Karina Takesaki Miyaji

Persistência de anticorpos neutralizantes anti-febre amarela em pessoas com
60 anos ou mais previamente vacinadas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Dra. Ana Marli Christovam Sartori

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Miyaji, Karina Takesaki

Persistência de anticorpos neutralizantes anti-febre amarela em pessoas com 60 anos ou mais previamente vacinadas / Karina Takesaki Miyaji. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Ana Marli Christovam Sartori.

Descritores: 1.Vacina contra febre amarela 2.Anticorpos neutralizantes
3.Estudos soroepidemiológicos 4.Idoso

USP/FM/DBD-063/15

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tomomi e Kazumi, pela dedicação, amor e ensinamentos, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

Ao meu marido, Evandro, pelo amor e apoio incondicional e por me fazer mais feliz a cada dia.

À minha irmã Patrícia e ao meu cunhado Ricardo, pela amizade, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ana Marli Christovam Sartori, pela paciência e dedicação que me guiaram à conclusão de mais este trabalho. Agradeço pelo exemplo que é para mim desde o meu quarto ano da faculdade de medicina, com seu entusiasmo e brilhantismo que me inspiraram a escolher meu caminho em minha profissão.

À Professora Dra. Marta Heloisa Lopes, pela importante contribuição no desenvolvimento deste projeto e que eu também tenho como exemplo de caráter, dedicação e amor à carreira escolhida.

Ao Professor Dr. Esper Georges Kallás, pela contribuição no desenvolvimento e realização deste projeto, disponibilizando recursos e materiais para a realização de todas as etapas deste trabalho.

À minha amiga Vivian Iida Avelino Silva, pelas ideias, contribuições e pelo auxílio na realização prática deste estudo, além do carinho e da amizade.

À equipe do Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais, que auxiliaram na identificação dos voluntários para esta pesquisa.

À equipe do Centro de Pesquisas Clínicas do Hospital das Clínicas da FMUSP, por auxiliarem na identificação de voluntários e coleta de amostras para realização dos exames laboratoriais.

Às equipes do Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Tecnologia Viroológica, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz e Laboratório de Investigação Médica (LIM) 60, pela realização das análises laboratoriais. Gostaria de agradecer em especial a dra. Marisa A. Hong e à dra. Marisol Simões, pelas explicações e esclarecimentos sobre as técnicas realizadas.

Ao dr. Carlos Roberto de Medeiros e à dra. Patrícia Emília Braga, pela importante contribuição e pela dedicação em me auxiliarem nas análises estatísticas.

Aos voluntários que aceitaram participar da pesquisa, sem os quais ela não seria realizada.

Essa dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed.

São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia.....	1
1.2 Quadro clínico, diagnóstico e tratamento	4
1.3 Vacina de FA.....	5
1.3.1 Composição.....	5
1.3.2 Viremia e imunogenicidade	6
1.3.3 Indicações e contraindicações de vacinação de FA	7
1.3.4 Eventos adversos após vacinação (EAPV)	9
1.4 População idosa.....	10
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3. MÉTODOS	15
3.1 População de estudo.....	15
3.1.1. Critérios de inclusão.....	15
3.1.2. Critérios de exclusão:.....	15
3.2 Cálculo da amostra:.....	16
3.3 Procedimentos do estudo	16
3.4 Métodos laboratoriais:	18
3.5 Análise estatística	19
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMC	Carboximetilcelulose
CMV	Citomegalovírus
CRIE	Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais
DNAV	Doença neurotrópica associada à vacina de febre amarela
DVAV	Doença viscerotrópica associada à vacina de febre amarela
EAPV	Eventos adversos após vacinação
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FA	Febre amarela
GMT	Título médio geométrico
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LNI	Índice de neutralização em logaritmo na base 10
Log	Logaritmo na base 10
NK	Natural killers
OMS	Organização Mundial da Saúde
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas de lise
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th	T helper

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1: Expansão da área de risco de transmissão de FA no Brasil ao longo do tempo.

Figura 2: Área com recomendação de vacinação contra FA nas Américas

Figura 3: Áreas com recomendação de vacinação contra FA na África.

Figura 4: Títulos de anticorpos neutralizantes ($\log_{10}$ mUI/mL) no teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀) e intervalo de tempo decorrido entre a vacinação e a realização da reação sorológica.

Tabela 1: Características demográficas e antecedente de vacinação de febre amarela (FA) dos participantes do estudo com ≥ 60 anos (Grupo 1) e com 18 a 59 anos (Grupo 2).

Tabela 2: Contagem de linfócitos TCD4+ no momento de inclusão ao estudo, entre os participantes com ≥ 60 anos (Grupo 1) e com 18 a 59 anos (Grupo 2).

Tabela 3: Prevalência e títulos de anticorpos (Ac) neutralizantes contra febre amarela (FA) no teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀) entre os participantes ≥ 60 anos (Grupo 1) e com 18 a 59 anos (Grupo 2).

Tabela 4: Características dos nove participantes previamente vacinados contra febre amarela (FA) que apresentaram resultados negativos no teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀).

Tabela 5: Soropositividade no teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀) em pessoas de todas as idades que receberam apenas uma dose da vacina de febre amarela (FA), de acordo com o tempo decorrido desde a vacinação.

Quadro 1: Sumário dos estudos que avaliaram a prevalência de anticorpos após vacinação de febre amarela.

RESUMO

Miyaji KT. ***Persistência de anticorpos neutralizantes anti-febre amarela em pessoas com 60 anos ou mais previamente vacinadas*** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: A Febre Amarela (FA) é uma doença viral aguda endêmica em grande parte do Brasil. A principal medida de prevenção é a vacinação. O presente estudo avaliou a prevalência e os títulos de anticorpos neutralizantes em pessoas com 60 anos ou mais que haviam recebido anteriormente a vacina de FA 17DD, em comparação a adultos saudáveis com 18 a 59 anos. Além disso, foram avaliadas a correlação entre os títulos de anticorpos e o tempo decorrido desde a vacinação, nos participantes que receberam apenas uma dose da vacina, e a prevalência de anticorpos nos vacinados há menos e há mais de dez anos.

MÉTODOS: Os participantes foram recrutados entre pessoas que procuraram o Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) para receber diferentes vacinas e que referiam ter recebido a vacina de FA anteriormente. Os seguintes dados foram coletados: idade, etnia, sexo, número de doses da vacina de FA recebidas, data da última vacinação de FA. Foi realizada contagem de linfócitos TCD4⁺ usando citometria de fluxo. Os anticorpos neutralizantes contra FA foram dosados pelo teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀).

RESULTADOS: Foram incluídos 94 indivíduos, 46 com idade de 60 anos ou mais (Grupo 1) e 48 com 18 a 59 anos (Grupo 2). Não houve diferença

significativa entre os dois grupos na distribuição de gênero, etnia, número de doses de vacina de FA recebidas anteriormente, tempo desde a última dose e contagem de linfócitos TCD4+. Não houve diferença na prevalência de anticorpos neutralizantes anti-FA entre os dois grupos (87% e 93,8% nos Grupos 1 e 2, respectivamente, $p=0,263$). O título médio geométrico (GMT) dos anticorpos neutralizantes foi maior no grupo mais jovem ($3,77 \log_{10}\text{mUI/mL}$) comparado ao grupo mais velho ($3,64 \log_{10}\text{mUI/mL}$) e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,022$). Não foi encontrada correlação entre os títulos de anticorpos neutralizantes e o tempo decorrido desde a vacinação entre os participantes que receberam apenas uma dose de vacina, tendo sido analisados os dois grupos conjuntamente. Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos neutralizantes entre os participantes que receberam apenas uma dose da vacina de FA há mais de 10 anos ou há menos de 10 anos.

CONCLUSÕES: São necessários outros estudos de persistência de anticorpos na população idosa devido à possibilidade de resposta vacinal alterada pela imunosenescência.

Descritores: vacina contra febre amarela, anticorpos neutralizantes, estudos soropidemiológicos, idoso

ABSTRACT

Miyaji KT. ***Persistence of neutralizing antibodies anti-yellow fever in persons aged 60 years and older previously vaccinated*** [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUCTION. Yellow Fever (YF) is an acute viral disease endemic in large parts of Brazil. The main preventive measure is vaccination. This study aimed to assess the prevalence and titers of neutralizing antibodies in persons aged 60 years and older who had previously received YF 17DD vaccine, in comparison to healthy adults aged 18 to 59 years. The study also evaluated the correlation between the antibodies titers and the time elapsed since vaccination, in participants who had received a single dose of the vaccine, and the prevalence of antibodies in participants vaccinated within ten years and more than ten years before enrollment.

METHODS. Participants were recruited among persons who came to the Reference Center for Special Immunobiologicals (Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais, CRIE) of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) to receive any vaccine and who had previously received the YF vaccine. The following data were collected: age, ethnicity, gender, number of YF vaccine doses taken and date of last YF vaccination. CD4 T cells counts were performed using flow cytometry. YF neutralizing antibodies were measured using test of neutralization by 50% reduction of lysis plaques (PRNT₅₀).

RESULTS. Ninety-four subjects were enrolled: 46 persons aged 60 years and older (Group 1) and 48 persons aged 18 to 59 years (Group 2). There was no

significant difference between the groups regarding gender, ethnicity, number of YF vaccine doses previously received, time since the last dose and CD4+T cells count. There was no difference in the prevalence of YF neutralizing antibodies between the groups (87% and 93.8% in Groups 1 and 2, respectively, $p=0.263$). The log-transformed Geometric Mean Titer (GMT) of YF neutralizing antibodies was higher in the younger group ($3.77 \log_{10}\text{mUI/mL}$) in comparison to the older group ($3.64 \log_{10}\text{mUI/mL}$), and this difference was statistically significant ($p=0.022$). There was no correlation between YF neutralizing antibodies titers and time elapsed since vaccination among the participants who had previously received a single dose of YF vaccine, with the two groups analyzed together. There was no significant difference in the prevalence of neutralizing antibodies among participants who received a single dose of YF vaccine within ten years or more than 10 years before enrollment.

CONCLUSIONS. Further studies on antibodies persistence in the elderly are necessary, considering the possibility of compromised immune response to vaccines due to immunosenescence.

Descriptors: yellow fever vaccine; antibodies, neutralizing; seroepidemiologic studies; aged.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A Febre Amarela (FA) é uma doença aguda causada por um RNA vírus da família *Flaviviridae*¹. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram cerca de 200.000 casos e 30.000 óbitos por ano². As regiões com risco de transmissão da doença são as áreas tropicais da África, responsável por 90% dos casos, e das Américas.

A transmissão ocorre em três ciclos: urbano, intermediário e silvestre. No ciclo urbano, o propagador da doença é o próprio homem e o vetor é o mosquito *Aedes aegypti*. O ciclo intermediário ocorre em vilas rurais na África e os vírus são transmitidos por espécies de *Aedes spp* que se alimentam de humanos e primatas não-humanos. No ciclo silvestre, o vírus é transmitido por mosquitos *Haemagogus sp* e *Sabethes sp* e os propagadores são os primatas não-humanos; nestes casos os humanos são infectados quando entram na floresta ou em áreas rurais. Na África ocorrem os três ciclos e nas Américas predomina o ciclo silvestre, sendo que o último ciclo urbano, neste continente, ocorreu no Paraguai, em 2008, 45 anos após o anterior (Trinidad em 1954)¹.

O crescimento das cidades e a infestação por *Aedes aegypti* constituem fatores de risco para a ocorrência de surtos especialmente em áreas urbanas próximas a florestas. Desde o início dos anos 2000, vem ocorrendo aumento da área de transmissão de FA nas Américas; no Brasil, para leste e sul (figura 1) e no Peru para noroeste (figura 2)^{3,4}. A figura 3 mostra as áreas endêmicas para FA na África.

Figura 1: Expansão da área de risco de transmissão de FA no Brasil ao longo do tempo⁵⁻⁷ (Ministério da Saúde, 1999; 2003; 2009; 2011).

Figura 2: Área com recomendação de vacinação contra FA nas Américas (CDC, atualizado em 23 de janeiro de 2015)⁴.

Figura 3: Áreas com recomendação de vacinação contra FA na África. (CDC, atualizado em 23 de janeiro de 2015)⁴.

A FA é uma doença de notificação compulsória no Brasil. Em 2008 ocorreu um aumento significativo do número de casos confirmados de FA, sendo que em 2007 foram notificados 11 casos e em 2008 foram 46 casos. Em 2009, São Paulo e Rio Grande do Sul, áreas até então consideradas livres da circulação do vírus, foram os principais responsáveis pelo aumento dos casos da doença e pela expansão da área de recomendação de vacinação, com 28 e 16 casos respectivamente. Em 2008 foram registrados 25 óbitos por FA em todo o país e em 2009 foram 17 óbitos.

1.2 Quadro clínico, diagnóstico e tratamento

A FA tem um período de incubação de 3 a 6 dias. O quadro clínico varia de formas assintomáticas ou oligossintomáticas até formas graves. A letalidade é

de 5 a 10% do total de casos sintomáticos, podendo chegar a 50% nas formas graves⁸. Os sintomas iniciais mais frequentes são: cefaleia, mialgia e febre. Na maioria dos casos ocorre resolução do quadro nesta fase. Os casos graves evoluem com fraqueza, prostração, vômitos, icterícia e hemorragia. Acometimento de outros órgãos, além do fígado, é frequente nos casos mais graves: miocardite, necrose tubular aguda, edema cerebral e encefalopatia¹.

O diagnóstico definitivo de FA é feito através da detecção do vírus ou do genoma viral. Os métodos utilizados são: isolamento viral em cultura de células e reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR). Métodos sorológicos, como captura de IgM e teste de inibição de hemaglutinação em amostras pareadas, podem ser utilizados associados ao quadro clínico e dados epidemiológicos^{1,9}.

Não há tratamento específico para FA e os cuidados com o doente incluem medicações para controle dos sintomas e medidas de suporte em terapia intensiva para os casos graves. A principal medida de prevenção da FA é a vacinação¹.

1.3 Vacina de FA

1.3.1 Composição

A primeira vacina de FA utilizada, neurotrópica francesa, foi desenvolvida em 1930 e era produzida através inoculação de vírus FA em cérebro de camundongo, que posteriormente era removido e liofilizado. Essa vacina foi descontinuada em 1982 devido à alta incidência de meningoencefalite associada à vacinação, que ocorria em 3% a 4% dos vacinados, com letalidade de até 40%, principalmente em crianças¹⁰. As vacinas utilizadas atualmente

foram desenvolvidas pela atenuação do vírus da FA selvagem isolado de um paciente chamado Asibi, que sobreviveu à doença, em Gana, em 1927. Através de múltiplas passagens em cultura de células de camundongo e galinha, originou-se a cepa 17D e, desta, duas linhagens utilizadas atualmente para produção de vacinas: 17DD e 17D-204. No início de 1937 foram conduzidos estudos no Brasil com vacinação de grande número de pessoas e em 1938 ocorreu a primeira grande campanha de vacinação de FA no país¹⁰. Todas as vacinas comercializadas atualmente são compostas por vírus vivos atenuados cultivados em ovos embrionados de galinha, e formuladas em pó liofilizado. Além disso, contêm também aditivos estabilizantes e sais, que variam de acordo com o produtor. A via de administração da vacina é a subcutânea, na dose de 0,5mL. A quantidade mínima de vírus é de 10.000PFU, sendo que as vacinas contêm cinco a 50 vezes a quantidade mínima devido a perdas durante o armazenamento¹⁰.

Nos serviços públicos brasileiros, é utilizada a vacina produzida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, composta pela subcepa 17DD atenuada, cultivada em ovos embrionados de galinha e livre de agentes patogênicos. Os excipientes contidos na vacina são: glutamato de sódio, sorbitol, gelatina bovina hidrolisada, eritromicina e canamicina. A vacina é diluída em água para injeção e aplicada por via subcutânea^{8,11}.

1.3.2 Viremia e imunogenicidade

Devido ao fato de a vacina ser composta por vírus vivos atenuados, o mesmo pode ser isolado de sangue de indivíduos vacinados. A viremia ocorre entre três e sete dias após a vacinação e tem duração de um a três dias¹⁰.

A resposta à vacinação de FA é precoce, sendo que nos primeiros dias ocorre ativação da resposta imune inata, com pico no sétimo dia, resultando em ação de células *Natural Killers* (NK), interferon e complemento. Além da expressão de moléculas antivirais protetoras, há estimulação do sistema imune adaptativo, com resposta Th1, Th2, produção de células CD4+ de memória e persistência de células B. A vacina de FA é altamente imunogênica, sendo que 80% a 100% dos vacinados desenvolve anticorpos neutralizantes dez dias após a vacinação e >99% dos vacinados, 28 dias após receberem a vacina^{10,12}. Não há estudos em humanos determinando correlatos de proteção da vacina de FA. Um estudo em macacos, no qual os animais foram vacinados com a vacina de FA 17D e posteriormente inoculados com vírus da FA Asibi, demonstrou que índice de neutralização em $\log_{10}$ (LNI) maiores que 0,7 são fortemente associados à proteção¹³. O índice de neutralização é a diferença dos títulos de anticorpos pré e pós-vacinação, obtidos pelo teste de neutralização em placa^{10,13,14}.

1.3.3 Indicações e contraindicações de vacinação de FA

A vacinação de FA é indicada para residentes de áreas endêmicas para a doença; viajantes que se deslocam para tais regiões; e viajantes provenientes de áreas endêmicas que irão para áreas livres da doença, porém nas quais existem vetores, a fim de evitar a introdução do vírus^{8,15}.

Como a vacina de FA é composta por vírus vivos atenuados e o controle da replicação viral depende do funcionamento adequado do sistema imune, ela é contraindicada em pessoas com imunodepressão grave: portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) sintomáticos, portadores de HIV

assintomáticos com contagem de linfócitos TCD4+ menor que 200 células/mm³, pessoas com neoplasias, transplantados de células tronco-hematopoiéticas e órgãos sólidos, doenças de timo, uso de drogas imunossupressoras ou imunomoduladoras, radioterapia atual ou recente, imunodeficiências congênitas. Além dos imunocomprometidos, não devem ser vacinadas as crianças menores de seis meses de idade e pessoas com hipersensibilidade grave a ovo ou a qualquer componente da vacina. Mulheres que estão amamentando não devem ser vacinadas, devido à possibilidade de transmissão do vírus vacinal pelo leite materno¹⁶. Nestes casos, a vacinação deve ser adiada ou a mãe deve ser orientada a suspender a amamentação por 14 dias. Deve haver precaução na vacinação de gestantes, portadores de HIV assintomáticos com contagem de linfócitos TCD4+ maior que 200 células/mm³ e pessoas com mais de 60 anos de idade. Nestes casos, os riscos de aquisição da doença e a ocorrência de eventos adversos relacionados à vacinação devem ser considerados para a tomada de decisão. Crianças entre seis e nove meses de idade podem ser vacinadas em situações de epidemia^{2,8}.

A OMS recomenda, atualmente, dose única de vacina de FA devido a evidências de que a proteção seja duradoura². No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde passou a recomendar, a partir de março de 2014, para residentes ou viajantes para áreas endêmicas, uma dose de vacina de FA aos 9 meses com reforço aos 4 anos. Para as pessoas acima de 4 anos de idade, está recomendada apenas uma dose de reforço com intervalo mínimo de 10 anos da primeira dose¹⁷. Apesar dessas mudanças na recomendação do número de doses de vacina de FA, o Certificado Internacional de Vacinação ou Profilaxia ainda é válido por 10 anos, sendo que

viajantes internacionais necessitam de nova dose de vacina e novo comprovante passado este período².

1.3.4 Eventos adversos após vacinação (EAPV)

Eventos adversos leves são associados à vacina de FA, sendo os mais frequentes: febre, cefaleia, mialgia, desconforto no local da aplicação, prurido, urticária e exantema. Tais manifestações são relatadas em até 25% dos vacinados^{10,18}.

Eventos adversos graves associados à vacina de FA são: reação anafilática, doença neurotrópica e doença viscerotrópica associadas à vacina¹⁰.

1.3.4.1 Reação anafilática

A ocorrência de reações graves de hipersensibilidade imediata é estimada em 2,2/100.000 doses aplicadas. É mais comum em pessoas com antecedente de alergia grave a ovo ou gelatina².

1.3.4.2 Doença neurológica associada à vacina de FA (DNAV)

A DNAV compreende alterações neurológicas associadas diretamente à invasão do Sistema Nervoso Central (SNC) pelo vírus vacinal resultando em meningite e/ou encefalite (doença neurotrópica), e manifestações autoimunes associadas à vacinação, como Síndrome de Guillain-Barré ou encefalomielite disseminada aguda. Apesar de ser um evento adverso grave, em geral apresenta boa evolução, com letalidade menor que 5%. Ocorre de dois a 30

dias após a vacinação. A ocorrência da DNAV é estimada em 0,8/100.000 doses aplicadas^{2,18,19}.

1.3.4.3 Doença viscerotrópica associada à vacina de FA (DVAV)

A DVAV é decorrente da disseminação do vírus vacinal, sendo o quadro clínico semelhante ao da doença causada pelo vírus selvagem. A incidência de DVAV é estimada em 0,3 a 0,4/100.000 doses aplicadas^{2,12,18}. Os potenciais fatores de risco para ocorrência de DVAV são: primovacinação, idade maior que 60 anos e história prévia de doença do timo. Não há evidência de mutação do vírus vacinal isolados de pessoas com DVAV¹⁹.

No Brasil, um estudo conduzido por Menezes et al.²⁰, 2010, baseado no Sistema Nacional de Vigilância de Eventos Adversos Relacionados à Vacinação, estimou as incidências de EAPV graves com os seguintes resultados: hipersensibilidade 0,9/100,000 doses; choque anafilático 0,023/100,000 doses; DNAV 0,084/100,000 doses; e DVAV 0,019/100,000 doses.

1.4 População idosa

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), nos últimos anos, o Brasil vem apresentando um crescimento progressivo da expectativa de vida ao nascimento, que em 2013 era de 74,9 anos²¹. Vários fatores contribuíram para este aumento, entre eles as melhorias em diagnósticos, tratamento e prevenção de doenças, nas quais se inclui a vacinação.

Com o envelhecimento, ocorrem alterações do sistema imune, a imunosenescência. Há diminuição da capacidade proliferativa das células tronco hematopoiéticas, diminuição de precursores linfoides e aumento de mieloides. Como consequência, ocorre diminuição quantitativa e qualitativa das células apresentadoras de antígenos: diminuição da expressão de receptores, da capacidade de migração para linfonodos regionais e da capacidade de ativação celular completa. Os motivos exatos da alteração da capacidade proliferativa ainda não são conhecidos, aparentemente estão relacionados a danos no DNA, encurtamento de telômeros e inflamação crônica relacionada à idade. A resposta imune adaptativa também é afetada pelo envelhecimento: ocorre involução do timo com consequente diminuição de linfócitos T e B *naïve*, sendo a população de linfócitos composta por células de memória e efetoras altamente diferenciadas, o que leva a menor variedade de receptores, diminuindo a capacidade de resposta a novos antígenos, incluindo os vacinais. Infecções crônicas, como por citomegalovírus (CMV) levam a expansão clonal de linfócitos T CD8+ específicas, diminuição de outras linhagens (CD25+CD8+) responsáveis pela resposta humoral, diminuindo a capacidade de resposta a novos antígenos, que pode significar menor resposta dos idosos à primovacinação^{22,23}.

Além da resposta alterada à vacinação, a idade avançada constitui um fator de risco para eventos adversos graves associados à vacina de FA, em especial DNAV e DVAV. Foi realizada uma análise dos casos de eventos adversos associados à vacina de FA relatados nos EUA, de 2000 a 2006, considerando graves um dos seguintes desfechos: óbito, doença com risco de óbito, hospitalização ou prolongamento de internação preexistente, deficiência

permanente, DNAV e DVAV. Foi encontrada incidência de eventos graves de 8,3/100.000 em pessoas com mais de 60 anos, sendo 1,8/100.000 de DNAV e 0,8/100.000 de DVAV. Estas taxas são mais elevadas em relação às incidências gerais: 4,7/100.000, 0,8/100.000 e 0,4/100.000, respectivamente¹⁸.

Um estudo avaliou ativamente a frequência de eventos adversos em pessoas com 60 anos ou mais que receberam vacina de FA no CRIE HCFMUSP. Foram contatadas 700 pessoas das 828 que receberam vacina de FA no período de março de 2009 a abril de 2010 e destes, 107 relataram algum evento adverso, sendo 97 sistêmicos e 17 locais (sete apresentaram ambos). Não foi encontrado nenhum evento adverso grave relacionado à vacina de FA nesta população, o que era esperado, considerando a baixa incidência de tais eventos e o tamanho da amostra²⁴.

Até o presente momento, todos os casos relatados de eventos adversos neurotrópicos e viscerotrópicos ocorreram após a primovacinação².

1.5. Justificativa para o presente estudo

A FA constitui um importante problema de saúde pública no Brasil e a vacinação é a principal medida de prevenção. Houve expansão da área de recomendação de vacinação nos últimos anos, incluindo áreas anteriormente não endêmicas para FA, nas quais ocorreram campanhas de vacinação em massa devido a surtos da doença e a vacina de FA passou a ser incluída no calendário vacinal de rotina. Neste cenário, pessoas com idade mais avançada passaram a ter recomendação de receber a primeira dose de vacina de FA.

Outro fato importante é a atual recomendação da OMS de dose única de vacina de FA baseada em estudos envolvendo adultos saudáveis.

Considerando-se o aumento progressivo da população idosa no Brasil e as consequências do envelhecimento na imunidade e na resposta à vacinação, em especial na primovacinação, são necessários estudos para avaliar a duração da proteção conferida pelas vacinas nesta população.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a persistência de anticorpos neutralizantes contra FA em adultos saudáveis previamente vacinados.

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliar a prevalência de anticorpos neutralizantes em indivíduos saudáveis com 60 anos ou mais previamente vacinados contra Febre Amarela 17DD.

2.2.2 Avaliar os títulos de anticorpos neutralizantes em indivíduos saudáveis com 60 anos ou mais previamente vacinados contra Febre Amarela 17DD.

2.2.3 Comparar a prevalência de anticorpos neutralizantes em indivíduos com 60 anos ou mais e em adultos saudáveis com menos de 60 anos.

2.2.4 Comparar os títulos de anticorpos neutralizantes em indivíduos com 60 anos ou mais e em adultos saudáveis com menos de 60 anos.

2.2.5 Estimar e comparar a prevalência de anticorpos em adultos de todas as idades que receberam uma única dose da vacina de FA nos últimos dez anos e naquelas com apenas uma dose há mais de dez anos.

2.2.6 Avaliar a correlação entre os títulos de anticorpos e o tempo decorrente desde a vacinação em adultos de todas as idades que receberam uma única dose da vacina de febre amarela durante a vida.

3. MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional que avaliou títulos de anticorpos neutralizantes contra FA em adultos previamente vacinados.

3.1 População de estudo

3.1.1. Critérios de inclusão

- Ter idade de 18 anos ou mais;
- Ter recebido previamente a vacina de FA, sem limite de tempo entre a vacinação e a inclusão e sem limite de número de doses prévias.

3.1.2. Critérios de exclusão:

- Doenças associadas à imunodepressão: doenças do baço ou timo, transplante de órgãos sólidos ou medula óssea, imunodeficiências primárias;
- Reações sorológicas para HIV/aids positivas ou indeterminada;
- Doenças autoimunes;
- Neoplasias prévia ou atual (mesmo em remissão e sem tratamento quimioterápico);
- *Diabetes Mellitus*;
- Hepatopatia ou nefropatia crônica;
- Uso de drogas imunossupressoras ou corticosteroides sistêmicos nos últimos três meses;

- Gestação atual;
- Doença febril aguda atual;
- Incapacidade de compreender o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Qualquer outra condição que a julgamento do investigador poderia vir a prejudicar os procedimentos de estudo.

Os participantes do estudo foram divididos em dois grupos: Grupo 1: pessoas com 60 anos ou mais e, Grupo 2: pessoas de 18 a 59 anos de idade.

3.2 Cálculo da amostra:

Anticorpos neutralizantes podem ser detectados em 80,6% dos indivíduos com histórico de vacinação há mais de 30 anos e sem retorno a área endêmica²⁵. Num ensaio clínico com a vacina 17DD, o percentual máximo de soroconversão foi de 99,5%²⁶. Portanto, o cálculo de tamanho amostral considerou um intervalo de confiança compreendido entre 80,6% e 99,5%, sendo esperada soroprevalência semelhante a esse valor em ambos os grupos avaliados. Assim, utilizando 90% como prevalência estimada para cada grupo e um intervalo de confiança de 95%, foi estimada amostra de 39 voluntários em cada grupo.

3.3 Procedimentos do estudo

Os participantes foram recrutados entre profissionais de saúde e pessoas que procuraram espontaneamente o Centro de Referência para

Imunobiológicos Especiais (CRIE) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) para receber diferentes vacinas e que apresentaram história prévia de vacinação contra FA. Os voluntários foram incluídos no estudo após explicação sobre os procedimentos, checagem dos critérios de inclusão e exclusão, leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foi aplicado questionário aos participantes, com coleta dos seguintes dados:

- Data de nascimento
- Etnia
- Gênero
- Número de doses da vacina de FA recebidas
- Data da última vacinação de FA
- História médica (patologias e medicações em uso)
- Exame físico

Após o questionário, foi coletada amostra de sangue para realização das análises laboratoriais e teste rápido para HIV (Abbott Determine™ HIV-1/2 e SD Bioline HIV 1/2 fast 3.0). Soros reagentes nos dois testes foram considerados positivos, soros não reagentes nos dois testes foram considerados negativos e resultados discordantes nos dois testes foram considerados indeterminados.

Todas as mulheres em idade fértil incluídas no estudo foram submetidas a teste de gravidez com dosagem de Gonadodrofina Coriônica humana (ABON™ hCG) em urina.

3.4 Métodos laboratoriais:

Os títulos de anticorpos neutralizantes contra FA foram determinados pelo teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀) em monocamadas de células Vero, realizado no Laboratório de Tecnologia Viroológica, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz. O PRNT é considerado o teste mais sensível e mais específico para febre amarela²⁷ produzindo resultados quantitativos (em Unidades Internacionais). O PRNT₅₀ foi realizado em placas de 96 orifícios, conforme previamente descrito²⁸, usando diluições seriadas do soro, desde 1:5 até 1:640, e 30 unidades formadoras de placa (PFU) do vírus de FA da cepa 17D. Foi utilizado como referência um soro padrão proveniente de macaco Rhesus. Esse soro foi previamente calibrado frente a um soro de referência internacional da OMS e a calibração foi repetida a cada dez amostras testadas. A mistura de soro e vírus foi incubada por 1h à temperatura ambiente e, em seguida foi adicionada uma suspensão de células Vero. Depois de um período de 3 horas de incubação, as células foram cobertas com meio semissólido contendo carboximetilcelulose (CMC) e incubadas por sete dias a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, a monocamada celular foi fixada com formaldeído a 10% e corada com cristal violeta 0,04%. As placas de lise foram contadas utilizando um projetor de diapositivo adaptado. Para a determinação dos títulos de anticorpos, primeiramente foi calculado o *endpoint* do teste, que é o ponto que reduz em 50% o número de placas de lise obtido na amostra contendo somente o controle de vírus. A diluição em que ocorreu 50% de redução do número de placas de lise foi estimada através de regressão linear, usando os valores das recíprocas das diluições e os números de placas imediatamente

inferior e superior a 50%. O título médio do soro padrão permitiu a determinação das unidades internacionais de proteção contidas em cada amostra. Foi considerado 794 mUI/mL (equivalente a $2.9 \log_{10}$ mUI/mL ou 1:50) como cut-off, sendo valores abaixo destes considerados soronegativos para FA²⁸ (Simões et al.; 2012).

A contagem de linfócitos TCD4+ foi realizada pelo método de citometria de fluxo, utilizando o aparelho BD FACSCalibur™ e o programa MultiSet™. Neste método, a amostra de sangue de cada voluntário é adicionada ao reagente MULTITEST™, que contém anticorpos monoclonais marcados com fluocromos que se ligam aos receptores CD3, CD4, CD8 e CD45 das células. Após incubação, a amostra é colocada no aparelho BD FACSCalibur™. As partículas marcadas por fluorescência são interceptadas pelo laser do aparelho, que fornece informações sobre a intensidade da fluorescência, tamanho e forma da partícula. Todas essas informações são processadas pelo programa MultiSet™, que fornece os números absolutos e relativos de cada subpopulação de células^{29,30}.

3.5 Análise estatística

As variáveis contínuas (idade, intervalo de tempo entre a vacinação e a inclusão no estudo, contagem de linfócitos TCD4+ e títulos de anticorpos neutralizantes contra FA) foram descritas com média, mediana, mínima e máxima. As variáveis categóricas (gênero, etnia, número de doses prévias de vacina de FA e positividade da reação sorológica para FA) foram descritas com

frequências de distribuição. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram transformados em log10 para a análise.

Foi realizado teste de Qui-quadrado (χ^2) para comparações entre os grupos das variáveis categóricas (gênero, etnia, número de doses prévias da vacina de FA [1 ou ≥ 2] e frequência de positividade na reação sorológica para FA, PRNT). Para a comparação das variáveis contínuas (tempo entre vacinação e inclusão no estudo, a contagem de linfócitos TCD4+ e títulos de anticorpos neutralizantes contra FA), foi realizado teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para variáveis com distribuição normal, foi utilizado teste de Levene de igualdade das variâncias e t-student para avaliação de diferença entre os grupos. Para variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado teste não-paramétrico Mann-Whitney. Para avaliar a existência de correlação entre títulos de anticorpos e o tempo decorrido desde a vacinação em pessoas que receberam apenas uma dose da vacina de febre amarela durante a vida, foi utilizado o teste de Spearman. Para comparar a soropositividade em pessoas que receberam apenas uma dose da vacina de febre amarela nos últimos dez anos e naquelas que receberam apenas uma dose da vacina há mais de dez anos, foi utilizado teste exato de Fisher.

A análise foi realizada utilizando os programas Microsoft Excel 2010, SPSS versão 15.0 e EpiInfo7. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas cujo valor de p foi inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

No período de 04/11/2010 a 22/02/2013, foram incluídos no estudo 94 indivíduos, sendo 46 no grupo 1 (60 anos ou mais) e 48 no grupo 2 (18 a 59 anos). A tabela 1 mostra as características da população estudada. Não houve diferença estatisticamente significativa da distribuição de gênero ($p=0,204$) e etnia branca e não-branca ($p=0,131$) entre os dois grupos. Em relação à vacinação prévia, não houve diferença entre os grupos quanto ao número de doses recebidas ($p=0,146$) e ao tempo entre a última dose e a inclusão no estudo ($p=0,108$). Do total de participantes, quatro (dois de cada grupo) apresentaram apenas relato verbal de vacinação prévia, porém a informação foi considerada confiável. Três destes sabiam informar as circunstâncias exatas de aplicação da vacina (ano, e motivo da vacinação). Nenhum deles residia em área endêmica.

A média de idade na data da última vacinação foi de 65,3 anos (mínimo, 50 e máximo, 83,1) no Grupo 1 e de 29,3 anos (mínimo, 10,6 e máximo, 54,5) no Grupo 2. Dez de 46 (21,7%) indivíduos com 60 anos ou mais e 14 (29,2%) das pessoas de 18 a 59 anos haviam sido vacinados mais de 10 anos antes da inclusão no estudo. No grupo 1 (≥ 60 anos), oito (17,4%) haviam sido vacinados antes de completar 60 anos, sendo 50 anos a idade mínima no momento da vacinação dos sujeitos deste grupo.

Tabela 1: Características demográficas e antecedente de vacinação de febre amarela (FA) dos participantes do estudo com ≥ 60 anos (Grupo 1) e com 18 a 59 anos (Grupo 2).

	<u>Grupo 1</u>	<u>Grupo 2</u>	
	(≥ 60 anos)	(18 – 59 anos)	P
	n=46 (%)	n=48 (%)	
Idade			
Média (Desvio Padrão)	70 (6,5)	35,6 (9,9)	-
Mediana (Min. – Máx.)	68,5 (60 – 85)	33 (20 – 58)	
Sexo			
Masculino	16 (35,8)	11 (22,9)	0,204
Feminino	30 (65,2)	37 (77,1)	
Etnia			
Branca	30 (65,2)	38 (79,2)	0,131*
Negra	7 (15,2)	3 (6,3)	
Amarela	5 (10,9)	4 (8,3)	
Parda	3 (6,5)	3 (6,3)	
Indígena	1(2,2)	0	
Número de doses prévias da vacina de FA (n=76)			
1	23 (50)	36 (75)	0,146
≥2	10 (21,7)	7 (14,6)	
Ignorado	13 (28,3)	5 (10,4)	
Intervalo de Tempo entre a última dose de vacina e a inclusão no estudo (meses) (n=93)			
Média (Desvio Padrão)	60,9 (52,3)	80,2 (57,1)	0,108
Mediana (Min. – Máx.)	40,0 (3,4 – 232,3)	69,3 (1,7 – 246,3)	

*Análise realizada comparando brancos e não-brancos.

Em relação à contagem de linfócitos TCD4+ no momento de inclusão ao estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,275$), como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Contagem de linfócitos TCD4+ no momento de inclusão ao estudo, entre os participantes com ≥ 60 anos (Grupo 1) e com 18 a 59 anos (Grupo 2).

	Grupo 1	Grupo 2	
	(≥ 60 anos)	(18 – 59 anos)	P
	n=45	n=45	
Contagem de linfócitos TCD4+ (células/mm³)			
Média (Desvio Padrão)	1091 (414)	1181 (306)	0,275
Mediana (Mín. – Máx.)	1096 (517 – 2283)	1144 (669 – 1893)	

A tabela 3 mostra a frequência de positividade na reação sorológica para FA e os títulos de anticorpos neutralizantes contra FA nos dois grupos.

Tabela 3: Prevalência e títulos de anticorpos (Ac) neutralizantes contra febre amarela (FA) no teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀) entre os participantes ≥ 60 anos (Grupo 1) e com 18 a 59 anos (Grupo 2).

	Grupo 1	Grupo 2	
	(≥ 60 anos)	(18 – 59 anos)	P
	n=46 (%)	n=48 (%)	
Soroprevalência de Ac neutralizantes anti-FA, mUI/mL[#]			
Positivo	40 (87)	45 (93,8)	0,263
Negativo	6 (13)	3 (6,3)	
Títulos de Ac neutralizantes (log₁₀mUI/mL) (n=88)			
Média (Desvio Padrão)	3,44 (0,43)	3,64 (0,36)	0,022
Mediana (Mín. – Máx.)	3,48 (2,38 – 4,28)	3,67 (2,77 – 4,27)	

Cutoff=794mUI/mL, equivalente a 2.9 log₁₀mUI/mL.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na soropositividade para anticorpos neutralizantes anti-FA, porém os títulos de anticorpos neutralizantes foram maiores no grupo 2 (18 a 59 anos) quando comparado ao grupo 1 (60 anos ou mais), diferença estatisticamente significativa ($p=0,022$).

Nove sujeitos apresentaram títulos de anticorpos contra FA abaixo do cut off (794mUI/ml), sendo seis com 60 anos ou mais (média de 560mUI/mL) e três do grupo 2 (média não calculada pois dois tiveram resultado abaixo do limite inferior do teste que é de 210mUI/mL). Todos os soronegativos tinham comprovante de vacinação prévia (Tabela 4). Dos idosos soronegativos, cinco haviam recebido a vacina há menos de 10 anos (média de 26,7 meses) e um havia sido vacinado há mais de 10 anos (145,4 meses). Ainda em relação aos idosos, um havia recebido duas doses de vacina de FA previamente e outra não sabia referir o número de doses prévias. Entre os participantes soronegativos do Grupo 2 (18 a 59 anos), apenas um havia recebido a vacina há menos de 10 anos (16,3 meses e título de anticorpos <210mUI/ml) e dois haviam recebido há mais de 10 anos (média de 141,6 meses; média de títulos de anticorpos não calculada pois um apresentou títulos <210mUI/ml).

Tabela 4: Características dos nove participantes previamente vacinados contra febre amarela (FA) que apresentaram resultados negativos no teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀).

Voluntário	Idade atual / idade na vacinação	Sexo	Nº de doses prévias*	Tempo decorrido desde a última vacinação (meses)
1	68 / 64,89	F	1	40,23
2	81 / 78,25	F	1	40,03
3	69 / 68,75	F	2**	3,40
4	68 / 66,46	M	1	24,30
5	65 / 63,22	F	1	22,33
6	70 / 58,73	F	Ignorado	145,37
7	45 / 44,10	F	1	16,63
8	37 / 25,05	F	1	141,87
9	33 / 21,16	F	1	141,40

*Todos apresentavam comprovante de vacinação da última dose.

** Apresentava somente comprovante da última vacinação.

Vinte e quatro participantes haviam recebido a última dose de vacina há mais de 10 anos, sendo 10 do grupo 1 (com 60 anos ou mais) e 14 do grupo 2 (18 a 59 anos). Destes, três apresentaram sorologia negativa para FA, dois do grupo 2, os quais haviam recebido apenas uma dose prévia da vacina, e um do grupo de idosos, que não sabia referir quantas doses de vacina havia recebido, além da registrada em cartão.

Na análise de todos os sujeitos que haviam recebido apenas uma dose de vacina de FA na vida (n=54), não foi encontrada correlação entre o tempo decorrido desde a vacinação e os títulos de anticorpos neutralizantes

(coeficiente de correlação $\rho_{\text{Spearman}} = -0,0804$, $p=0,56$), como mostrado na Figura 4.

Figura 4: Títulos de anticorpos neutralizantes ($\log_{10}$ mUI/mL) no teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT_{50}) e intervalo de tempo decorrido entre a vacinação e a realização da reação sorológica.

Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na soropositividade entre os participantes de todas as idades que receberam apenas uma dose da vacina de FA há mais de 10 anos ($n=13$) ou há menos de 10 anos ($n=46$) ($p=0,9723$), como apresentado na tabela 5.

Tabela 5: Soropositividade no teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀) em pessoas de todas as idades que receberam apenas uma dose da vacina de febre amarela (FA), de acordo com o tempo decorrido desde a vacinação.

Soropositividade [#]	Tempo decorrido desde a última vacinação		<i>p</i>
	≤10anos n=46 (%)	>10 anos n=13 (%)	
Positivo	41 (89,1)	11 (84,6)	0,9723
Negativo	5 (10,9)	2 (15,4)	

Cutoff=794mUI/mL, equivalente a 2.9 log₁₀mUI/mL

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou 94 adultos saudáveis vacinados previamente contra FA: 46 pessoas com 60 anos ou mais e 48 adultos com 18 a 59 anos de idade. Não houve diferença entre os dois grupos quanto ao tempo decorrido desde a última vacinação. Os dois grupos também não diferiram quanto à soroprevalência de anticorpos anti-FA, porém foi encontrada diferença estatisticamente significativa dos GMT dos anticorpos neutralizantes, que foi menor no grupo de pessoas com 60 anos ou mais. A importância clínica desta diferença de títulos de anticorpos não é conhecida.

Alguns estudos avaliaram a soroconversão após vacinação de idosos. Um destes estudos é o de Rouken e cols., 2011³¹, que comparou os títulos de anticorpos neutralizantes entre pessoas de 60 a 81 anos (mediana de idade de 66 anos) e jovens de 18 a 28 anos (mediana de idade de 21 anos) antes da vacinação, dez e 28 dias após a vacinação de FA. O método utilizado foi uma variação do teste de neutralização por redução das placas de lise e títulos de anticorpos neutralizantes $\geq 0,5$ UI/mL foram considerados protetores. A frequência de soroproteção encontrada nos idosos, dez dias após a vacinação, foi de 50%, enquanto nos jovens foi de 77%. O GMT foi em média 1,7 UI/mL mais baixos nos idosos, quando comparados aos jovens. Entretanto, 28 dias após a vacinação, não havia diferença na proporção de soropositivos e nos títulos de anticorpos (GMT) entre os dois grupos, demonstrando que a resposta à vacina de FA nos idosos é mais lenta, porém não inferior quando comparada

aos indivíduos mais jovens. A persistência de anticorpos a médio e longo prazo não foi avaliada.

Outro estudo foi o de Monath e cols, 2005³², que compararam a imunogenicidade da vacina de FA em jovens de 18 a 44 anos de idade e pessoas com 60 anos ou mais que receberam apenas uma dose de vacina. Neste estudo foi utilizado uma variação do teste de redução das placas de lise (*constant serum-varying virus plaque-reduction test*) para quantificação dos anticorpos e foi considerada soroconversão resultados com índice de neutralização em log10 (LNI, que é a diferença dos títulos pré e pós vacinação) iguais ou superiores a 0,7, 30 dias após a vacinação. Não houve diferença de soroconversão e GMT entre os dois grupos. Este estudo também não avaliou a persistência de anticorpos a longo prazo. Baseado nos resultados destes trabalhos, não há diferença de soroconversão, a curto prazo, após a vacinação de FA entre jovens e idosos.

Em relação à persistência de anticorpos, Gotuzzo e cols., 2013³³, realizaram uma revisão sistemática da eficácia, duração da proteção da vacina de FA, bem como da necessidade de doses de reforço a cada 10 anos³³ e encontraram alta persistência de anticorpos em indivíduos saudáveis, sendo descrito >90% de soropositividade após 20 anos e até 80% até 35 anos após a vacinação, porém há poucos estudos em populações idosas. O quadro 1 mostra as características da população incluída, métodos utilizados e principais resultados destes estudos e do presente trabalho.

Quadro 1: Sumário dos estudos que avaliaram a prevalência de anticorpos após vacinação de febre amarela.

Autor (ano)	Número de participantes (faixa etária)	Característica da população	Vacina utilizada	Técnica de dosagem de anticorpos anti-FA	Tempo decorrido da vacinação	Resultados
Miyaji (Presente estudo)	94 (46 com ≥ 60 anos e 48 de 18 a 59 anos)	Área não endêmica	17DD	PRNT ₅₀ *	Variável (de 1,7 a 246,33 meses)	≥ 60 anos: 87% soropositivos. 18 - 59 anos: 93,8% soropositivos
Groot e cols ³⁴ (1962)	108 (≥ 18 anos, incluindo adultos >68 anos)	Área não endêmica	17D	Proteção em camundongos (inoculação intracerebral)	17 anos	3% negativos 76% fortemente positivos 21% fracamente positivos
Rosenzweig e cols ³⁵ (1963)	55 (idade não especificada)	Militares de área não endêmica	17D	Proteção em camundongos (inoculação intracerebral)	0 a 5 anos (n=12) 6 a 15 anos (n=5) 16 a 19 anos (n=24) 0 a 8 anos com >1 dose (n=9)	100% soropositivos

Continua na próxima página

Quadro 1 (continuação): Sumário dos estudos que avaliaram a prevalência de anticorpos após vacinação de febre amarela.

Autor (ano)	Número de participantes (faixa etária)	Características da população	Vacina utilizada	Técnica de dosagem de anticorpos anti- FA	Tempo decorrido da vacinação	Resultados
Poland ²⁵ (1981)	116 (idade não especificada)	Militares de áreas não endêmicas	17D	PRNT* e proteção em camundongos (inoculação intracerebral)	30 a 35 anos	PRNT 78,5% positivos Proteção em camundongos: 71,85% positivos
Reinhardt ³⁶ (1998)	5 (18 a 50 anos)	Área não endêmica	17D	PRNT ₉₀ **	≥10 anos	Todos os 5 soropositivos
Niedrig ²⁷ (1999)	209 (10 a 79 anos)	Área não endêmica	17D	PRNT ₉₀ **	0 a 38 anos	Soropositivos: Total: 83,7%; 1 a 10 anos: 86,7% 11 a 38 anos: 74,5%

Continua na próxima página

Quadro 1 (continuação): Sumário dos estudos que avaliaram a prevalência de anticorpos após vacinação de febre amarela.

Autor (ano)	Número de participantes (faixa etária)	Características da população	Vacina utilizada	Técnica de dosagem de anticorpos anti-FA	Tempo decorrido da vacinação	Resultados
Gómez ³⁷ (2008)	216 (1 a 76 anos)	Áreas endêmicas	17D	PRNT ₇₅ ^{***}	Primovacinados há 3 a 24 meses (n=100) Residentes de Ocaña, vacinados há 2 a 3 anos (n=116)	Primovacinados: 90% soropositivos Residentes de Ocaña: 81% soropositivos (geral); pessoas ≤15 anos: 69% soropositivos
Bodilis ³⁸ (2011)	84 (≥60 anos)	Área não endêmica	17D	PRNT ₈₀ [#]	≥10 anos	95,2% soropositivos

Continua na próxima página

Quadro 1 (continuação): Sumário dos estudos que avaliaram a prevalência de anticorpos após vacinação de febre amarela.

Autor (ano)	Número de participantes (faixa etária)	Características da população	Vacina utilizada	Metodologia de dosagem de anticorpos anti-FA	Tempo decorrido da vacinação	Resultados
De Melo ³⁹ (2011)	40 (14 a 79 anos)	Área não endêmica	17DD	ELISA IgG anti FA e PRNT ₅₀ *	5 anos (n=20) e 10 anos (n=20) após a vacinação	ELISA IgG: 60% positividade 5 anos pós vacinação e 55% positividade 10 anos após. PRNT ₅₀ : 100% positividade 5 e 10 após vacinação
Grupo colaborativo para estudos de vacinas de FA ⁴⁰ (2014)	526 (18 a 83 anos)	Área não endêmica	17DD	PRNT ₅₀ *	1 a 4 anos (n=114) 5 a 9 anos (n=83) 10 a 11 anos (n=138) e ≥12 anos (n=191)	Soropositividade: 93,9% (1 a 4 anos), 83,1% (5 a 9), 76,1% (10 a 11 anos), 85,3% (≥12 anos após vacinação)

*PRNT₅₀: teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise.

**PRNT₉₀: teste de neutralização por redução de 90% das placas de lise.

***PRNT₇₀: teste de neutralização por redução de 70% das placas de lise.

#PRNT₈₀: teste de neutralização por redução de 80% das placas de lise.

Considerando todos os participantes do presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa de soropositividade entre os que receberam apenas uma dose de vacina de FA há menos de 10 anos e há mais de 10 anos. Este resultado é compatível com outros trabalhos que demonstraram a persistência de anticorpos por mais de 10 anos após a vacinação de FA, porém o número de indivíduos que receberam apenas uma dose de vacina foi pequeno (23 no grupo de idosos e 36 no grupo mais jovem), assim como o dos que receberam a dose há mais de 10 anos (n=23).

Se por um lado há trabalhos demonstrando alta imunogenicidade da vacina de FA, por outro lado há relatos de falha vacinal em pessoas comprovadamente vacinadas. No Brasil, um levantamento feito por Tuboi e Cols⁴¹, de 1998 a 2002, encontrou cinco casos de febre amarela em pessoas com comprovação de vacinação prévia. A idade variou de 17 a 62 anos (somente um desses casos ocorreu em indivíduo maior de 60 anos) e dois evoluíram a óbito. Em todos os casos o tempo decorrido entre a vacinação e o desenvolvimento de doença foi pequeno, variando de cinco a 62 meses. A revisão de Gotuzzo e cols.³³ encontrou outros cinco casos de FA em pessoas previamente vacinadas, com intervalo de tempo entre a vacinação e o início dos sintomas variando de um ano e três meses a cinco anos. Entre estes últimos casos, ocorreram três óbitos. Nos dois estudos, o curto intervalo de tempo entre a vacinação e a doença sugere falha vacinal primária.

Além dos casos de doença em pessoas vacinadas, há também estudos demonstrando menor resposta vacinal em crianças e adolescentes. O

trabalho de Gomez e cols³⁷, citado anteriormente, analisou um grupo de vacinados de uma determinada região endêmica de FA na Colômbia (Ocaña e municípios vizinhos) e encontrou menor soropositividade em crianças de até 15 anos (69%) quando comparados aos grupos de 16 a 35 anos (89,5%) e de mais de 35 anos (100%).

Dados de taxa de soroconversão após vacinação, perda de imunidade com o decorrer do tempo após a vacinação, e de falha vacinal primária devem ser considerados na decisão de indicar uma única dose de vacina de FA, particularmente para pessoas que residem em áreas endêmicas para a doença. Em nosso estudo não foi encontrada correlação significativa entre o tempo decorrido desde a vacinação e o título de anticorpos neutralizantes. Tal análise avaliou todos os participantes que haviam recebido apenas uma dose de vacina de FA durante a vida. Como descrito anteriormente, anticorpos contra FA podem persistir por mais de 10 anos. Na revacinação, mesmo com intervalo superior a 10 anos, os indivíduos podem apresentar títulos de anticorpos detectáveis pré-revacinação, como descrito por Santos e cols⁴².

Uma limitação da presente avaliação foi o pequeno tamanho da amostra. Além disso, não há informações sobre exposição ao vírus selvagem, pois não foram coletadas todas as informações sobre viagens ou residência prévia em áreas endêmicas. Exposições ao vírus selvagem poderiam funcionar como “*booster*” natural e evitariam uma possível queda dos títulos de anticorpos contra FA ao longo do tempo. Não podemos descartar a possibilidade de alguns participantes terem recebido outras doses de vacina além das relatadas, uma vez que foram realizadas várias campanhas de

vacinação no país, nos últimos 15 anos, e que a documentação de vacinação feita durante campanhas é deficiente. O pequeno tamanho da amostra impossibilitou a análise de subgrupo dos idosos que receberam a vacina antes de completar 60 anos e aqueles que foram vacinados após completar 60 anos.

A inclusão de pessoas sem comprovação vacinal (dois em cada grupo) se justifica pois as informações destes participantes foram consideradas seguras (três deles sabiam o ano e o motivo da vacinação). Além disso, em nosso serviço, observamos que a perda de comprovante vacinal é muito frequente e aumenta com o passar do tempo após a vacinação. Outros estudos também incluíram participantes com relato verbal de vacinação, como o de Bodilis e col³⁸ e de Gómez e col³⁷.

A atual recomendação da OMS de dose única da vacina de FA é baseada em estudos realizados predominantemente em adultos saudáveis residentes fora de área endêmica^{2,33}. Poucos trabalhos avaliaram a persistência de anticorpos em pessoas com 60 anos ou mais. Há alguns trabalhos demonstrando a adequada imunogenicidade da vacina nesta população, como os anteriormente citados, porém a avaliação a longo prazo é necessária para apoiar a recomendação da OMS de dose única de vacina de FA em regiões endêmicas para a doença. Outro grupo que necessita de mais estudos é o de crianças, uma vez que a vacinação em áreas endêmicas está indicada a partir dos nove meses de idade. A soroconversão e a persistência de proteção nessa faixa etária é fundamental para evitar casos de doença, uma vez que há risco de transmissão, inclusive em áreas urbanas, como o que ocorre na África.

Há necessidade de mais estudos para avaliar a persistência de anticorpos neutralizantes contra FA na população com 60 anos ou mais, tanto saudável quanto naqueles que apresentam alguma comorbidade que esteja associada a menor resposta vacinal, como insuficiência renal crônica e *diabetes mellitus*.

6. CONCLUSÕES

6.1 A soropositividade de anticorpos anti-FA nos adultos com 60 anos ou mais previamente vacinados foi de 87%.

6.2 O título médio geométrico de anticorpos neutralizantes em indivíduos com 60 anos ou mais previamente vacinados para FA foi de 4349mUI/mL ($\log_{10}$, 3,64mUI/mL).

6.3 Não houve diferença estatisticamente significativa na soropositividade em adultos ≥ 60 anos em comparação aos adultos jovens (18-59 anos, 93,8%).

6.4 Houve diferença estatisticamente significativa dos títulos de anticorpos entre os dois grupos, que foi inferior no grupo ≥ 60 anos (3,64 $\log_{10}$ mUI/mL) em comparação ao grupo de 18 a 59 anos (3,77 $\log_{10}$ mUI/mL, $p=0,022$). A relevância clínica dessa diferença não é conhecida.

6.5 Não houve diferença estatisticamente significativa na soropositividade entre os participantes que receberam uma única dose de vacina de FA há mais e há menos de dez anos.

6.6 Não foi encontrada correlação entre os títulos de anticorpos neutralizantes e o tempo decorrido desde a vacinação em pessoas de todas as idades que receberam uma única dose da vacina de febre amarela durante a vida.

7. REFERÊNCIAS

1. Vaughn D, Barret A, Solomon T. Flaviviruses (Yellow Fever, Dengue, Dengue Hemorrhagic Fever, Japanese Encephalitis, St. Louis Encephalitis, West Nile Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis). In: Mandell D, and Bennett's, ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol 2. 7th ed: Churchill Livingstone; 2010:2133-2156.
2. Weekly epidemiological record. 2013;269-284.
3. Cetron MS, Marfin AA, Julian KG, et al. Yellow Fever Vaccine Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2002: CDC; 2002.
4. Gershman MD, Staples JE. Yellow Fever. *CDC Health Information for International Travel - 2014*. 2014(3).
5. Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela. In: Fundação Nacional de Saúde MdS, ed. Assessoria de Comunicação Social - Núcleo de Produção - ASCOM/PRE/FNS ed. Brasil1999.
6. Febre Amarela. :: BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista: Publicação Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. 2008;2015(02/19).
7. Aspectos epidemiológicos da febre amarela silvestre e a vigilância intensificada durante período de monitoramento, Brasil, 2012/2013. In: Saúde SdVeS-Md, ed. Vol 45. Brazil: Ministério da Saúde; 2014.
8. Informe Técnico Vacina Contra Febre Amarela. In: Imunizações/CVE Dd, Zoonoses/CVE Dd, eds2011.
9. Febre Amarela. In: Saúde Md, Saúde SdVe, Saúde DdVe, eds. *Doenças Infecciosas e Parasitárias - Guia de Bolso*. 8^a ed. Brasil: Ministério da Saúde; 2010:177-181.
10. Monath TP, Gershman M, Staples EJ, DT BA. Yellow Fever Vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*. Sixth Edition ed: ScienceDirect; 2013:870-978.
11. Memento Terapêutico 2014. In: Imunobiológicos FOIdTe, ed. Rio de Janeiro, Brazil2014:18-35.
12. Yellow Fever Vaccine - Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). In: Services DoHaH, ed. Vol 59: Center for Disease Control and Prevention; 2010.
13. Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK. Yellow Fever Vaccine: Direct Challenge of Monkeys Given Graded Doses of 17D Vaccine. *Appl Microbiol*. Apr 1973;25(4):539-544.
14. Jonker EF, Visser LG, Roukens AH. Advances and controversies in yellow fever vaccination. *Ther Adv Vaccines*. Nov 2013;1(4):144-152.
15. Vaccine-preventable diseases and vaccines. *International Travel and Health*. 2014 updates(6):1-63.
16. Transmission of Yellow Fever Vaccine Virus Through Breast-Feeding --- Brazil, 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. 2010;59(05):130-132. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5905a2.htm>.
17. Recomendações da Secretaria de Vigilância em Saúde sobre o uso da vacina contra febre amarela. In: Saúde SdVe, ed: Ministério da Saúde; 2014.
18. Lindsey NP, Schroeder BA, Miller ER, et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine*. Nov 11 2008;26(48):6077-6082.
19. Barrett AD, Teuwen DE. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol*. Jun 2009;21(3):308-313.

20. Martins RM, Maia MLS, Santos EM, et al. Yellow Fever Vaccine Post-marketing Surveillance in Brazil. *Procedia in Vaccinology*. 2010;2(2):178–183.
21. IBGE. IBGE | censo 2010 | resultados | notícias | Em 2013, esperança de vida ao nascer era de 74,9 anos. 2014; <http://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo?view=noticia&id=1&idnoticia=2773&busca=1&t=2013-esperanca-vida-nascer-era-74-9-anos>. Accessed 16/01/2015.
22. Grubeck-Loebenstein B, Della Bella S, Iorio AM, Michel JP, Pawelec G, Solana R. Immunosenescence and vaccine failure in the elderly. *Aging Clin Exp Res*. Jun 2009;21(3):201-209.
23. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol*. May 2013;14(5):428-436.
24. Miyaji KT, Luiz AM, Lara AN, et al. Active assessment of adverse events following yellow fever vaccination of persons aged 60 years and more. *Hum Vaccin Immunother*. Feb 2013;9(2):277-282.
25. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ*. 1981;59(6):895-900.
26. Camacho LA, Freire Mda S, Leal Mda L, et al. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Rev Saude Publica*. Oct 2004;38(5):671-678.
27. Niedrig M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop Med Int Health*. Dec 1999;4(12):867-871.
28. Simoes M, Camacho LA, Yamamura AM, Miranda EH, Cajaraville AC, da Silva Freire M. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals*. Nov 2012;40(6):399-404.
29. BD FACSCalibur Instructions for Use: Becton, Dickinson and Company; 2007.
30. IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T POR CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO KIT MULTITEST® / TRUCOUNT®. São Paulo, Brasil: Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde - Coordenadoria de controle de Doenças; 2012.
31. Roukens AH, Soonawala D, Joosten SA, et al. Elderly subjects have a delayed antibody response and prolonged viraemia following yellow fever vaccination: a prospective controlled cohort study. *PLoS One*. 2011;6(12):e27753.
32. Monath TP, Cetron MS, McCarthy K, et al. Yellow fever 17D vaccine safety and immunogenicity in the elderly. *Hum Vaccin*. Sep-Oct 2005;1(5):207-214.
33. Gotuzzo E, Yactayo S, Cordova E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am J Trop Med Hyg*. Sep 2013;89(3):434-444.
34. Groot H, Riberiro RB. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. *Bull World Health Organ*. 1962;27:699-707.
35. Rosenzweig EC, Babione RW, Wisseman CL, Jr. Immunological studies with group B arthropod-borne viruses. IV. Persistence of yellow fever antibodies following vaccination with 17D strain yellow fever vaccine. *Am J Trop Med Hyg*. Mar 1963;12:230-235.
36. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'Age-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol*. Oct 1998;56(2):159-167.

37. Gomez SY, Ocazonez RE. [Yellow fever virus 17D neutralising antibodies in vaccinated Colombian people and unvaccinated ones having immunity against dengue]. *Rev Salud Publica (Bogota)*. Nov-Dec 2008;10(5):796-807.
38. Coulange Bodilis H, Benabdelmoumen G, Gergely A, et al. [Long term persistence of yellow fever neutralising antibodies in elderly persons]. *Bull Soc Pathol Exot*. Oct 2011;104(4):260-265.
39. de Melo AB, da Silva Mda P, Magalhaes MC, et al. Description of a prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. Oct 2011;85(4):739-747.
40. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine*. Sep 3 2014;32(39):4977-4984.
41. Tuboi SH, Costa ZG, da Costa Vasconcelos PF, Hatch D. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Feb 2007;101(2):169-175.
42. Santos AP, Bertho AL, Dias DC, Santos JR, Marcovistz R. Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. May 2005;100(3):331-337.