contra caxumba, as questões sobre a interferência da vacinação contra febre amarela são menos conhecidas para rubéola e caxumba.

Responder a essa questão pode ter maior relevância para rubéola pelo impacto que essa informação pode representar para o programa brasileiro de controle da rubéola/síndrome da rubéola congênita e a proposta de erradicação da SRC nas Américas em 2010, reorientando as ações de prevenção. Desta forma, se considera que o aprofundamento desta análise deva ser objeto do trabalho específico ora proposto.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a interferência na resposta imune à vacina contra febre amarela e à vacina contra rubéola combinada às vacinas contra sarampo e contra caxumba.

3.2. Objetivos específicos

Estimar e comparar a proporção de soroconversão para rubéola e para febre amarela em indivíduos vacinados concomitantemente com uma vacina combinada contra sarampo, caxumba e rubéola e contra febre amarela e em indivíduos cuja vacinação contra febre amarela ocorreu trinta dias após a vacinação contra rubéola.

Estimar e comparar as médias geométricas dos títulos de anticorpos para rubéola e para febre amarela nos dois grupos citados acima.

Estimar e comparar as freqüências de eventos adversos apresentados nos dois grupos do primeiro item.

4. Sujeitos e métodos

4.1. Delineamento geral do estudo

Este estudo é parte de um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, para comparar a imunogenicidade e a reatogenicidade da vacina contra febre amarela da subcepa 17DD (produto comercial, licenciado) e da vacina da subcepa WHO 17D-213/77 (produto experimental manufaturado a partir de lote-semente da Organização Mundial da Saúde) produzidas em Bio-Manguinhos, FIOCRUZ (Figura 2).

Foram também comparadas a imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas de febre amarela aplicadas simultaneamente ou 30 dias ou mais depois da aplicação da vacina tríplice viral (sarampo, rubéola e caxumba).

O estudo envolveu crianças dos 12 aos 23 meses de idade, elegíveis para vacinação contra febre amarela, sarampo, rubéola e caxumba segundo os critérios do

Programa Nacional de Imunizações (PNI), e que compareceram para vacinação em centros de saúde da rede pública do Distrito Federal.

Os responsáveis pelas crianças foram convidados a participar permitindo que a criança recebesse a vacina contra febre amarela segundo esquema definido pelo estudo, e que fosse submetida a exames de sangue. Dos responsáveis pelas crianças participantes foi também solicitado que respondessem a questionários da pesquisa antes e 30 dias depois da vacinação (Quadro 1).

Às crianças cujos testes sorológicos não evidenciaram anticorpos contra febre amarela após 30 dias de vacinação (soronegativas), foi recomendada a revacinação e solicitado novo exame de sangue após 15 dias de forma a determinar o tipo de resposta – primária ou anamnéstica – à vacinação.

Para este estudo específico foram analisados apenas os dados referentes à vacinação contra febre amarela e contra rubéola.

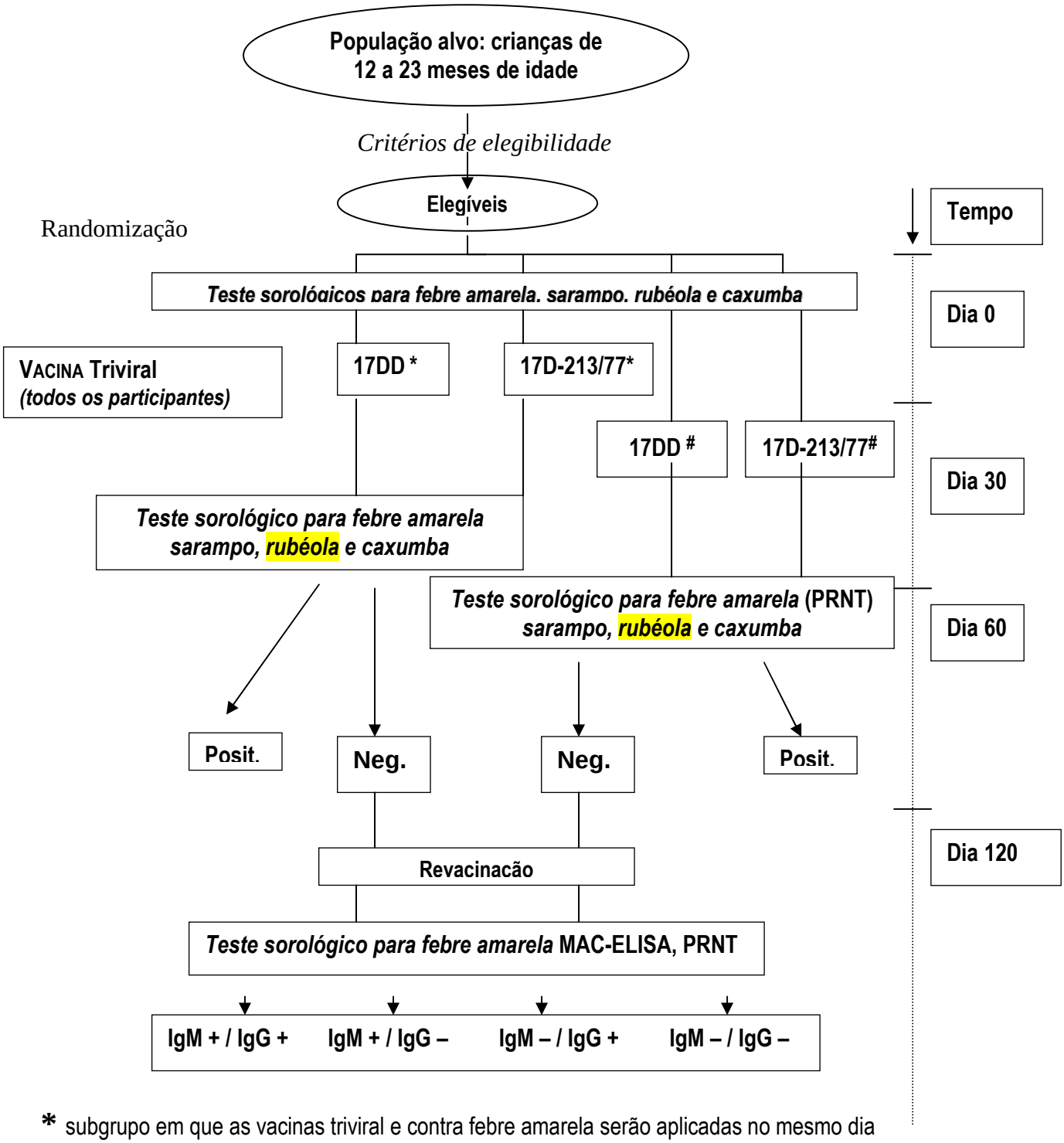
4.2. População de estudo

O estudo envolveu crianças dos 12 aos 23 meses de idade, elegíveis para vacinação contra febre amarela, sarampo, rubéola e caxumba segundo os critérios do Programa Nacional de Imunizações, e que compareceram para vacinação em centros de saúde da rede pública do Distrito Federal. Como a cobertura vacinal nesta faixa etária é muito alta, seria improvável captar crianças com idade igual ou superior a 24 meses ainda suscetíveis à rubéola e à febre amarela.

Foram convidados a participar do estudo indivíduos sem história de vacinação contra febre amarela e que não apresentassem contra-indicações para a vacina. Considerou-se que nessa população a documentação da história de vacinação era confiável para permitir que o recrutamento fosse feito antes que os dados sorológicos pré-vacinais estivessem disponíveis.

Os responsáveis pelas crianças foram convidados a autorizar a participação no estudo após serem informados dos seus objetivos e métodos por auxiliares de pesquisa treinados e por um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Figura 2: Fluxograma do recrutamento e acompanhamento dos sujeitos na pesquisa.



* subgrupo em que as vacinas triviral e contra febre amarela serão aplicadas no mesmo dia

subgrupo em que a vacina contra febre amarela será aplicada 30 dias após a triviral

Quadro 1: Procedimentos da pesquisa por comparecimento do participante.

Dia do estudo	Atividade	
Dia 0 Recrutamento	Apresentação dos objetivos da pesquisa; Obtenção de um termo de consentimento livre e esclarecido; Alocação randômica; Coleta de sangue para exames pré-vacinais; Entrevista com questionário sobre a saúde da criança.	
	Subgrupo com vacinação simultânea	**Subgrupo com 30 dias de intervalo entre vacinas**
	Aplicação das vacinas triviral e contra febre amarela	Aplicação da vacina triviral somente
Entre os dias 0 e 10 depois da vacinação	Preenchimento diário das fichas de controle de eventos adversos pelos participantes.	Preenchimento diário das fichas de controle de eventos adversos pelos participantes.
Entre os dias 10 e 30 depois da vacinação	Entrega das fichas de controle de eventos adversos preenchidas pelos participantes.	Entrega das fichas de controle de eventos adversos preenchidas pelos participantes.
Dia 30	Coleta de sangue para exames (anticorpos contra febre amarela; sarampo, caxumba, rubéola); entrevista final.	Entrevista. Vacinação contra febre amarela
Após dia 60		Coleta de sangue para sorologia (anticorpos contra febre amarela; sarampo, caxumba, rubéola); entrevista final.
Após dia 120	Entrega dos resultados dos exames de sangue e oferta de re-vacinação para quem não ficou protegido	Entrega dos resultados dos exames de sangue e oferta de re-vacinação para quem não ficou protegido

4.3. Critérios de elegibilidade

Idade de 12 a 23 meses;

Ausência de problemas de saúde que contra-indiquem a vacinação contra febre amarela, sarampo, rubéola ou caxumba na rotina;

Disponibilidade para coleta de amostras de sangue 30 e/ou 60 dias após-vacinação;

Sem viagens programadas para fora do Distrito Federal durante os primeiros 45 dias do estudo;

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos pais ou responsáveis.

4.4. Critérios de exclusão

Antecedentes de vacinação contra febre amarela, sarampo, rubéola ou caxumba verificados em cartão de vacinação;

Desnutrição moderada ou grave;

Imunodepressão transitória ou permanente, induzida por doenças (neoplasias, AIDS etc.) ou pelo tratamento (drogas imunossupressoras, radioterapia etc.). O uso de corticosteróides (p.ex., prednisona, dexametasona) por menos de 2 semanas ou uso tópico ou por inalação destas substâncias não indicam exclusão do estudo, mas deverão ser registrados no questionário;

História de hipersensibilidade a ovo de galinha e seus derivados;

Administração de outra vacina experimental nos últimos 60 dias ou planejada para os 60 dias subseqüentes às vacinas deste estudo;

Doenças crônicas ou agudas graves.

4.5. Vacinação

As vacinas contra febre amarela usadas no estudo foram a vacina 17DD - produzida por Bio-Manguinhos e que já é utilizada em campanhas e na rotina de vacinação na rede pública de serviços de saúde em regiões endêmicas – e a vacina OMS 17D-213/77 (Quadro 2), produzida em lote experimental por Bio-Manguinhos com autorização da ANVISA apenas para o uso na pesquisa.

As vacinas contra febre amarela utilizadas no estudo foram preparadas a partir da cepa de vírus atenuados, cultivados em embriões de galinha, livres de agentes

patogênicos SPF (Specific Pathogenic Free), de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde. A vacina utilizada atualmente na rotina é produzida a partir do Lote Semente Secundário 102 (passagem n° 287) da subcepa 17DD produzido em 2001 e utilizado na produção de todos os lotes de vacina desde 2002. A vacina produzida a partir do lote semente oriundo da semente da OMS (17D - 213/77) foi produzida em lote experimental apenas para uso na pesquisa.

Quadro 2: Formulação das vacinas contra febre amarela empregadas no estudo.

*Composição por dose de vacina (0,5 ml)	
Vírus 17D Febre Amarela	1.000 DL_{50} **
Sacarose	0,8mg
Glutamato de Sódio	4,05mg
Sorbitol	8,5mg
Gelatina bovina hidrolisada	5,0mg
Eritromicina	3,0mcg
Kanamicina	10,0mcg

*Vírus cultivado em embriões em desenvolvimento de ovos de galinha S.P.F.(Specific Pathogenic Free); ** Dose letal em camundongo

A vacina contra rubéola empregada foi a tríplice viral, vacina de rotina preconizada pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI). Não houve alteração na rotina de vacinação triviral, apenas o registro de sua aplicação. Outras vacinas do calendário de imunizações foram aplicadas seguindo as recomendações do PNI.

Resumidamente, os procedimentos de vacinação contra febre amarela incluíram:

1. Reconstituição da vacina liofilizada em frascos com 5 doses com diluente em frasco-ampola de 2,5 mL que acompanha a vacina. Vacina e diluente estavam entre 2º e 8ºC, ao abrigo da luz, e assim foram mantidos após a diluição. Depois de 4 horas de diluição as vacinas não utilizadas foram desprezadas;
2. Aplicação de dose única de 0,5mL por via subcutânea na região deltóide (braço esquerdo).

A aplicação da vacina triviral foi na região deltóide (braço direito); dose de 0,5mL por via subcutânea. Em algumas crianças, as vacinas foram administradas na região do vasto lateral, também no lado direito para a triviral e no lado esquerdo para a vacina contra febre amarela.

Os vacinadores foram selecionados pela experiência em sala de vacina. Durante o trabalho de campo, o processo de vacinação foi supervisionado por enfermeiro da unidade de vacinação. Os diários das salas de vacinação foram examinados regularmente durante o período de vacinação para eventuais intervenções no caso de detecção de problemas. Incidentes e desvios de protocolo foram registrados nos seus detalhes e comunicados aos coordenadores.

Foram observados os cuidados com a conservação e manuseio das vacinas segundo as recomendações do PNI, tais como condições de estocagem apropriadas e preparação da vacina para aplicação.

4.6. Alocação randomizada e "cega" das vacinas contra febre amarela

A randomização é o processo no qual cada participante tem a mesma chance de ser alocado nos diferentes grupos de comparação. Tende a produzir grupos comparáveis em relação a fatores de risco conhecidos ou não, remover viés de seleção na alocação dos participantes e garantir que os testes estatísticos tenham níveis de significância válidos [48].

Foram conduzidos dois processos de independentes de randomização: um para formar os grupos de comparação segundo o tempo de aplicação das vacinas contra febre amarela e triviral e outro para designar qual o tipo de vacina contra febre amarela a ser administrado.

A alocação para o grupo de comparação – receber a vacina contra febre amarela no mesmo dia da vacina triviral ou receber a vacina contra febre amarela 30 dias após a vacina triviral - foi feita no dia do recrutamento, após a assinatura do termo de consentimento pelo responsável.

No momento da administração da vacina foi aberto pelo auxiliar de pesquisa um envelope opaco, lacrado, numerado externamente com a seqüência de números naturais. No interior do envelope uma etiqueta indicava o grupo de comparação para o qual o participante foi sorteado. Para a abertura dos envelopes foi seguida a ordem de apresentação para vacinação e obedecida a seqüência numérica pré-determinada. Seguindo a orientação do conteúdo do envelope, o auxiliar de pesquisa informou ao vacinador se a criança iria receber a vacina contra febre amarela no mesmo dia da vacina tríplice viral. Não foi permitida em nenhuma hipótese a alteração do tipo de

vacina para o qual o participante foi designado através dos envelopes individualizados. O grupo para o qual a criança foi alocada foi registrado no questionário e no cartão de identificação do participante da pesquisa através de etiqueta auto-adesiva.

A alocação para o tipo de vacina contra febre amarela foi feita no dia do recrutamento e no 30º dia, quando um dos grupos retornou para receber esta vacina.

Para diminuir o risco de viés, o "cegamento" quanto ao tipo de vacina contra febre amarela foi feito através da codificação dos rótulos dos frascos. Este procedimento consistiu em manter tanto o participante como a equipe de campo sem o conhecimento do grupo de intervenção – tipo de vacina contra febre amarela - para o qual o indivíduo foi alocado [48].

As vacinas foram envasadas em frascos idênticos rotulados com números distribuídos aleatoriamente por um estatístico e revelados apenas ao responsável pela modificação da rotina de envasamento. A distribuição dos participantes pelos tipos de vacina, foi randomizada por blocos de tamanho definido pelo estatístico e não revelado à equipe, na razão de 1:1. Ao se apresentar para a vacinação contra febre amarela cada participante foi designado para receber vacina de um frasco com o código de uma seqüência predeterminada de forma aleatória e gerada em computador.

A vantagem da randomização por blocos é que o balanço entre o número de participantes em cada grupo é garantido durante o processo de randomização. Isso pode ser bastante útil, já que o perfil dos participantes pode se modificar ao longo do período de recrutamento, de forma que os blocos tendem a produzir grupos mais comparáveis. Além disso, caso o estudo tenha que ser finalizado antes do planejado existirá o balanço em relação ao número de participantes randomizados em cada grupo [48].

As enfermeiras aplicaram a vacina do frasco que tinha o menor número disponível no momento em que o participante se apresentou para vacinação. Uma etiqueta adesiva com o mesmo número do frasco da vacina foi afixada no questionário do participante. Cada frasco de vacina foi utilizado em apenas um participante, desprezando-se as demais doses.

As listas das "chaves" dos códigos foram lacradas e mantidas alcançáveis nos locais de vacinação com um responsável designado para consultá-la apenas em caso de solicitação médica por evento adverso importante. Os códigos foram abertos somente após conclusão das análises estatísticas.

Figura 3: Rótulo da vacina da vacina contra febre amarela usada no trabalho de campo.

Somente após os critérios de elegibilidade, realização da entrevista e coleta de sangue é que foi feita a alocação randômica dos indivíduos para um dos grupos de comparação. A randomização marcou formalmente a entrada do indivíduo no estudo e o grupo para o qual foi alocado não pôde ser alterado sob nenhuma hipótese.

4.7. Recrutamento de participantes

O estudo foi realizado em unidades de saúde em que as vacinas contra febre amarela e triviral estavam incorporadas à rotina. As unidades foram selecionadas pelo número esperado de indivíduos elegíveis e pelas condições de infra-estrutura e recursos humanos que favorecessem a realização dos procedimentos previstos no protocolo.

Os responsáveis pelos indivíduos elegíveis para vacinação foram convidados a participar do estudo após serem informados dos seus objetivos e métodos por auxiliares de pesquisa treinados e por um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver Considerações Éticas e Anexo III).

Os voluntários que assinaram o Termo de Consentimento receberam um cartão de identificação no estudo em que constava seu nome, número de identificação no estudo, número da vacina aplicada, as datas de aplicação das vacinas do estudo e da coleta de sangue pré-vacinal, e as datas agendadas para coletas de sangue pós-vacinal e outras observações pertinentes. O cartão de identificação continha os números dos telefones dos membros da equipe que poderiam esclarecer dúvidas sobre o estudo e, quando necessário para o atendimento, revelar ao médico atendente o tipo de vacina aplicada. Os responsáveis pelas crianças incluídas no estudo foram instruídos para levar o cartão

de identificação e o termo de consentimento caso procurassem atendimento médico para problemas de saúde que ocorressem após a vacinação.

4.8. Coleta de dados

Aos pais ou responsáveis pelas crianças que concordaram em participar do estudo foi aplicado um questionário (Anexo III) com duas seções: (1) Pré-vacinal, contendo dados gerais de identificação (nomes completos do participante e da mãe); data do nascimento; local de nascimento; endereço completo e telefone; antecedentes vacinais e data da última dose; e (2) pós-vacinal, aplicado no 30º dia depois da vacinação, para registro dos medicamentos recebidos durante a participação no estudo, eventos adversos e outras intercorrências clínicas, incluindo uso de outras vacinas, e viagens realizadas após a aplicação da vacina deste estudo; ou (3) pós-vacinal do 60º dia para o grupo que recebeu a vacina contra febre amarela 30 dias depois da vacina triviral. Na seção pré-vacinal deste instrumento de coleta de dados foram registradas também data e hora da aplicação da vacina contra febre amarela e triviral - quando for o caso -, data da coleta de sangue pós-vacinal e os números de identificação das amostras de soro pré e pós-vacinal.

Dos que se recusaram ou desistiram de participar, foram registrados a idade, sexo, problemas de saúde, antecedentes de vacinação contra febre amarela e o motivo da recusa. Este procedimento visa ter informações para analisar posteriormente se as perdas ocorridas foram diferenciais ou não, ou seja, se os indivíduos que não concluíram o acompanhamento são diferentes dos indivíduos que permaneceram no estudo.

Após a entrevista, o participante foi encaminhado para coleta de 4 mL de sangue por venopunção de veia do antebraço para dosagem de anticorpos contra febre amarela e rubéola. Uma segunda amostra de sangue foi coletada no 30º dia pós-vacinação triviral para dosagem dos mesmos anticorpos. Uma terceira amostra de sangue foi coletada no 60º dia pós-vacinação triviral no grupo que recebeu a vacina contra febre amarela 30 dias depois da vacina triviral.

Exames clínicos e laboratoriais adicionais realizados para avaliação e acompanhamento de problemas de saúde ou anormalidades que o participante tenha apresentado no decorrer do estudo foram registrados no questionário do indivíduo.

Também foram registrados os nomes comerciais e números de lotes da vacina triviral que estavam sendo utilizadas no centro de saúde no momento da pesquisa.

4.9. Métodos laboratoriais

As amostras de sangue foram submetidas a processamento preliminar no mesmo dia da coleta, de modo a separar as alíquotas de soro para os testes de neutralização por redução em placa de lise (PRNT, Anexo I), e o teste ELISA (Anexo II) para rubéola.

O teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi usado para determinação qualitativa e quantitativa de anticorpos IgG humanos contra o vírus da rubéola. Este procedimento emprega antígeno imobilizado que reage com a amostra de anticorpo. O próximo passo requer uma lavagem e uma reação subseqüente com o anticorpo específico enzima-marcada para a imunoglobulina das espécies a serem ensaiadas (conjugado anti-IgG). A parte enzimática do conjugado transforma a solução cromógena que, após o bloqueio da reação, tem a intensidade da cor lida por fotometria. Esta medida é proporcional a atividade de anticorpos IgG específicos contidos na amostra [49]. A quantificação em unidades internacionais (IU/mL) é calculada pelo método α. Foi usado o *Enzygnost® Anti-Rubella–Vírus/IgG* (Dade Behring, Alemanha).

O teste de neutralização por redução em placa de lise (*Plaque Reduction Neutralization Test*, PRNT) mede o nível de anticorpos neutralizantes em uma amostra de soro. A partir de uma quantidade conhecida de vírus, determina-se a habilidade de diluições do soro de um indivíduo bloquear a produção de plaques virais em células *Vero*. Como qualquer ensaio biológico, o PRNT é inerentemente variável e, portanto, de difícil padronização. Como desvantagens, o método exige muito tempo para execução, além de não ser automatizado [50].

O PRNT é considerado o teste mais sensível e mais específico para febre amarela [51, 52] produzindo resultados quantitativos (em Unidades Internacionais) que se correlacionam com proteção. O único laboratório no Brasil com experiência na realização deste teste está na FIOCRUZ. Os testes sorológicos para sarampo, caxumba e rubéola foram realizados no Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz.

Para infecção natural, coletas precoces resultam em menor sensibilidade. Para resposta à vacinação, 30 dias é considerado um intervalo ótimo para detecção de todos os respondendores. Portanto, espera-se que nas condições em que foi aplicado os erros dos testes sejam pequenos, com predominância de falsos positivos.

As crianças em que as vacinas contra febre amarela e triviral tenham sido aplicadas com intervalo de 30 dias tiveram coleta de sangue para sorologia de febre amarela realizada no 30º e no 60º dias pós-vacinação, enquanto a coleta de sangue para sorologia de sarampo, caxumba e rubéola foi feita no dia da vacinação triviral e no 30º dia pós-vacinação. As amostras foram identificadas com etiquetas auto-adesivas contendo números que não permitiam ao laboratório identificar se a amostra era pré ou pós-vacinal. Outra etiqueta com o mesmo número foi afixada no questionário do participante.

O processamento inicial do sangue até a separação do soro (ver Anexo I) foi realizado no laboratório local. As alíquotas de soro em frascos etiquetados com códigos numéricos foram enviadas ao Laboratório de Vírus de Bio-Manguinhos (LATEV/FIOCRUZ) para realização do PRNT e para o Laboratório de Doenças Exantemáticas do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz para a realização do ELISA. As condições de conservação para envio obedeceram às especificações do LATEV.

4.10. Acompanhamento pós-vacinação

O registro de eventos adversos pós-imunização foi baseado na noção de que qualquer problema de saúde, sinal, sintoma ou alteração de exame complementar, que surja ou que se agrave após a administração da vacina, independente da relação conhecida ou aparente com a vacinação, deverá ser registrado e investigado [53]. Problemas de saúde ocorridos nos 10 dias subseqüentes à vacinação foram registrados diariamente pelos participantes da pesquisa em formulário próprio. Eventos adversos normalmente associados à vacinação – tais como dor, induração ou inchação, eritema e hematoma no local da aplicação da vacina e gânglios satélites; e febre (temperatura axilar maior ou igual a 37,5ºC), astenia, cefaléia, mialgia, artralgia, e sintomas gastrointestinais (náusea, vômito, dor abdominal e diarréia) – estavam especificados no formulário, a fim de facilitar o registro.

Quando da coleta de sangue no 30° e no 60° dias após a vacinação foi aplicado um questionário por um entrevistador. O objetivo era registrar sinais e sintomas no período não coberto pelas fichas de controle diário, assim como o registro do uso de medicamentos e outras vacinas. Dessa forma pretendia-se obter informações que pudessem diferenciar ocorrências temporalmente associadas à vacinação – que incluem

as reações vacinais propriamente ditas – de problemas de saúde coincidentes com o período pós-vacinal. Este último grupo poderia incluir condições clínicas com potencial de alterar a resposta à vacinação como, por exemplo, o uso de corticosteróides, de fármacos e de outras substâncias hepatotóxicas.

As datas para a coleta de sangue pós-vacinal foram agendadas no cartão de identificação do estudo. Os faltosos foram contactados por aerograma, telefone, ou visitas domiciliares. Aos indivíduos que desistiram e que puderam ser contactados foi perguntado e registrado o motivo da desistência.

Às crianças cujo teste sorológico não evidenciou anticorpos contra febre amarela, sarampo, caxumba e rubéola após 30 dias de vacinação foi recomendada a revacinação. Novo exame de sangue foi solicitado após 15 dias de forma a determinar o tipo de resposta – primária ou anamnéstica – à vacinação contra febre amarela.

A entrega dos resultados dos exames sorológicos, a avaliação final do desfecho de eventos adversos pós-imunização ou a (re)vacinação dos indivíduos que não apresentaram soropositividade para febre amarela (o que ocorreu por último) encerraram formalmente a participação dos indivíduos nesta etapa do estudo.

Ao final do estudo foi perguntado a cada responsável se ele sabia qual o tipo de vacina administrado na criança. Este esquema pretendia avaliar uma eventual quebra do "cegamento" e suas repercussões nos resultados.

4.11. Controle de qualidade dos dados

Houve revisão do preenchimento dos questionários quando da sua entrega, de forma que se esclarecessem quaisquer dúvidas quanto à legibilidade, a completitude e a aderência ao protocolo de pesquisa. O controle de qualidade dos questionários era responsabilidade de toda a equipe, mas foi uma atribuição específica dos entrevistadores e dos coordenadores locais.

Após a digitação dos dados dos questionários e dos resultados dos testes laboratoriais, foi feita verificação lógica do banco para detectar inconsistências.

4.12. Plano de análise

As variáveis de interesse são:

1. código da vacina administrada
2. data das vacinas
3. título de anticorpos contra febre amarela, antes e depois da vacinação
4. título de anticorpos contra rubéola, antes e depois da vacinação
5. razão do título de anticorpos pós e pré-vacinais
6. soroconversão
7. tempo decorrido entre vacinação e coletas de amostras de sangue pós-vacinal (derivado das datas de coleta)
8. idade do participante (derivada da data do nascimento)
9. problemas de saúde e outras intercorrências (incluindo outras vacinas e medicamentos) no período pós-vacinal
10. tempo decorrido entre a vacinação e o início do sinal/sintoma
11. duração do sinal/sintoma
12. gravidade definida por interrupção das atividades de trabalho e lazer, busca de atendimento médico, uso de medicação, internação hospitalar, bem como pela evolução clínica e o desfecho.

Soropositividade para febre amarela foi definida como título de anticorpos em relação aos níveis pré-vacinais em mIU/mL, obtidos através do uso de um soro referência calibrado por um soro referência internacional. Os títulos expressos pelas recíprocas das diluições também foram analisados após transformação logarítmica (base 10). Indivíduos com títulos iguais ou maiores que 2,8 log10 mUI/mL [54] ou 1,5 log10 da recíproca da diluição foram considerados soropositivos. A viragem sorológica foi definida como soropositividade em indivíduos não-reatores à sorologia pré-vacinal. Em indivíduos soropositivos antes da vacinação, a soroconversão foi definida como quadruplicação dos títulos de anticorpos pré-vacinais.

Soropositividade para rubéola foi definida como densidade óptica (OD) maior que 0,200, o que corresponde a títulos de anticorpos maiores que 0,8 log10. A soronegatividade foi atribuída a OD<0,100 (0,6 log10). Nas amostras que apresentaram resultados entre estes valores (0,100≤OD≤0,200) foi feito o reteste. Persistindo os mesmos resultados após o reteste, o indivíduo foi classificado como "inconclusivo". A soroconversão foi definida como soropositividade em indivíduos não reatores à sorologia pré-vacinal.

A proporção de viragem sorológica, de soroconversão, os títulos médios geométricos e a freqüência de eventos adversos foram calculados e intervalos de 95% de confiança foram construídos para as estimativas. Para determinação de títulos médios geométricos, indivíduos com títulos de anticorpos abaixo do valor de base do teste sorológico receberam o valor arbitrário correspondente à metade do valor de base.

Os grupos de intervenção foram comparados quanto à distribuição das características demográficas e outras características de base, de modo a verificar o sucesso da randomização.

As curvas de distribuição (histogramas) dos títulos de anticorpos pré e pós-vacinais para cada tipo de vacina foram construídas e comparadas. Curvas de distribuição cumulativa reversa dos logaritmos dos títulos de anticorpos foram construídas para comparar a imunogenicidade das duas vacinas em toda a amplitude de valores dos títulos e testadas quanto à significância estatística pelo teste não-paramétrico log-rank.

A proporção de soroconversão nos grupos de vacinados foi comparada e testada quanto à significância estatística através do teste do χ^2 (Qui-quadrado). As médias dos logaritmos (base 10) dos títulos de anticorpos foram comparadas utilizando-se o teste t de Student.

A interação das vacinas contra febre amarela e rubéola foi aferida através da comparação das taxas de soroconversão/viragem sorológica para rubéola em subgrupos definidos pelas datas de administração das duas vacinas (vacinação simultânea ou com intervalo superior a 30 dias). A proporção de soropositivos para rubéola e para febre amarela foi comparada naqueles subgrupos.

Como a randomização já distribuiu de forma equilibrada entre os grupos de comparação a maior parte das variáveis de confusão, neste desenho de estudo a modelagem tem por objetivo controlar possíveis variáveis de confusão residuais.

A probabilidade de soroconversão/viragem sorológica das vacinas comparadas foi ajustada para diferenças nos grupos em relação às covariáveis de interesse, em modelo de regressão logística. As covariáveis de interesse são: idade, sexo, soropositividade pré-vacinal e intercorrências clínicas. Analogamente, o logaritmo (base 10) do título de anticorpos pós-vacinais foi modelado estatisticamente por regressão múltipla para as variáveis tipo de vacina, sexo, idade, título de anticorpos pré-vacinais e intercorrências clínicas.

A análise dos efeitos adversos foi por intenção de tratamento, ou seja, foi considerada a coorte completa dos indivíduos para os quais se tenha dados de reatogenicidade, mesmo que tenha ocorrido quebra de protocolo.

A análise de imunogenicidade incluiu todos os indivíduos randomizados que tinham exames sorológicos pós-vacinais. Uma análise à parte considerou apenas os indivíduos que aderiram ao protocolo do estudo.

A freqüência, tempo de início e duração dos eventos adversos foi tabulada por tipo de evento e por grupo de alocação. A freqüência da ocorrência de cada um dos eventos nos grupos de comparação foi representada em gráfico de barras.

Os bancos de dados em formato DBF foram analisados no programa R versão 2.4.1 [55].

4.13. Tamanho de amostra

O número de participantes em cada grupo de comparação, por faixa de idade, para alcançar poder estatístico de 80% (Z_β = 0,84), com nível de significância de 95% (Z_α = 1,96), teste bicaudal, proporção de soroconversão de 90% em um dos grupos, diferença mínima relevante entre os grupos de 5 pontos percentuais, foi definido baseado na fórmula [56]:

$$n = \frac{\left[Z_\alpha \sqrt{2\overline{p}(1-\overline{p})} + Z_\beta \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}\right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

O tamanho de amostra projetado com 20% de correção para perdas foi de 1740 crianças (870 crianças em cada grupo de comparação).

Os critérios de seleção das unidades de saúde que participaram do estudo incluíram número de indivíduos elegíveis; instalações (salas de vacina, espaço para

coleta de sangue e para entrevistas) com capacidade de acomodar a equipe de trabalho de campo, sem grandes inconvenientes para a rotina da unidade; e interesse e disponibilidade dos funcionários em colaborar no estudo.

Esta amostra foi não-probabilística, devido tanto ao processo de seleção das unidades de saúde exposto acima, quanto ao caráter voluntário da participação dos indivíduos na pesquisa. Embora sem representatividade estatística, o grupo de estudo assim formado não pareceu apresentar peculiaridades capazes de afetar a validade interna do estudo. Considerando-se que todos os indivíduos elegíveis tinham potencial imunológico para responder à vacinação, não se anteciparam limitações importantes à validade externa do estudo.

4.14. Considerações sobre a eticidade do estudo

As questões pendentes sobre a vacinação contra febre amarela em crianças precisam ser respondidas por estudos científicos que apóiem as decisões do Programa Nacional de Imunizações. Os estudos de delineamento experimental são considerados os mais adequados para produzir a evidência empírica válida de eficácia e efetividade de fármacos, vacinas e outras intervenções em saúde.

O protocolo do "Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com duas vacinas contra febre amarela das subcepas 17DD e 17D-213/77 e vacina tríplice viral" - do qual este estudo faz parte - , foi elaborado em conformidade com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Secretaria de Saúde do Distrito Federal e pelo CEP da FIOCRUZ. Este projeto maior está registrado no SISNEP (Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos - um sistema de informações via internet - http://dtr2002.saude.gov.br/sisnep - sobre pesquisas envolvendo seres humanos, que dá acesso ao público em geral aos projetos aprovados pelos CEPs participantes).

A pesquisa foi realizada em região em que a vacina contra febre amarela já integra o calendário básico de imunizações a partir dos 12 meses de idade. O grupo de crianças alocadas para receber a vacina contra febre amarela 30 dias após a vacina triviral recebeu orientação por escrito quanto à necessidade de evitar viagens para outras zonas endêmicas de febre amarela até que fossem decorridos 10 dias da vacinação contra febre amarela. Para estas crianças, o adiamento da vacinação contra febre amarela por 30 dias

implicou em estender o período em que estariam suscetíveis à doença. Considerando-se que o risco de infecção por febre amarela nesta faixa etária, particularmente no Distrito Federal, é muito pequeno, o adiamento por 30 dias da vacinação parece aceitável nas condições controladas do estudo. A alternativa do adiamento da vacina triviral implicaria em maior risco, já que a conjuntura atual de baixíssima incidência pode se alterar abruptamente. Além disso, trata-se de três vacinas contra doenças de propagação inter-humana, com alta infecciosidade e com histórico de acometimento de crianças. Em outras conjunturas epidemiológicas essa combinação teria que ser avaliada e possivelmente ajustada, de forma a não expor a criança ao risco de infecção.

A eficácia e segurança da vacina WHO-17D-213/77 produzida em Bio-Manguinhos já foi demonstrada em estudo anterior em adultos aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ [23, 54]. Em crianças, o perfil de reatogenicidade das vacinas da cepa 17D é bem conhecido em todo o mundo e faz da vacina contra febre amarela uma das mais seguras em uso atualmente [16]. A vacina tríplice viral tem alta imunogenicidade [57, 58]. A reatogenicidade da triviral é apenas um pouco maior do que quando os componentes são administrados individualmente e a soroconversão é similar à dos componentes isolados [8, 46, 59].

Não eram esperados eventos adversos graves da aplicação da vacina, mas quaisquer sinais e sintomas que ocorreram após a aplicação da vacina tiveram um pronto atendimento no local de vacinação e/ou foram encaminhados para atendimento médico pela equipe do estudo.

Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III) redigido em linguagem simples foi lido em voz alta para o participante, ou lido pelo participante com a assistência do auxiliar de pesquisa.

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

Dos auxiliares técnicos que manusearam seringas e agulhas foi exigido o cumprimento das normas de biossegurança explicitadas no manual de operações.

5. Resultados

No período de 6 de fevereiro de 2006 a 4 de julho de 2006, 1943 crianças foram recrutadas em unidades de saúde do Distrito Federal e randomizadas segundo grupos de vacinação contra febre amarela simultânea ou após 30 dias da vacina triviral.

Os registros dos voluntários de uma das unidades apresentavam incongruências nos números de identificação das amostras de soro e foram todos desconsiderados na análise dos dados (n=115). Isto resultou em perda de cerca de 6% dos indivíduos da amostra. Estes voluntários tinham distribuição equilibrada por tipo de vacina contra febre amarela e intervalo de aplicação entre a vacina triviral e a vacina contra febre amarela (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição segundo grupo de comparação dos indivíduos excluídos da análise

	simultânea	**30 dias**	**total**
17D	28	30	58
17DD	36	21	57
total	64	51	115

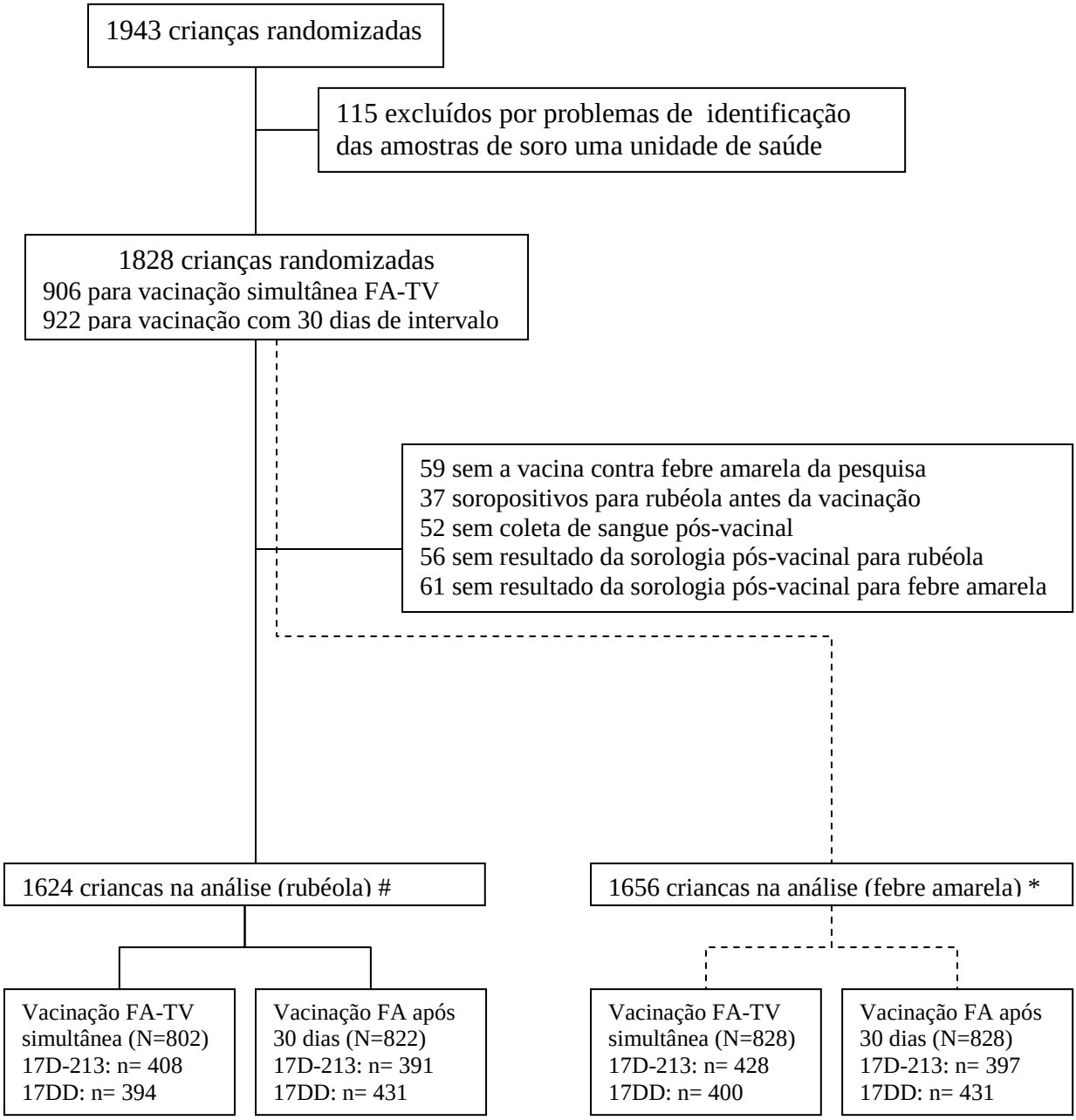
Do total de 1828 crianças, 59 indivíduos não receberam vacina contra febre amarela da pesquisa (não retornaram após 1 mês ou desistiram da participação após a primeira randomização); 52 não fizeram a coleta de sangue após a vacinação (não retornaram após 1 mês); 56 estavam sem resultado da sorologia após a vacinação contra rubéola e 61 não possuíam resultado da sorologia pós-vacinal para febre amarela (material insuficiente, extravio de espécimes etc.). A perda total foi de 11,2% dos voluntários em ambos os grupos de intervenção.

Todos os participantes que não coletaram sangue após a vacinação estavam alocados para receber a vacina contra febre amarela 30 dias após a tríplice viral, assim como nenhum participante vacinado contra febre amarela ficou sem coleta de sangue pré-vacinal.

A fim de se evitar perda desnecessária de informação, na análise pelo protocolo foram feitas as exclusões por tipo de vacina (contra febre amarela e contra rubéola), já que estas análises são independentes.

Sendo assim, na análise “por intenção de tratamento” (coorte completa), utilizamos para fins dos cálculos 1828 indivíduos e na análise pelo protocolo 1624 indivíduos para rubéola e 1656 indivíduos para febre amarela (Figura 4).

Figura 4: Fluxograma dos voluntários no estudo de avaliação da interferência da vacinação contra febre amarela na vacinação contra rubéola.



excluídos apenas as variáveis de interesse para rubéola
* excluídos apenas as variáveis de interesse para febre amarela

A distribuição proporcional dos 1828 indivíduos foi equilibrada pelos tipos de vacina (subcepas) e pelos intervalos na aplicação das vacinas contra febre amarela e triviral (Tabela 2).

A idade das crianças variou de 10 a 23 meses, com mediana de 12 meses. A inclusão de crianças menores de 12 meses pode ter ocorrido por erro de registro na ficha do participante, por erro na digitação dos dados, ou de fato, não se observou este critério quando houve a seleção da criança, resultando em quebra do protocolo.

O peso ao nascer variou de 810g a 5040g, com mediana de 3190g. O peso ao vacinar variou de 6215g a 15600g, com mediana de 9500g. Houve pequeno predomínio do sexo masculino. Estas características - assim como o sexo - tinham distribuição equilibrada tanto pelos grupos definidos pelo intervalo de aplicação das vacinas como também pelo tipo de vacina contra febre amarela utilizada (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição de algumas características pré-randomização dos participantes segundo tipo de vacina e tempo entre vacinação contra febre amarela e tríplice viral (coorte completa).

variável	vacina	tempo entre as vacinas: simultânea		tempo entre as vacinas: 30 dias		total	
indivíduos, n (%)	não vacinados	23	1,3	36	2,0	59	3,2
	17D-213	451	24,7	429	23,5	880	48,1
	17DD	432	23,6	457	25,0	889	48,6
	total	906	49,6	922	50,4	1828	100,0
sexo masculino, n (%)	não vacinados	14	0,8	15	0,8	29	1,6
	17D-213	244	13,3	247	13,5	491	26,9
	17DD	243	13,3	240	13,1	483	26,4
	total	501	27,4	502	27,5	1003	54,9
sexo feminino, n (%)	não vacinados	9	0,5	21	1,1	30	1,6
	17D-213	207	11,3	182	10,0	389	21,3
	17DD	189	10,3	217	11,9	406	22,2
	total	405	22,2	420	23,0	825	45,1
idade (meses), média (DP)	não vacinados	12,3	0,9	12,1	0,9	12,2	0,9
	17D-213	12,2	0,9	12,2	0,8	12,2	0,9
	17DD	12,2	1,1	12,2	0,9	12,2	1,0
	total	12,2	1,0	12,2	0,9	12,2	0,9
peso ao nascer (gramas), média (DP)	não vacinados	3189	548	3269	546	3238	543
	17D-213	3192	471	3177	499	3185	484
	17DD	3193	499	3177	492	3185	495
	total	3192	486	3192	497	3186	491
peso ao vacinar (gramas), média (DP)	não vacinados	9926	1135	9496	1307	9651	1252
	17D-213	9540	1203	9715	1234	9627	1221
	17DD	9632	1217	9580	1247	9605	1232
	total	9593	1209	9640	1244	9617	1226
soropositividade para rubéola, n (%)	não vacinados	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	17D-213	10	0,5	12	0,7	22	1,2
	17DD	9	0,5	6	0,3	15	0,8
	total	19	1,0	18	1,0	37	2,0
soropositividade para febre amarela, n (%)	não vacinados	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	17D-213	39	2,1	34	1,9	73	4,0
	17DD	35	1,9	33	1,8	68	3,7
	total	74	4,0	67	3,7	141	7,7

5.1. Resposta imune ao componente rubéola da vacina triviral

Na coorte completa ("análise por intenção de tratamento"), a soropositividade antes da vacinação foi 2,0% (Tabela 2).

Os 18 indivíduos com resultado inconclusivo após a vacinação (Tabela 3) estavam concentrados no grupo que foi vacinado simultaneamente, o que correspondeu a 1% da

amostra. A soronegatividade após a vacinação (Tabela 3) foi 6,9% nas crianças vacinadas simultaneamente e 2,5% nas crianças vacinadas com 30 dias de intervalo. A soropositividade pós-vacinal da coorte completa foi 87,9%.

Os títulos de anticorpos contra rubéola (Figura 5) mostram distribuição com clara distinção dos títulos no mesmo grupo de crianças antes e após a vacinação. A região entre 0,6 log10 e 0,8 log 10 corresponde aos títulos considerados inconclusivos.

Figura 5: Logaritmo dos títulos (log UI/mL) de anticorpos contra rubéola nas crianças antes e após a vacinação.

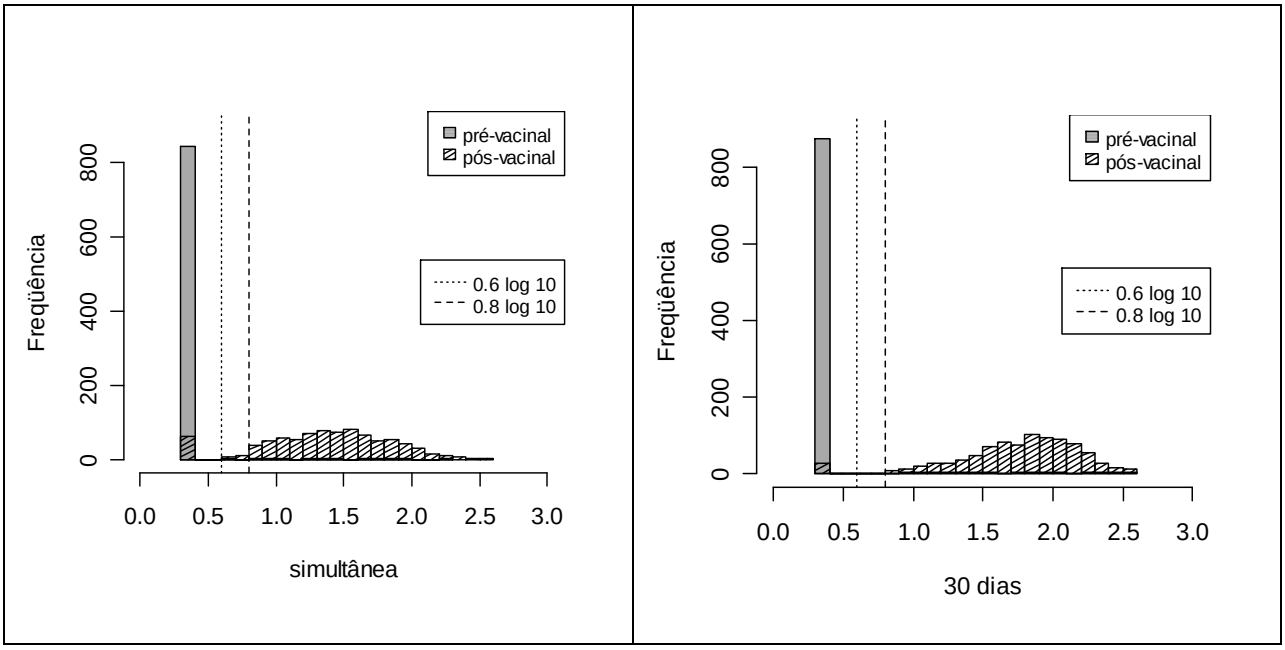


Tabela 3: Situação sorológica para rubéola antes e após vacina combinada contra sarampo, rubéola e caxumba, segundo intervalo da vacinação contra febre amarela, na coorte completa.

Tempo entre vacinas		Pós-vacinal									
		não-vacinado		inconclusivo		não reativo		reativo		total	
	Pré-vacinal	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Simultânea	não vacinado	24	54,5	1	2,3	0	0,0	19	43,2	44	100,0
	inconclusivo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	1	100,0
	não reativo	37	4,4	17	2,0	58	6,9	730	86,7	842	100,0
	reativo	0	0,0	0	0,0	2	10,5	17	89,5	19	100,0
	total	61	6,7	18	2,0	60	6,6	767	84,7	906	100,0
30 dias	não vacinado	9	32,1	0	0,0	2	7,1	17	60,7	28	100,0
	inconclusivo	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	não reativo	49	5,6	0	0,0	22	2,5	804	91,9	875	100,0
	reativo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	19	100,0	19	100,0
	total	58	6,3	0	0,0	24	2,6	840	91,1	922	100,0

A diferença na proporção de soroconversão de 5,2 pontos percentuais maior no grupo vacinado com intervalo de 30 dias (91,9%, I.C.95%: 89,9 – 93,6) em relação ao grupo vacinado simultaneamente (86,7%, I.C.95%: 84,2 – 88,9) foi estatisticamente significativa.

No entanto, a diferença na proporção de soroconversão no grupo que recebeu a vacina 17DD (91,0%, I.C.95%: 88,8 – 92,8), em relação ao grupo que recebeu a vacina 17D-213 (90,5%, I.C.95%: 88,3 – 92,4) foi pequena e sem significância estatística.

O título médio geométrico (TMG) de anticorpos para a rubéola foi 2,5 vezes maior no grupo com 30 dias ou mais de intervalo entre as vacinas e a diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 4). A diferença no TMG entre as subcepas vacinais contra febre amarela nesse grupo foi pequena, porém com significância estatística: 60,1 UI/mL (I.C.95%: 59,1 – 61,2) para 17D-213 e 56,5 UI/mL (I.C.95%: 55,4 – 57,6) para 17DD.

Tabela 4: Proporção de soroconversão e média geométrica dos títulos (TMG) de anticorpos após a vacinação para rubéola – coorte completa e subgrupo que aderiu ao protocolo.

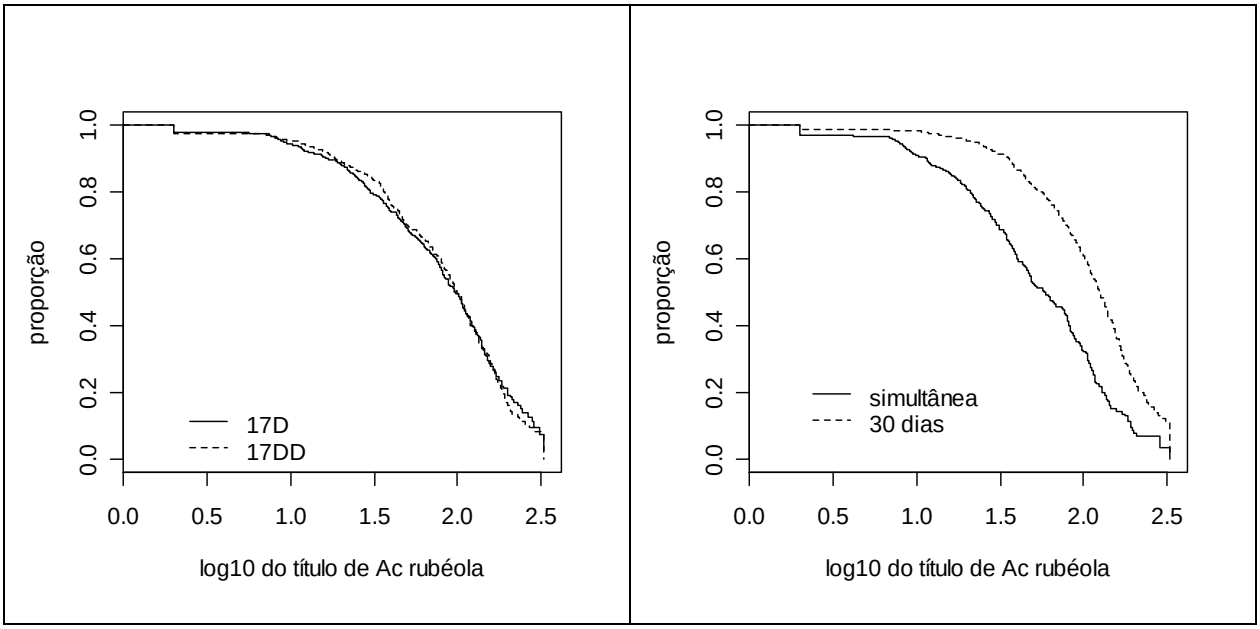
			tempo entre as vacinas			
			simultânea		30 dias	
Soroconversão, % (I.C.95%)	coorte completa	não vacinados	-	-	7,4	0,9 - 24,3
		17D-213	86,3	82,7 - 89,4	94,8	92,2 - 96,8
		17DD	87,3	83,7 - 90,4	94,3	91,7 - 96,3
		total	86,7	84,2 - 88,9	91,9	89,9 - 93,6
	protocolo	17D-213	90,7	87,4 - 93,3	98,2	96,4 - 99,3
		17DD	90,6	87,3 - 93,3	96,5	94,3 - 98,0
		total	90,6	88,4 - 92,6	97,3	92,8 - 95,1
TMG (UI/mL), (I.C.95%)	coorte completa	não vacinados	-	-	32,7	31,1 - 34,2
		17D-213	23,0	21,9 - 24,1	60,1	59,1 - 61,2
		17DD	24,2	23,1 - 24,1	56,5	55,4 - 57,6
		total	23,6	22,5 - 24,7	58,1	57,0 - 59,1
	protocolo	17D-213	22,5	21,4 - 23,6	59,6	58,5 - 60,6
		17DD	24,1	23,0 - 25,2	56,7	55,6 - 57,8
		total	23,3	22,2 - 24,3	58,1	57,0 - 59,1

Na análise pelo protocolo a soroconversão total foi 94,0%. A proporção de soroconversão foi maior no grupo vacinado com intervalo de 30 dias (97,3%, I.C.95%: 92,8 – 95,1) do que no grupo vacinado simultaneamente (90,6%, I.C.95%: 88,4 – 92,6) e a diferença teve significância estatística.

Em relação às subcepas contra febre amarela, a diferença foi pequena e sem significância estatística (p= 0,788) - 94,4% para a vacina 17D-213 (I.C.95%: 92,5 – 95,9) e 93,7% para a vacina 17DD (I.C.95%: 91,8 – 95,3).

O título médio geométrico (TMG) de anticorpos para a rubéola foi igual ao da coorte completa (58,1 UI/mL) no grupo vacinado com 30 dias de intervalo (Tabela 4). Neste grupo também se observou diferença estatisticamente significativa no TMG entre as subcepas vacinais contra febre amarela: 59,6 UI/mL (I.C.95%: 58,5 – 60,6) para 17D-213 e 56,7 UI/mL (I.C.95%: 55,6 – 57,8) para 17DD.

Figura 6: Distribuição cumulativa reversa do log 10 do título de anticorpos contra rubéola após a vacina tríplice viral segundo tipo de vacina contra febre amarela e intervalo entre as vacinas.



As diferenças na distribuição dos títulos de anticorpos pós-vacinais de rubéola segundo a subcepa vacinal de febre amarela são pequenas e sem significância estatística (χ^2 = 0,1, p = 0,757). Em contraste, houve diferença substancial e estatisticamente significativa (χ^2= 146, p <0,001) na distribuição dos títulos segundo intervalo entre as vacinas triviral e contra febre amarela (Figura 6).

Tabela 5: Variáveis relevantes do modelo logístico multivariado para soroconversão de rubéola.

variável	OR bruto	IC bruto		OR ajustado	IC ajustado	
intervalo entre as vacinas (30 dias/simultânea)	1,74	1,27	2,38	1,73	1,04	2,89
intervalo entre coleta e VTV*	1,02	1,01	1,03	1,01	1,00	1,02

* vacina tríplice viral

O modelo logístico para soroconversão (Tabela 5) teve como variável explicativa o intervalo entre as vacinas (p=0,0359) e o intervalo entre a coleta de sangue e a vacina triviral (p=0,0569). O modelo linear multivariado incluiu também a interação entre estas variáveis - indicando que a diferença nas médias dos logaritmos dos títulos era menor

nos intervalos maiores entre vacinação e coleta de sangue (Tabela 6). A variável "tipo de vacina contra febre amarela" não apresentou significância estatística (p= 0,754).

Tabela 6: Variáveis relevantes do modelo linear multivariado para log10 título pós-vacinal de rubéola.

Variável	β bruto	IC bruto		β ajustado	IC ajustado	
		LI	LS		LI	LS
Intercepto	1,57	1,55	1,59	0,98	0,89	1,08
Sexo (feminino – masculino)	0,08	0,04	0,13	0,08	0,04	0,12
intervalo entre as vacinas (30 dias - simultânea)	0,39	0,35	0,43	0,71	0,58	0,84
intervalo entre coleta e VTV*	0,0064	0,0056	0,0073	0,0069	0,0053	0,0085
interação do intervalo entre as vacinas e o intervalo entre coleta e VTV*	-	-	-	-0,0075	-0,0096	-0,0054

* vacina tríplice viral

5.2. Resposta imune à vacina contra febre amarela

Na coorte completa, a soropositividade antes da vacinação foi 7,7% (Tabela 2) e a soroconversão foi 79,0%. A soronegatividade pós-vacinal foi 20,9%, sendo 16,0% quando as vacinas foram aplicadas simultaneamente e 4,9% quando houve intervalo entre as vacinas.

Os títulos de anticorpos contra febre amarela nas crianças apresentam superposição na distribuição antes e após a vacinação quando são expressas em recíprocas das diluições (Figura 7) e em miliunidades internacionais (Figura 8). Comparada à vacinação simultânea, quando o intervalo foi de 30 dias ou mais entre as vacinas, a distribuição dos títulos pós-vacinais se apresenta deslocada para a direita (títulos mais altos), com menor superposição da distribuição dos títulos nas crianças antes e após a vacinação.

Figura 7: Logaritmo dos títulos (recíproca da diluição) de anticorpos contra febre amarela nas crianças antes e após a vacinação.

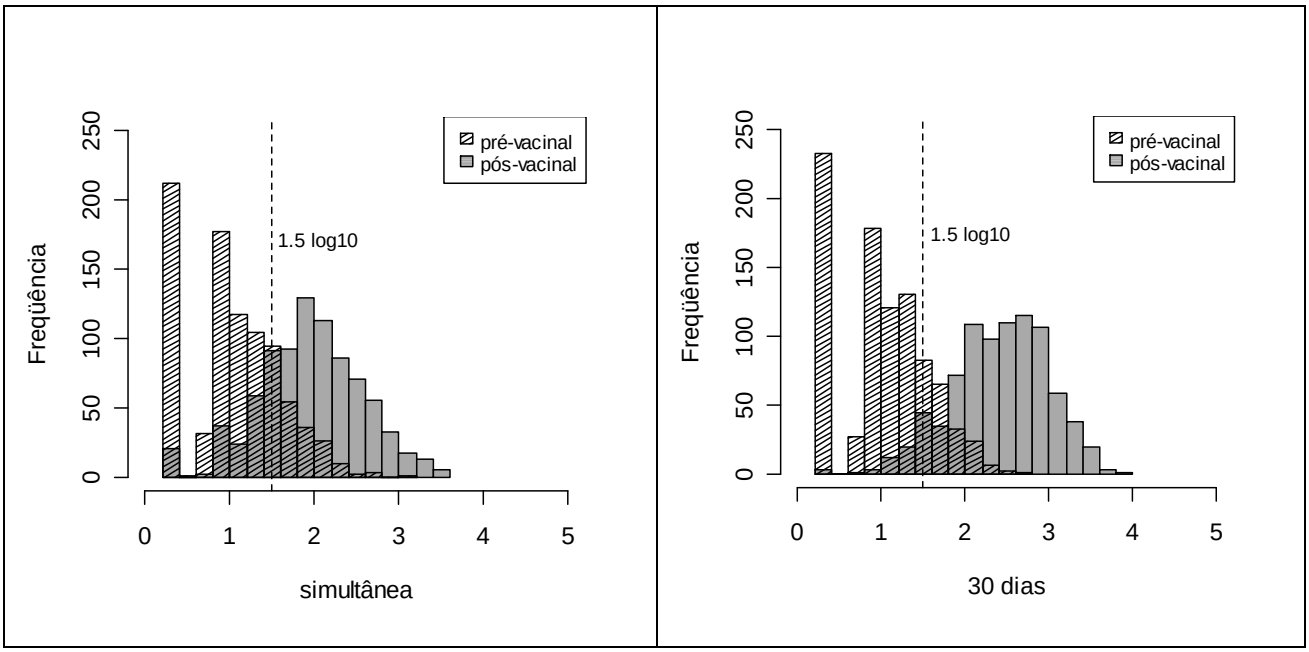
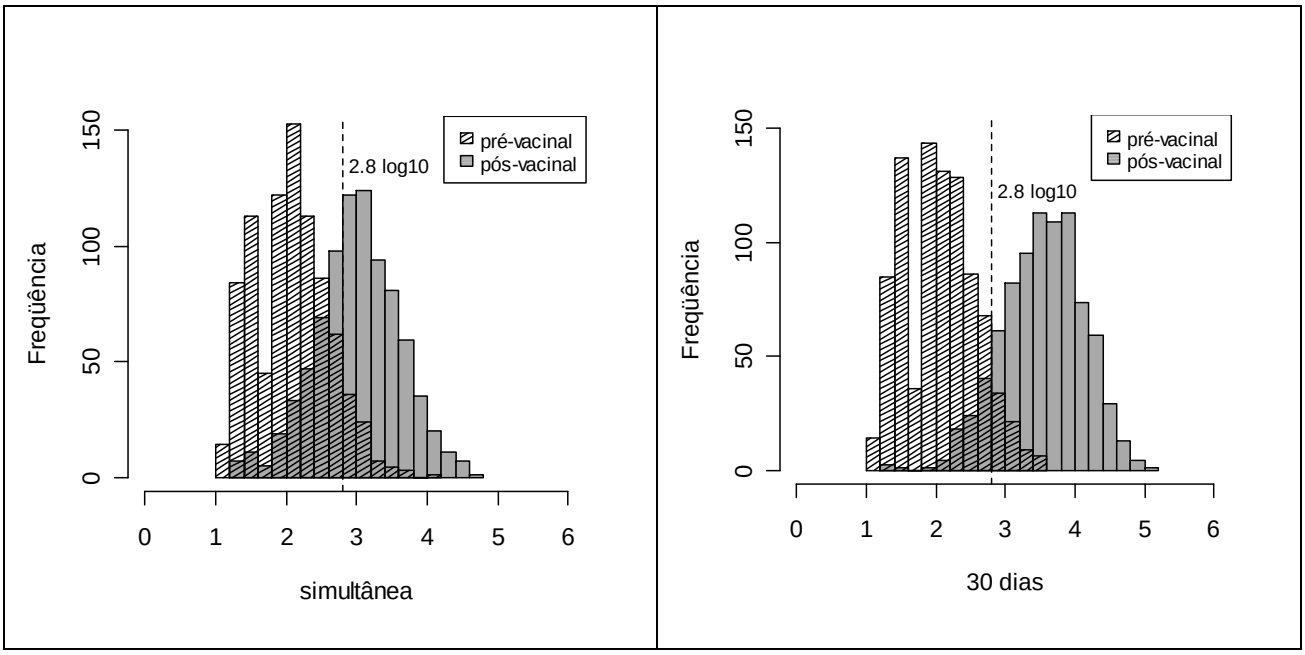


Figura 8: Logaritmo dos títulos (mUI/mL) de anticorpos contra febre amarela nas crianças antes e após a vacinação.



A proporção de soroconversão foi maior no grupo vacinado com intervalo de 30 dias (86,8%, I.C.95%: 84,3 – 89,0) que no grupo vacinado simultaneamente (70,9%, I.C.95%: 67,6 – 74,0) e teve significância estatística.

Em relação ao tipo de vacina contra febre amarela, a diferença na proporção de soroconversão foi pequena e sem significância estatística (p= 0,1445) - 81,5% para a vacina 17DD (I.C.95%: 78,7 – 84,2) e 78,7% para a vacina 17D-213 (I.C.95%: 75,7 – 81,5).

O título médio geométrico (TMG) de anticorpos para febre amarela foi 3,4 vezes maior no grupo com 30 dias ou mais de intervalo entre as vacinas e a diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 7). A diferença no TMG entre as subcepas vacinais contra febre amarela nesse grupo foi estatisticamente significativa - 3198,9 mUI/mL (I.C.95%: 3197,8 - 3200,0) para 17D-213 e 3689,8 mUI/mL (I.C.95%: 3688,7 - 3690,9) para 17DD -, assim como no grupo vacinado simultaneamente - 986,3 mUI/mL (I.C.95%: 985,2 - 987,4) para 17D-213 e 1096,1 mUI/mL (I.C.95%: 1068,0 - 1070,2) para 17DD.

Tabela 7: Proporção de soroconversão e média geométrica dos títulos (TMG) de anticorpos após a vacinação para febre amarela – coorte completa e subgrupo que aderiu ao protocolo.

			tempo entre as vacinas			
	análise		simultânea		30 dias	
Soroconversão, % (I.C.95%)	coorte completa	não vacinados	-	-	12,0	2,55 - 31,2
		17D-213	70,8	66,1 - 75,1	86,9	83,2 - 90,1
		17DD	71,2	66,4 - 75,7	91,1	88,0 - 93,7
		total	70,9	67,6 - 74,0	86,8	84,3 - 89,0
	protocolo	17D-213	66,1	61,4 - 70,6	84,6	80,7 - 88,0
		17DD	67,5	62,7 - 72,1	87,0	83,5 - 90,0
		total	66,8	63,5 - 70,0	85,9	83,3 - 88,2
TMG (mUI/mL), (I.C.95%)	coorte completa	não vacinados	-	-	2511,9	2510,1 - 2513,6
		17D-213	986,3	985,2 - 987,4	3198,9	3197,8 - 3200,0
		17DD	1069,1	1068,0 - 1070,2	3689,8	3688,7 - 3690,9
		total	1025,7	1024,6 - 1026,7	3443,5	3442,4 - 3444,6
	protocolo	17D-213	990,5	989,4 - 991,6	3183	3181,9 - 3184,1
		17DD	1058,2	1057,0 - 1059,3	3658,5	3657,4 - 3659,6
		total	1022,6	1021,5 - 1023,7	3455,4	3454,3 - 3456,4

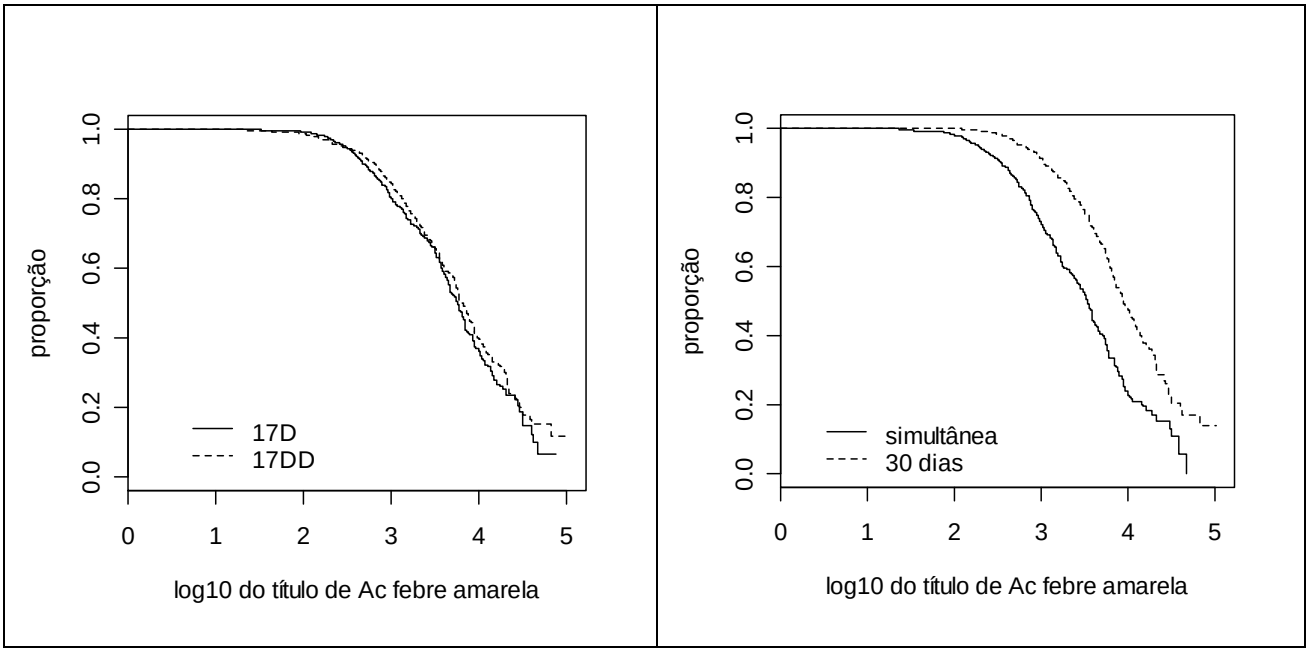
No subgrupo que aderiu ao protocolo a soroconversão total para febre amarela foi 76,3%.

A proporção de soroconversão foi maior no grupo vacinado com intervalo de 30 dias (85,9%, I.C.95%: 83,3 – 88,2) comparada à vacinação simultânea (66,8%, I.C.95%: 63,5 – 70,0).

No grupo que recebeu a vacina 17DD (77,6%, I.C.95%: 74,6 – 80,4) a proporção de soroconversão foi 2,6 pontos percentuais maior que na vacina 17D-213 (75,0%, I.C.95%: 71,9 – 78,0).

Houve diferença estatisticamente significativa no TMG entre as subcepas vacinais contra febre amarela tanto no grupo vacinado com intervalo de 30 dias ou mais - 3183,0 mUI/mL (I.C.95%: 3181,9 - 3184,1) para 17D-213 e 3658,5 mUI/mL (I.C.95%: 3657,4 - 3659,6) para 17DD -, como no grupo vacinado simultaneamente - 990,5 mUI/mL (I.C.95%: 989,4 - 991,6) para 17D-213 e 1058,2 mUI/mL (I.C.95%: 1057,0 - 1059,3) para 17DD.

Figura 9: Distribuição cumulativa reversa do log 10 do título de anticorpos para febre amarela após a vacinação, segundo tipo de vacina contra febre amarela e o intervalo entre as vacinas.



As diferenças na distribuição dos títulos de anticorpos pós-vacinais de febre amarela segundo a subcepa vacinal são pequenas e sem significância estatística (χ^2 = 2,5, p = 0,113). Em oposição, houve diferença substancial e com significância

estatística (χ^2 = 113 , p <0,001) na distribuição dos títulos segundo o intervalo entre as vacinas triviral e contra febre amarela (Figura 9).

Tabela 8: Variáveis relevantes do modelo logístico multivariado para soroconversão de febre amarela

variável	OR bruto	IC bruto		OR ajustado	IC ajustado	
intervalo entre as vacinas (30 dias /simultânea)	3,03	2,38	3,85	3,96	2,89	5,43
intervalo entre coleta e VTV	1,01	1,01	1,02	0,99	0,99	1,00

O modelo logístico para soroconversão teve como variáveis explicativas o intervalo entre as vacinas (p<0,001) e o intervalo entre a coleta de sangue e a vacina triviral (p=0,0135). A variável "tipo de vacina contra febre amarela" não foi estatisticamente significativa nem no modelo logístico (p= 0,130), nem modelo multivariado (p= 0,727), assim como a interação desta variável com o intervalo entre as vacinas (p= 0,734).

Tabela 9: Variáveis relevantes do modelo linear multivariado para log10 título pós-vacinal de febre amarela.

Variável	β bruto	IC bruto		β ajustado	IC ajustado	
		LI	LS		LI	LS
Intercepto	3,27	3,24	3,30	3,18	3,09	3,27
intervalo entre as vacinas (30 dias - simultânea)	0,53	0,47	0,58	0,47	0,30	0,64
intervalo entre coleta e VTV	0,0051	0,0040	0,0063	-0,0043	-0,0065	-0,0021
interação do intervalo entre as vacinas e o intervalo entre coleta e VTV	-	-	-	0,0028	-0,000077	0,0056

5.3. Eventos adversos

É importante ressaltar que devido ao desenho deste estudo a avaliação dos eventos adversos segundo o intervalo entre as vacinas triviral e contra febre amarela é peculiar. Os eventos sistêmicos ocorridos quando a vacinação foi simultânea podem estar associados a qualquer dos quatro antígenos ou a nenhum deles, já que os eventos registrados eram inespecíficos e poderiam resultar de intercorrências clínicas. Os

eventos ocorridos quando o intervalo entre as vacinas foi maior ou igual a 30 dias tinham associação mais provável com a vacina contra febre amarela.

A freqüência global de eventos adversos foi de 23%, sendo maior entre os indivíduos vacinados simultaneamente (27,3%). Os eventos mais freqüentes foram febre (14,2%) e irritabilidade (3,3%). Os sintomas “dor no corpo” e “dor de cabeça”, incluídos no questionário por serem associados às vacinas contra febre amarela, não se aplicam a crianças da faixa etária deste estudo e foram desconsideradas.

Tabela 10: Freqüência de eventos adversos segundo intervalo entre as vacinas triviral e contra febre amarela.

	tempo entre as vacinas						
	simultânea		30 dias		total		
sintomas	n	%	n	%	n	%	p
febre	150	16,6	109	11,8	259	14,2	0,01
vômitos	18	2,0	17	1,8	35	1,9	0,35
irritabilidade	37	4,1	23	2,5	60	3,3	0,08
dor local	33	3,6	19	2,1	52	2,8	0,11
vermelhidão	16	1,8	11	1,2	27	1,5	0,35
algum sintoma**	247	27,3	173	18,8	420	23,0	0,02

*teste qui-quadrado **inclui os sinais/sintomas descritos e outros

A proporção de eventos adversos foi maior no grupo vacinado simultaneamente (Tabela 10, Figura 6), porém esta diferença só apresentou significância estatística para febre (p=0,01) e para a apresentação de quaisquer sintomas (p=0,02). As diferenças na reatogenicidade segundo as subcepas contra febre amarela foram pequenas e sem significância estatística (p>0,05).

Figura 10: Proporção de eventos adversos segundo intervalo entre as vacinas contra febre amarela e triviral.

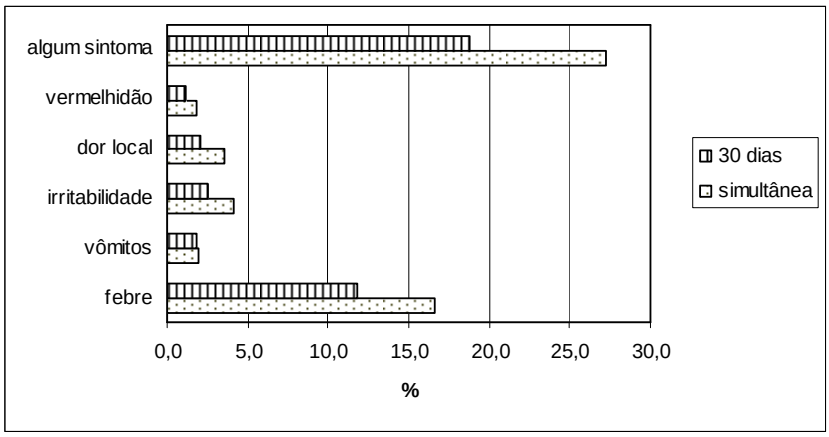


Tabela 11: Tempo (em dias) de início dos sintomas segundo intervalo entre as vacinas.

tempo (dias)	tempo entre as vacinas				
	simultânea		30 dias		
sintomas	média	desvio padrão	média	desvio padrão	P*
febre	5	5	4	5	0,08
vômitos	6	6	6	7	0,74
irritabilidade	4	4	5	8	0,39
dor local	1	1	1	0	0,39
vermelhidão	1	1	2	2	0,13

*teste *t* de Student

Os eventos locais (dor local e vermelhidão) ocorreram mais precocemente do que os eventos sistêmicos (febre, vômitos e irritabilidade) (Tabela 11). Os eventos adversos no grupo que recebeu as vacinas triviral e contra febre amarela simultaneamente não diferiam, em média, no tempo de inicio dos sinais/sintomas.

Tabela 12: Duração dos sintomas (em dias) segundo intervalo entre as vacinas

duração dos sintomas	tempo entre as vacinas				
	simultânea		30 dias		
sintomas	média	desvio padrão	média	desvio padrão	P*
febre	2	3	3	7	0,51
vômitos	2	1	2	2	0,37
irritabilidade	3	2	3	3	0,56
dor local	2	2	3	2	0,48
vermelhidão	3	3	2	1	0,12

*teste *t* de Student

O tempo de duração dos sinais e sintomas foi, em média, 2 a 3 dias, com medianas variando de 1 a 2 dias. A diferença entre os dois grupos foi pequena e sem significância estatística.

6. Discussão

O ensaio de campo foi delineado para avaliar a interação da vacina triviral (vacina combinada contra rubéola, sarampo e caxumba) com dois tipos de vacina contra febre amarela. Este trabalho tem como foco a análise do componente rubéola.

No planejamento do estudo não se considerou a vacina tríplice viral como uma variável já que não era objeto da intervenção, sendo originadas de um produtor e aplicadas presumivelmente aos 12 meses de idade em todas as crianças. Ao longo das análises descobriu-se que a vacina tríplice viral usada nos serviços era de dois fabricantes distintos - Merck, Sharp & Dohme (MSD) e Glaxo SmithKline (GSK) - com diferentes composições quanto às cepas contra caxumba (Jeryl Lynn e RIT 4385, respectivamente) e contra sarampo (Moraten e Schwarz, respectivamente). Como a cepa para a rubéola era a mesma nas duas formulações (Wistar RA27/3), essa informação não afetou os resultados desse estudo. Estudos comparativos entre as vacinas da MSD e da GSK mostraram excelente soroconversão para rubéola em ambas as apresentações [60, 61].

As perdas do estudo não foram concentradas em subgrupos específicos nem mostraram qualquer tendência, de forma que não parecem afetar as conclusões. As perdas foram principalmente por desistências relacionadas à segunda coleta de sangue, mas houve também perdas por extravio de espécimes no envio do soro do Distrito Federal para o Rio de Janeiro e por material insuficiente.

De modo geral, se considera que os centros de saúde do Distrito Federal garantem acesso às ações de imunização e permitem boa cobertura vacinal. As recusas à participação não foram sistemáticas. Além disso, quem aderiu à pesquisa não tinha nenhuma condição peculiar conhecida que pudesse alterar a reposta à vacina, pois todos eram indivíduos sadios no momento da vacinação e, portanto, com o mesmo potencial teórico de resposta imunológica. Desta forma, o grupo de estudo parece representar adequadamente o grupo etário da área de abrangência das unidades de saúde.

A soropositividade pré-vacinal para rubéola foi 2,0%. Em geral, anticorpos maternos contra rubéola desaparecem rapidamente, estando presentes em apenas 13% das crianças de 6 a 12 meses, 5% de crianças de 9 a 12 meses e 2% de 12 a 15 meses de idade [62-64], o que pode explicar essa proporção de soropositivos na amostra.

A soroconversão para rubéola de 97,3% no grupo vacinado com 30 dias ou mais de intervalo foi compatível com a observada em outros estudos com a vacina triviral [9, 10]. A menor intensidade da resposta ao componente rubéola da triviral nas crianças

vacinadas concomitante contra febre amarela não tem precedentes na literatura. Uma hipótese para explicar esse achado seria a inibição da replicação do vírus da vacina contra rubéola na presença de interferon induzido pela vacina contra febre amarela [44, 45].

Os indivíduos com resultado inconclusivo após a vacinação estavam concentrados no grupo que foi vacinado simultaneamente, provavelmente por se tratarem de reatores fracos devido à interferência da vacina contra febre amarela.

Muitos estudos de imunogenicidade usam como técnica para a detecção dos anticorpos inibição de hemaglutinação (HI), apesar dos anticorpos neutralizantes serem mais importantes biologicamente [2]. Outros analisam a resposta à vacinação com a tríplice viral aos 9 meses e aos 15 meses, já que a idade recomendada para vacinação varia entre os países. Isso dificulta as comparações entre os estudos.

Em crianças com 9 meses e com 15 meses, Forleo-Neto *et al.* [65] mostraram soroconversão similares (99% e 100%) e TMG aferidos por HI de 83 UI/mL e 142 UI/mL respectivamente. Rojo *et al*. [66] mostraram soroconversão de 100% e TMG de 62UI/mL e 59UI/mL – medidos por ELISA - com duas vacinas trivirais de fabricantes diferentes em crianças de 3 a 4 anos.

Em 2000, Klinge *et al.*[10] mostraram em crianças de 12 a 14 meses e de 15 a 17 meses soroconversão de 96,6% e 97,7% e TMG aferidos por ELISA de 39 UI/mL e 49 UI/mL, respectivamente.

Percebemos que mesmo com diferentes métodos altas taxas de soroconversão foram observadas, mas os TMG obtidos não foram comparáveis.

Embora exista uma diferença estatisticamente significante entre os títulos médios geométricos entre os subgrupos formados pelos subtipos de vacina contra febre amarela, a diferença não mostrou relevância no modelo multivariado - onde o tipo de vacina contra febre amarela não apareceu como variável de confusão -, nem ao longo da distribuição dos títulos pós-vacinais para rubéola.

O ponto de corte dos testes sorológicos para definir soropositividade tem como referência respostas à infecção natural, geralmente de maior intensidade do que as que resultam de infecção vacinal. Desta forma, títulos classificados com “inconclusivos” ou “indeterminados” para fins de confirmação sorológica poderiam corresponder a títulos de anticorpos que indicam resposta à vacinação.

A reposta imune associada à proteção é a presença de anticorpos neutralizantes [67]. Como a medida destes anticorpos não é disponível rotineiramente, níveis de anticorpos de 15 UI medidos por outros métodos são considerados como protetores contra a

infecção [68]. Sendo assim, as respostas obtidas - por ELISA - nos 2 grupos de comparação, apesar de estatisticamente diferentes, correspondem a níveis de anticorpos considerados protetores. Os resultados inconclusivos estão abaixo desse valor, não indicando proteção contra infecção.

Enquanto a imunidade natural para rubéola dura em torno 26 anos [69], a persistência de anticorpos para rubéola tem sido detectada de 9 até 21 anos após a vacinação [70].

Christenson and Bottiger [71] observaram uma coorte de cerca de 500 meninas vacinadas aos 12 anos de idade por um período de 16 anos. Embora a soropositividade ao longo do estudo não tenha decrescido substancialmente – 100% a 94% em 2 meses a 16 anos respectivamente – os TMG diminuíram de 1:110 a 1:18.

Este decréscimo nos níveis de anticorpos ao longo do tempo sugere que os títulos mais baixos obtidos quando a vacinação foi simultânea podem gerar, em um período inferior ao da revacinação recomendada, uma coorte de susceptíveis ao vírus da rubéola. Dessa forma, as probabilidades de falha primária e secundária estariam aumentadas, enfatizando a revacinação sugerida para aumentar a imunidade antes da idade fértil.

Como não há evidências de disseminação do vírus vacinal para os contatos das crianças vacinadas [72-74], a única forma de imunização além da infecção natural é a vacinação.

A estratégia de vacinação contra rubéola tem diferentes efeitos sobre ao controle da SRC. O objetivo principal do programa de vigilância da rubéola é evitar o contágio de gestantes pelo vírus da rubéola. A vacinação de mulheres em idade fértil tem ação direta sobre a SRC já que, caso se atingisse 100% de imunização, provavelmente poderíamos erradicar os casos de imediato [2]. Ao vacinar crianças, homens e mulheres adultos o objetivo é conter a circulação viral. A erradicação da SRC apenas com a vacinação de crianças provavelmente seria em 30 a 40 anos [2].

A soropositividade pré-vacinal para febre amarela (7,7%), semelhante à encontrada em estudo de Meyer *et al*. [44], pode ser atribuída à persistência de anticorpos maternos. Em 2006, Suzano [75] em estudo de acompanhamento de gestantes vacinadas inadvertidamente contra febre amarela mostrou que a proporção de crianças sororeatoras caiu de 63%, 21% e 7%, aos 3, 6, 12 meses de vida, respectivamente.

Outra hipótese é o fato de que apesar da vacina contra febre amarela ser aplicada aos 12 meses no DF, no entorno desta região (no Estado de Goiás) a vacinação é aos 9 meses. Relatos de profissionais de saúde dos serviços locais dão conta de que crianças

de regiões de Goiás limítrofes com o DF buscam vacinação em unidades de saúde do DF ocultando a vacinação contra febre amarela aos 9 meses. Estas crianças podem ter migrado para o DF, portanto, já com anticorpos contra febre amarela, principalmente nos reatores fortes.

Também se pode atribuir estes achados às imprecisões associadas ao teste usado para a detecção dos anticorpos anti-amarílicos – PRNT. Como não há um ponto de corte padronizado para soropositividade definido na literatura, é possível que tenha ocorrido erros de classificação quanto à soropositividade dos indivíduos. Assim sendo, o ponto de inflexão das curvas pré e pós-vacinação sugere o título de 2,7 log10 como o ponto de corte que melhor discrimina soropositivos e soronegativos, ainda que com limites imprecisos.

Os dados sugerem que a interferência na imunogenicidade foi maior na vacina contra febre amarela, uma vez que a resposta imunológica à vacinação contra febre amarela foi substancialmente reduzida pela aplicação simultânea da vacina tríplice viral. A diferença entre subcepas na soroconversão não foi clinicamente nem estatisticamente relevante, mostrando que a soroconversão inferior à observada em adultos não é explicada pelo tipo de vacina.

Em estudo de soroconversão de caráter multicêntrico, a vacina da subcepa 17DD alcançou níveis de soroconversão de 88% em crianças de 12 a 23 meses e de 72% nas de 9 a 11 meses [43]. Nos lactentes de 9 a 11 meses em São Paulo a soroconversão foi de 67%.

Os resultados quanto à intensidade da resposta quando a aplicação das vacinas foi simultânea foram semelhantes aos de estudo em adultos com a vacina da subcepa 17DD [76].

Soroconversão e soropositividade pós-vacinação contra febre amarela em crianças de 12 meses (em média) foi pouco menor do que a observada em crianças acima de 2 anos e adultos e semelhante à observada em lactentes com menos de 12 meses. Os achados para os vacinados com 30 dias de intervalo foram compatíveis com os obtidos nos outros centros colaborativos desse estudo [77].

O PRNT tem sido o método de escolha usado nos últimos anos em estudos com a vacina contra febre amarela, porém não houve uma padronização do teste nestes ensaios clínicos. As diferenças na sensibilidade dos testes usados explicam a variabilidade nos TMG encontrada nos estudos, mas não parecem influenciar a soroconversão quando esta é medida oportunamente após a vacinação [16].

Houve diferenças pequenas em relação ao tipo de subcepa contra febre amarela na distribuição cumulativa entre os títulos pós-vacinais contra febre amarela, porém sem significância estatística. Esta diferença também não mostrou relevância no modelo multivariado. Estes resultados indicam que a soroconversão e a intensidade da resposta imune para febre amarela em lactentes não é atribuível a diferenças nas subcepas das vacinas.

A variação dos títulos pós e pré-vacinação poderia ser explicada pela associação do intervalo entre as coletas de sangue pós e pré-vacinação e o intervalo entre a vacinação triviral e contra febre amarela. No modelo de regressão múltipla – mesmo controlando o efeito do tempo de coleta de sangue - as respostas à vacinação contra febre amarela e contra rubéola são mais intensas quando a vacina contra febre amarela foi aplicada 30 dias ou mais após a vacina triviral.

É preciso lembrar que a interferência observada na imunogenicidade da vacina contra febre amarela é da vacina triviral, ou seja, teoricamente, são três antígenos vivos atenuados com potencial de interferir na vacina contra febre amarela. Em estudo de Meyer et al. [44], a aplicação simultânea de vacina contra sarampo e contra varíola diminuiu a resposta à vacina contra febre amarela em 12%. Corroborando com este estudo, Petralli et al. [78] mostraram produção de interferon a partir do dia 4 após a primovacinação contra sarampo. Isto pode explicar a intensidade da resposta ser três vezes maior quando a vacina é aplicada com intervalo de 30 dias após a vacina triviral.

A dimensão da contribuição de cada componente da triviral é irrelevante para saúde pública, considerando que no Brasil os componentes não são administrados separadamente. Sendo assim, a importância da interferência da triviral na resposta imunológica para a febre amarela é que isso pode levar a uma coorte de susceptíveis antes da revacinação recomendada, comprometendo o controle da endemia.

A análise dos eventos adversos foi um objetivo secundário deste estudo. Como não foi instituído um grupo placebo, não havia como comparar de forma inequívoca se os eventos relatados foram devido à vacina ou à intercorrências clínicas não associadas à vacinação. A comparação quanto ao fato de ter recebido vacinas simultâneas ou com intervalo de 30 dias ou mais pode, aparentemente, isolar os efeitos da vacina contra febre amarela e da vacina triviral em conjunto com a vacina contra febre amarela.

A variabilidade dos estudos quanto aos eventos adversos é bastante ampla. Isto decorre da variação na idade dos indivíduos, tamanho da amostra, tipo de vacina, local

de inoculação, forma de inoculação, método de avaliação e administração simultânea de outras vacinas ou drogas [23].

A freqüência de eventos adversos pós-vacinação foi compatível com a relatada na literatura [23], exceto para febre, que foi cerca de 2 vezes maior. Houve maior freqüência de sinais/sintomas na vacinação simultânea, o que era esperado por se tratar da aplicação de duas vacinas e quatro agentes virais. Para o intervalo de 30 dias estamos provavelmente avaliando apenas os eventos associados à vacina contra febre amarela.

Há limitações em relação à acurácia dos eventos adversos, já que foram relatados pelas mães e ocorreram em crianças muito pequenas (12 a 23 meses). Há maior segurança nos relatos de eventos locais e nos que podem ser aferidos, como a febre.

7. Considerações finais

Considerando o plano de erradicação da SRC nas Américas até 2010 - e em se tratando de uma doença imunoprevenível - quaisquer fatores que possam afetar a resposta à vacinação contra a rubéola devem ser cuidadosamente avaliados a fim de subsidiar decisões para novas ações.

O excelente desempenho do componente rubéola na vacina triviral foi prejudicado pela aplicação simultânea à vacina contra febre amarela, mas a recíproca - soroconversão reduzida para febre amarela - foi de interpretação mais complexa pela combinação dos componentes sarampo, rubéola e caxumba. Mesmo assim, parece também forçar a revisão de uma recomendação bem estabelecida de vacinação simultânea para evitar oportunidades perdidas.

A implicação para saúde pública desta informação orienta novas recomendações para o calendário vacinal, restringindo a indicação da vacinação simultânea com as vacinas contra febre amarela e a vacina triviral. O contexto epidemiológico destes agravos no momento da decisão deve ser avaliado, de forma a decidir sobre a possibilidade de adiamento da dose - se o número de casos da doença estiver dentro dos níveis esperados - ou recomendando a revacinação contra estes agentes em período menor que o atualmente proposto – se não for possível adiar a aplicação simultânea das vacinas por conta de um aumento dos casos.

Outrossim, a interferência de vacinas de vírus vivos atenuados não é uma regra geral, devendo cada vacina ser considerada um caso específico, e as implicações analisadas para as vacinas de interesse.

8. Referências bibliográficas

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância Epidemiológica das Doenças Exantemáticas – sarampo, rubéola e síndrome da rubéola congênita (SRC).* Brasília: 2003.

2. Plotkin SA, Reef S. *Rubella Vaccine*. In: Plotkin SA & OrensteinWA, editors. *Vaccines*. Fourth edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2004. p.707-43.

3. Wolinsky JS. *Rubella* In: K.-D. Fields BN, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 899-929.

4. Pereira MB. *Cardiopatias congênitas: Perspectiva pediátrica.* Pediatr Mod 1992; **28**: 416-20.

5. Fonseca SMD, Dantas VCR, Dantas MT, Fernandes JV. *Avaliação do Estado Imune de Mulheres em Idade Reprodutiva em Relação ao Vírus da Rubéola.* RBGO 1999; **21**(5): 261-66.

6. Cutts FT, Robertson SE, Diaz-Ortega JL, Samuel R. *Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries, part 1: burden of disease from CRS.* World Health Organization 1997; **75**: p. 55-68.

7. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa de Imunizações. *Manual de Procedimentos para Vacinação*. Brasília: 2001.

8. Weibel RE, Carlson AJ, Villarejos VM et al. *Clinical and laboratory studies of combined live measles, mumps and rubella vacines RA 27/3 rubella virus.* Proc Soc Exp Biol Med 1980; **165**: 323-26.

9. Tischer A & Gerike E. *Immune response after primary and re-vaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella.* Vaccine 2000; **18**: 1382-92.

10. Klinge J, Lugauer S, Korn K, Heininger U, Stehr K. *Comparison of immunogenicity and reactogenicity of a measles, mumps and rubella (MMR) vaccine in German children vaccinated at 9-11, 12-14 or 15-17 months of age.* Vaccine 2000; **18**: 3134-40.

11. Ministério da Saúde, *Portaria n°1100, de 24/05/1996.*

12. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. *Guia de Vigilância Epidemiológica* Brasília: 1998.

13. Pan American Health Organization – PAHO. *Brazil accelerates control of rubella and prevention of congenital rubella syndrome.* EPI Newsl 2002; **24**(2): 1-3.

14. Monath TP. *Yelow fever: An update.* Lancet Infect Dis 2001; **1**: 11-20.

15. Vasconcelos PFC. *Febre Amarela.* Rev Soc Bras Med Trop 2003; **36**(2): 275-93.

16. Monath TP. *Yellow Fever.* In: Plotkin SA & Orenstein WA editors. *Vaccines.* Third ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999.

17. Vasconcelos PFC, ed. *Febre amarela*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria; 2000.

18. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela.* Brasília: 1999.

19. World Health Organization. Global programme for vaccines and immunization/Division of emerging and other communicable diseases suveillance and control. *Yellow fever - technical consensus meeting*. Geneva: 1998.

20. WHO. *Report on global Surveillance of epidemicprone Infectious Diseases.* 2000.

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

22. Santos CND; Post PR; Carvalho R; Rice CM & Galler R, *Complete nucleotide sequence of the genome from yellow fever virus 17DD and 17D-213 vaccine strains.* Vírus Research, 1995. **35**: p. 35-41.

23. Camacho LAB, Freire M, Leal MLF, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T et al. *Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled.* Rev Saúde Pública 2005; **39**(3): 413-20.

24. Freestone DS. *Yellow Fever Vaccine*. Plotkin SA & Mortimer EA, editors. Vaccines. 2nd ed. Philadelphia.: W.B. Saunders Company; 1994.

25. Belmusto-Worn VE, Sanchez JL, McCarthy K, Nichols R, Bautista CT et al. *Randomized, double-blind phase III, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety and tolerability of two yellow fever 17 D vaccines (Arilvax, and YF-Vax) in healthy infants and children in Peru.* Am J Trop Hyg 2005; **72**(2): 189-97.

26. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle da Febre Amarela*; 2000.

27. Decker MD, Edwards KM. *Combination Vaccines*. In: Plotkin SA & Orenstein WA, ed. Vaccines. Third ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.

28. Deforest A, Long SS, Lischner HW et al. *Simultaneous administration of measles-mumps-rubella vaccine with booster doses of diphtheria-tetanus-pertussis and poliovirus vaccines.* Pediatrics 198; **81**(2): 237-46.

29. Watson BM, Laufer DS, Kuter BJ et al. *Safety and immunogenicity of a combined live attenuated measles, mumps, rubella, and varicella vaccine (MMR(II)V) in healthy children [published erratum appears in J Infect Dis 173(6):1529, 1996]*. J Infect Dis 1996; **173**(3): 731-34.

30. Ruben FL, Smith EA, Foster SO. *Simultaneous administration of smallpox, measles, yellow fever, and diptheria-pertussis-tetanus antigens to Nigerian children.* Bull World Health Organ 1973; **48**: 175-81.

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

32. Mouchon D, Pignon D, Vicens R et al.. *Étude de la Vaccination Combinée Rougeole-Fièvre Jaune Chez L'Énfant Africaine Agé de 6 a 10 Mois.* Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique 1990; **83**: p. 537-51.

33. Soula G, Sylla A, Pichard E et al.. *Etude d'un noveau vaccin combiné contre la fievre jaune et la rougeol chez des enfants agés de 6 a 24 mois au Mali.* Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique 1991; **84**(5): 885-97.

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

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

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

37. Yvonnet B, Coursaget P, Deubel V et al. *Simultaneous administration of hepatis B and yellow fever vaccines.* J Med Virol 1986; **19**: 307-11.

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

39. Gil A, Gonzalez A, Dal-Re R, Calero JR. *Interference assessment of yellow fever vaccine with the immune response to a single-dose inactivated hepatitis A vaccine (1440 EL.U.). A controlled study in adults.* Vaccine 1996; **14**(11): 1028-30.

40. Dukes C, Froeschle J, George J et al. *Safety and immunogenicity of simultaneous administration of Typhim Vi (TV), YF-VAX (YF) and Menomune (MV) [Abstract]*. In *36th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 1996.

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

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

43. 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.

44. Meyer HM Jr et al. *Response of Volta children to jet inoculation of combined live measles, smallpox and yellow fever vaccines.* Bull World Health Organ 1964. **30**: 783-94.

45. Wheelock EF, Sibley WA, *Circulating virus, interferon and antibody after vaccination with the 17-D strain of yellow fever virus.* The New England Journal of Medicine 1965; **273**(4): 194-98.

46. Lerman SJ, Bollinger M, Brunken JM, *Clinical and serologic evaluation of measles, mumps and rubella (HPV77:DE-J and RA 27/3) virus vaccines singly and in combination.* Pediatrics 1981; **68**: 18-22.

47. Brunell PA, Weigle K, Murphy D et al., *Antibody response following measles-mumps-rubella vaccine under conditions of customary use.* JAMA 1983; **250**: 1409-12.

48. Friedman ML, Furberg CD, DeMets DL. *Fundamentals of Clinical Trials.* Springer-Verlag, Inc.: New York; 1999.

49. Nakamura RM, Tucker ES, Carlson IH, ed. *Os imunoensaios no laboratório clínico*. In: Henry JB, ed. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 18a. ed. Ed. Manole: São Paulo; 1999.

50. Cohen BJ, Audet S, Andrews N, Beeler J, WHO working group on measles plaque reduction neutralization test. *Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: description of standardized laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination.* Vaccine 2007; **26**: 59-66.

51. Dobler G, Jelinek T, Frösner G, Nothdurft HD, Löscher T. *Kreuzreaktivität von Patientenseren mit akutem Dengue-Fieber mit Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Tests. [Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis]*. Wien Med Wochenschr 1997; **147**(19-20): 463-4.

52. 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): p. 867-71.

53. Chow S & Liu J, ed. *Design and Analysis of Clinical Trials*. John Wiley & Sons, Inc: New York; 1998.

54. Camacho LAB, Freire MS, Leal MLF, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Farias RHG, Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. *Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial.* Rev Saúde Pública 2004; **38**(5): p. 671-78.

55. R Development Core Team. R Foundation for Statistical Computing. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria; 2006.

56. Fleiss J, ed. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2nd ed. John Wiley & Sons: New York; 1981.

57. Schwarz AJ, Jackson JE, Ehrenkranz NJ et al. *Clinical evaluation of new measles-mumps-rubella vaccine.* Am J Dis Child 1975; **129**: 1408-12.

58. Just M, Berger R, Gluck R, Wegmann A. *Evaluation of a combined vaccine against measles-mumps-rubella produced diploid cells.* Dev Biol Stand 1986; **65**: 25-27.

59. Berger R, Just M, Gluck R. *Interference between strains in live virus vaccines. In combined vaccination with measles, mumps and rubella vaccine.* J Biol Stand 1988; **16**: 269-73.

60. Usonis V, Bakasenas V, Kaufhold A et al. *Reactogenicity and immunogenicity of a new live attenuated combined measles, mumps and rubella vaccine in healthy children.* Pediatr Infect Dis J 1999; **18**(1): 42-8.

61. Gothefors L, Bergstrom E, Backman M. *Immunogenicity and reactogenicity of a new measles, mumps and rubella vaccine when administered as a second dose at 12 y of age.* Scand J Infect Dis 2001; **33**(7): 545-9.

62. Nicoara C, Zach K, Trachsel D et al. *Decay of passively acquired maternal antibodies against measles, mumps, and rubella viruses.* Clin Diagn Lab Immunol 1999; **6**(6): 868-71.

63. Doroudchi M, Samsami Dehaghani A, Emad K, Ghaderi A. *Placental transfer of rubella-specific IgG in fullterm and preterm newborns.* Int J Gynaecol Obstet 2003; **81**(2): 157-62.

64. Leineweber B, Grote V, Schaad UB, Heininger U. *Transplacentally acquired immunoglobulin G antibodies against measles, mumps, rubella and varicella-zoster virus in preterm and full term newborns.* Pediatr Infect Dis J 2004; **23**(4): 361-63.

65. Forleo-Neto E, Carvalho ES, Fuentes ICP, Precivale MS, Forleo LHA, Farhat CK. *Seroconversion of a trivalent measles, mumps, and rubella vaccine in children aged 9 and 15 months* Vaccine 1997; **15** (17-18): 1898-901.

66. Rojo CC, Iglesias MR, Olvera J, Girón MA, *Study of the immune response engendered by differents combined measles, mumps and rubella (MMR) vaccines in an area of Andalusia (Spain).* Vaccine 2003; **22**: 280-6.

67. Plotkin SA. *Immunologic correlates of protection induced by vaccination.* Pediatr Infect Dis J 2001; **20**(1): 63-75.

68. Matter L, Kogelschatz K, Germann D. *Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations.* J Infect Dis 1997; **175**(4): 749-55.

69. Forrest JM, Slinn RF, Nowak MJ, Menser MA. *Duration of immunity to rubella.* Lancet Infect Dis 1971; **1**(7707): 1013.

70. Best JM, *Rubella vaccines: past, present and future.* Epidemiol Infect 1991; **107**(1): 17-30.

71. Christenson B, Bottiger M. *Long-term follow-up study of rubella antibodies in naturally immune and vaccinated young adults.* Vaccine 1994; **12**: 41-5.

72. Prinzie A, Huygelen C, Gold J et al. *Experimental live attenuated rubella virus vaccine: Clinical evaluation of Cendehill strain.* Am J Dis Child 1969; **118**: 172-7.

73. Plotkin SA, Farquhar J, Katz M, Buser F. *Attenuation of RA27/3 rubella virus in WI-38 human diploid cells.* Am J Dis Child 1969; **118**: 178-85.

74. Perkins FT. *Licensed vaccines.* Rev Infect Dis 1985; **7**(Suppl 1): S73-S76.

75. Suzano CE, Amaral E, Sato HK, Papaiordanou PM, Campinas Group on Yellow Fever Immunization during Pregnancy. *The effects of yellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy during a mass campaign in Brazil.* Vaccine 2006; **24**(9): 1421-6.

76. Lopes OS, Almeida SSDG, Carvalho R. *Studies on yellow fever vaccine III - dose response in volunteers.* J Biol Stand 1988; **16**: 77.

77. Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina contra Febre Amarela. *Immunogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children younger than 2 year-old: a randomized, double-blind study*. In *World Society for Pediatric Infectious Diseases*. 2007. Thailand (Bangkok).

78. Petralli JK, Merigan TC, Wilbur JR. *Circulation interferon after measles vaccination.* N Engl J Med 1965; **273**: p. 198-201.

ANEXO I - PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SORO[1]

- Após coleta do sangue, deixar as amostras a 37º C por 1 hora, para retração do coágulo.
- Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos.
- Aspirar cuidadosamente o soro com pipeta Pasteur.
- Transferir os soros para os tubos de transporte (criotubos) devidamente identificados com suas respectivas etiquetas.
- A cada 10 indivíduos, dividir o soro de um mesmo indivíduo em duas alíquotas, identificando-as como se fossem indivíduos diferentes.
- Registrar todos os procedimentos em folha de controle apropriada, exclusiva do estudo.

PRNT PARA FEBRE AMARELA
(TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA DE LISE)

Procedimentos:

- Listar as amostras e arrumá-las de 10 em 10, em ordem, de modo que não se misturem.
- Inativar as amostras a 56°C por 30 minutos.
- Distribuir 50µl de meio em toda a placa, exceto nos orifícios H1 a H12.
- Colocar 80µl de meio nos orifícios H1 a H10.
- Colocar 90µl de meio no orifício H11.
- Adicionar 20µl das amostras de soro a serem testadas aos orifícios H1 a H10, assegurando-se de que não haverá mistura das amostras (uma amostra em cada orifício).
- Colocar 10µl do soro padrão no orifício H11. O soro padrão provém de macaco Rhesus, vacinado contra febre amarela, apresentando alto título de anticorpos contra febre amarela, e padronizado frente a um soro de referência internacional da WHO. O soro padrão é repetido a cada dez amostras testadas.
- Diluir com pipeta multicanal de 12 no sentido de H para A da microplaca,(exceto na coluna 12), passando 50µl para o orifício seguinte e desprezando 50µl da última diluição.
- Adicionar 50µl de vírus referência previamente diluído em todos os orifícios da placa.
- Cobrir e deixar por 1 h a temperatura ambiente.
- Preparar uma suspensão de células Vero.
- Colocar 50µl da suspensão de células em todos os orifícios da placa.
- Tampar e incubar por 3 h a 37°C em incubadora BOD.
- Descartar o meio batendo a placa sobre uma toalha estéril.
- Colocar 100µl de meio com CMC 2,7%.
- Incubar por 7 dias a 37°C em incubadora com 5% de CO_2.

---

1 Elaborado pelos tecnologistas do LATEV / Bio-Manguinhos / FIOCRUZ

- Após 7 dias de incubação, observar ao microscópio para certificar-se de que houve formação de plaques.
- Adicionar 100µl de formol 10% em todos os orifícios da placa , assegurando-se que o formol tenha atingido o tapete celular.
- Deixar por 1 h a temperatura ambiente.
- Após 1 h retirar o formol por inversão vigorosa das placas . Este procedimento deve ser realizado em pia com água corrente.
- Lavar cada placa, mergulhando-a numa cuba com água corrente com cuidado para que o jato de água não bata diretamente na placa e invertendo-a vigorosamente. Repetir este procedimento até a completa remoção do CMC.
- Colocar 100µl de cristal violeta 1% em todos os orifícios da placa.
- Deixar por 15 minutos a temperatura ambiente e retirar através de lavagem em água corrente, repetindo o procedimento para remoção do CMC.
- Secar as placas a 37°C.
- Contar os plaques de todos os orifícios da placa, começando pelos orifícios do vírus referência H12 até A12 e continuar sucessivamente até o final da placa. Colocar os resultados das leituras numa tabela.

CÁLCULO DO TÍTULO

1. Fazer a média aritmética do número de plaques referente ao vírus.
2. Calcular o "endpoint" do vírus ou 50% do n^{o} de plaques do vírus.
3. Montar uma tabela com o log das diluições do soro padrão, anotando as leituras dos plaques de cada placa referentes a cada diluição. Fazer a média do n^{o} de plaques de cada diluição.
4. Transportar o valor referente a 50% do n^{o} de plaques do vírus (item 2) para a tabela do item 3 e calcular a diluição correspondente através de regressão linear.
5. Para calcular o fator de correção do título de proteção, acha-se o antilog da diluição correspondente a 50% do n^{o} de plaques do vírus encontrado no item 4. Divide-se 29200mUI/ml referente ao soro padrão nacional pelo antilog achado e transforma-se o resultado em log.
6. O mesmo valor referente a 50% do n^{o} de plaques do vírus é aplicado na tabela de soros testes e por regressão linear acha-se a diluição correspondente. A este valor soma-se o fator de correção do item 5. Este será o título final do soro teste em log mIU/ml e o seu antilog em mIU/ml.
7. O "baseline" será o valor achado no item 5 em antilog, multiplicado por 2 em mUI/ml.

ANEXO II - ENSAIO PARA DETECÇÃO DE IgG ESPECÍFICA PARA RUBÉOLA (ELISA)

- Deixar os reagentes à temperatura ambiente antes de iniciar o ensaio sem remover a placa ou strip.

- Colocar controle P/N no 1º e no último orifício da reação, diluir 1:21 em tampão de amostra.
- Diluir previamente todas as amostras e o soro referência anti-rubéola com tampão para amostras colorido POD 1+20. Misturar agitando levemente.

- Pipetar 20 µl de soro referência pré-diluído para os dois primeiros poços de barra de uma placa de ensaio.

- Pipetar para cada um dos poços seguintes, em forma de barra, 20 µl de diluição de amostras.
- Pipetar, uma vez mais, 20 µl de soro referência pré-diluído para cada um dos últimos poços de uma série de medições ou de uma placa de microtitulação.

- Após a conclusão das operações de pipetagem, colar a placa de ensaio com película e colocar depois no incubador.
- Incubar 60 min, com 37°C.
- Retirar a película, aspirar todos os poços e lavar 4 vezes com solução de lavagem POD diluída.
- Para dosagem do conjugado, pipetar 100 µl de diluição de uso Anti-human-IgG/POD em cada poço.
- Colar a placa de ensaio com uma película nova e colocar na incubadora.
- Incubar 60 min, com 37°C.
- Retirar a película, aspirar todos os poços e lavar 4 vezes com solução de lavagem POD diluída.
- Para dosagem do substrato, colocar 100 µl de solução de uso cromógeno em cada poço, colar a placa de microtitulação com a nova película.
- Incubar durante 30 min após a dosagem do substrato, à temperatura ambiente (+18 a +25°C), protegido da luz.
- Remover a película. Acrescentar 100 µl de solução de bloqueio POD em cada poço e, ao mesmo tempo, conservar a mesma cadência de dosagem do substrato.
- Efetuar fotometria a 450nm no espaço de uma hora. O comprimento de onda recomendado para medição de referência é de 650nm, se for necessário 615 a 690nm. Para cada amostra e também para os controles o valor a ser determinado é a diferença entre as medidas de absorbância: A = (A antígeno - A controle do antígeno) com a amostra diluída como prescrito.

CÁLCULO DO TÍTULO (método α)

1.Fazer a média das diferenças de extinção (ODAg – OD CoAg) do soro referência no início da série (OD Ref1) e no fim da série (OD Ref2).

valor médio ΔE = OD Ref1/ OD Ref2

2.Calcular o fator de correção (f) para as diferenças de extinção dividindo-se o valor teórico pelo valor médio ΔE.

f = valor teórico/ valor médio ΔE

O valor teórico é dado pelo fabricante do kit, de acordo com o lote.

3.Corrigir o resultado do teste multiplicando a diferença de extinção (ΔE) pelo fator de correção (f).

4.Calcular o logaritmo na base 10 do título:

$X = Log_{10} IU/ml = \alpha \times \Delta E^{\beta}$

Os valores de α e β são dados pelo fabricante do kit, de acordo com o lote.

5.Para calcular o título de anticorpos IgG para rubéola acha-se o antilog do valor calculado acima.

$Título\ em\ IU/ml = 10^{X}$

ANEXO III

QUESTIONÁRIO PRÉ-VACINAL

QUESTIONÁRIO PÓS-VACINAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Número de identificação do participante nesta pesquisa

Arte: Multimeios CICT - FIOCRUZ

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO, COM DUAS VACINAS CONTRA FEBRE AMARELA DAS SUBCEPAS 17DD E 17D-213/77 EM CRIANÇAS

QUESTIONÁRIO PRÉ-VACINAL

PREENCHER EM LETRA DE FORMA, POR FAVOR.

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

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

Local da entrevista: _____

1a. Número de identificação do participante nesta pesquisa

Cole aqui a etiqueta de identificação

1b. Data da coleta de sangue PRÉ-vacinal _____ / _____ / _____

1c. Data da vacinação contra febre amarela nesta pesquisa _____ / _____ / _____

1d. Data da coleta de sangue PÓS- vacinal _____ / _____ / _____

2. Qual o nome completo da criança vacinada?

_____

Nome e sobrenome do participante no estudo (sem abreviaturas)

3. Qual o nome completo da mãe da criança ?

_____

Nome da mãe do participante, sem abreviatura

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

_____
Apelido da mãe

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

_____
(Quadra, conjunto, lote, rua, número da casa, apt.)

_____
(Bairro, CEP) *(Ponto de referência)*

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

_____
Telefone para contato

6. Marcar com círculo o sexo da criança

1. Masculino 2. Feminino

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

[ATENÇÃO: *idade em meses em crianças com menos de 2(dois) anos]*

_____
idade

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

_____/_____/_____
dia *mês* *ano*

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

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

9. Qual o peso da criança quando nasceu?
[Ver no cartão da criança, se o peso não estiver disponível, anotar informação da mãe]

_____
Peso em gramas

10. Qual o peso atual da criança ? *[Ver no cartão ou medir o peso da criança]*

_____
Peso em gramas

ANTECEDENTES VACINAIS E PATOLÓGICOS

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

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

11. a. Tomou BCG ? *[Verificar cicatriz vacinal]*

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Indeterminado

Em caso afirmativo,

11. b. Fonte da informação

( ) 1. Cartão de Vacina
( ) 2. Informação da Mãe
( ) 3. Outro *(p.ex., prontuário)*
( ) 4. Cicatriz vacinal

11. c. Data da vacinação (ou idade em que tomou a vacina)
[ou data da última aplicação, caso tenha tomado mais de uma vez]

_____/ _____/_____

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

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Indeterminado

Em caso afirmativo,

12. b. Fonte da informação

( ) 1. Cartão de Vacina
( ) 2. Informação da Mãe
( ) 3. Outro *(p.ex., prontuário)*

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

_____/_____/ _____

13. a. Tomou vacina DTP-Hib *(tetravalente)*?

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Indeterminado

Em caso afirmativo,

13. b. Fonte da informação

( ) 1. Cartão de Vacina
( ) 2. Informação da Mãe
( ) 3. Outro *(p.ex., prontuário)*

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

_____ / _____/ _____

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

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Indeterminado

Em caso afirmativo,

14. b. Fonte da informação

( ) 1. Cartão de Vacina
( ) 2. Informação da Mãe
( ) 3. Outro *(p.ex., prontuário)*

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

_____ / _____/ _____

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

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 3. Indeterminado

15. a. Tomou alguma outra vacina? *[por exemplo, contra raiva, varicela etc.]*

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Indeterminado

Em caso afirmativo,

Quais ?

15.b. _____

nome da outra vacina

15.c. Fonte da informação

( ) 1. Cartão de Vacina
( ) 2. Informação da Mãe
( ) 3. Outro *(p.ex., prontuário)*

15.d. Data da última dose (ou idade em que tomou a última dose)

_____ /_____/_____

15.e. _____

nome da outra vacina

15.f. Fonte da informação

( ) 1. Cartão de Vacina
( ) 2. Informação da Mãe
( ) 3. Outro *(p.ex., prontuário)*

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

_____ /_____/_____

15.h. _____

nome da outra vacina

15. i. Fonte da informação

( ) 1. Cartão de Vacina
( ) 2. Informação da Mãe
( ) 3. Outro *(p.ex., prontuário)*

15. j. Data da última dose *(ou idade em que tomou a última dose)*

_____/_____ / _____

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

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Não sabe

Em caso afirmativo

Quais ?

16.b. _____

nome do soro

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

_____ / _____ / _____

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

_____

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

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Não sabe

Em caso afimativo

Quais? Há quanto tempo?

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

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

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Não sabe

19. Em caso afirmativo, (Preencher o quadro abaixo):

Motivo da internação	Hospital ou clínica onde foi internado	Data da internação	Tempo que ficou internado
A			
B			
C			
D			

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

( ) 1. Sim
( ) 2. Não
( ) 9. Não sabe

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

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

_____

_____

_____

_____

_____

_____

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

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Questionário pós-vacinal

Data da entrevista: _____ / _____ / _____ Entrevistador: _____

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

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

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

Sinal, sintoma ou problemade saúde	Quantos dias após a vacinação, começou?	Quanto tempo durou?	Qual a intensidade? (fraco, médio, forte)	Parou de brincar? Faltou à escola? Ficou de cama?	Procurou médico?	Qual foi o tratamento?
22. **Febre** Indicar a temperatura na coluna "intensidade"?						
23. **Vômitos** (frequência)						
24. **Irritabilidade** (criança) /						
25. **Dores no corpo** (Dores musculares generalizadas)						

Sinal, sintoma ou problemade saúde	Quantos dias após a vacinação, começou?	Quanto tempo durou?	Qual a intensidade? (fraco, médio, forte)	Parou de brincar? Faltou à escola? Ficou de cama?	Procurou médico?	Qual foi o tratamento?
26. **Dor de cabeça**						
27. **Dor no local da** aplicação da vacina contra febre amarela			(limitação funcional)			
28. **Vermelhidão no local** da aplicação da vacina contra febre amarela						
29. **Outros problemas** de saúde quaisquer **						
A. _____ B. _____ C. _____						

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

Observações que não se incluam nos itens acima: _____

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

Onde? _____ Quando? (período de permanência) _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

FIOCRUZ/Ministério da Saúde – Secretaria Municipal de Saúde

Pesquisador Responsável: Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho

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

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

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

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

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

ANEXO IV: CALENDÁRIO BÁSICO DE VACINAÇÃO DA CRIANÇA

IDADE	VACINAS	DOSES	DOENÇAS EVITADAS
Ao nascer	BCG - ID	dose única	Formas graves de tuberculose
	Vacina contra hepatite B (1)	1ª dose	Hepatite B
1 mês	Vacina contra hepatite B	2ª dose	Hepatite B
2 meses	Vacina tetravalente (DTP + Hib) (2)	1ª dose	Difteria, tétano, coqueluche, meningite e outras infecções causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b
	VOP (vacina oral contra pólio)	1ª dose	Poliomielite (paralisia infantil)
	VORH (Vacina Oral de Rotavírus Humano)(3)	1ª dose	Diarréia por Rotavírus
4 meses	Vacina tetravalente (DTP + Hib)	2ª dose	Difteria, tétano, coqueluche, meningite e outras infecções causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b
	VOP (vacina oral contra pólio)	2ª dose	Poliomielite (paralisia infantil)
	VORH (Vacina Oral de Rotavírus Humano)(4)	2ª dose	Diarréia por Rotavírus
6 meses	Vacina tetravalente (DTP + Hib)	3ª dose	Difteria, tétano, coqueluche, meningite e outras infecções causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b
	VOP (vacina oral contra pólio)	3ª dose	Poliomielite (paralisia infantil)
	Vacina contra hepatite B	3ª dose	Hepatite B
9 meses	Vacina contra febre amarela(5)	dose única	Febre amarela
12 meses	SRC (tríplice viral)	dose única	Sarampo, rubéola e caxumba
15 meses	DTP (tríplice bacteriana)	1º reforço	Difteria, tétano e coqueluche
	VOP (vacina oral contra pólio)	reforço	Poliomielite (paralisia infantil)
4 - 6 anos	DTP (tríplice bacteriana)	2º reforço	Difteria, tétano e coqueluche
	SRC (tríplice viral)	reforço	Sarampo, rubéola e caxumba
6 a 10 anos	BCG - ID	reforço	Formas graves de tuberculose
10 anos	Vacina contra febre amarela(5)	reforço	Febre amarela

(1) A primeira dose da vacina contra a hepatite B deve ser administrada na maternidade, nas primeiras 12 horas de vida do recém-nascido. O esquema básico se constitui de 03 (três) doses, com intervalos de 30 dias da primeira para a segunda dose e 180 dias da primeira para a terceira dose. (2) O esquema de vacinação atual é feito aos 2, 4 e 6 meses de idade com a vacina Tetravalente e dois reforços com a Tríplice Bacteriana (DTP). O primeiro reforço aos 15 meses e o segundo entre 4 e 6 anos. (3) É possível administrar a primeira dose da Vacina Oral de Rotavírus Humano a partir de 1 mês e 15 dias a 3 meses e 7 dias de idade (6 a 14 semanas de vida). (4) É possível administrar a segunda dose da Vacina Oral de Rotavírus Humano a partir de 3 meses e 7 dias a 5 meses e 15 dias de idade (14 a 24 semanas de vida). (5) A vacina contra febre amarela está indicada para crianças a partir dos 09 meses de idade, que residem ou que irão viajar para área endêmica (estados: AP, TO, MA MT, MS, RO, AC, RR, AM, PA, GO e DF), área de transição (alguns municípios dos estados: PI, BA, MG, SP, PR, SC e RS) e área de risco potencial (alguns municípios dos estados BA, ES e MG). Se viajar para áreas de risco, vacinar contra Febre Amarela 10 (dez) dias antes da viagem.