

Eventos Adversos Sérios Associados com a Vacina 17D contra a Febre Amarela



Conhecimento e Objetivos.

Um grupo de especialistas sobre febre amarela reuniu-se em Brasília no período de 10-11 de maio de 2000, para revisar dois recentes eventos temporalmente associados com a vacinação da febre amarela no Brasil. Dois diferentes lotes de vacina (sub-cepas 17DD) fabricados por Biomanguinhos, Rio de Janeiro, foram administrados a estes indivíduos e os mesmos lotes¹ foram administrados de forma segura a aproximadamente 1.5 milhão de pessoas. Os dois eventos adversos ocorreram durante um período de intensificação da vacinação contra a febre amarela no país, como resposta à atividade epizootica elevada e ao aumento da infestação do *Ae. aegypti* e o risco de febre amarela urbana.

O encontro foi patrocinado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), Brasil. O encontro foi aberto pelo Dr. Jarbas Barbosa, Diretor, CENEPI, que revisou os objetivos do encontro. Os participantes estão listados no Apêndice 1.

Os objetivos do encontro foram:

1. Determinar a relação causal entre os dois casos fatais e a vacinação contra a febre amarela.
2. Especificar investigações virológica e epidemiológica adicionais, necessárias para a elucidação desses casos e a segurança da vacina contra a febre amarela em geral.
3. Fazer recomendações referentes à política de vacinação contra a febre amarela à luz de nova informação sobre a segurança da vacina.

Situação da febre amarela no Brasil

Dr. Expedito Luna revisou a situação atual com respeito a atividade do vírus da febre amarela e a incidência de casos humanos. O Brasil, como a maioria dos outros países da América do Sul, tem uma extensa região florestal amazônica, onde a febre amarela silvestre é endêmica, e uma zona costeira onde a febre amarela não ocorre. A fronteira entre estas zonas pode ser afetada por expansões periódicas na atividade epizootica. A zona costeira, densamente habitada, tem se tornado reinfestada com o vetor urbano *Ae. aegypti*, e torna-se, então, receptiva à introdução e disseminação da febre amarela da área endêmica.

No Brasil, a área endêmica inclui 12 estados nos dois terços ocidentais do país habitados por 29.3 milhões de pessoas. Iniciando no primeiro trimestre de 1998 e continuando até o presente, vem ocorrendo uma das mais extensas epizootias na história, com um total de 166 casos humanos de febre amarela silvestre notificados. Acredita-se que esta epizootia esteja ligada ao excesso de chuva causado pelo evento El Niño.

Entre 1998-2000, os casos de febre amarela ocorreram sobre uma área muito extensa, de Roraima, ao longo da fronteira venezuelana no norte, ao Estado de São Paulo, no Sul, e nos Estados da Bahia e Minas Gerais, no Leste, ao Mato Grosso, no Oeste. A epizootia tem se expandido além das tradicionais

¹ 505,927 pessoas vacinadas com o Lote 98UFB088Z em Goiânia, Estado de Goiás,
855.697 pessoas vacinadas com o Lote 995FB029Z nas cidades de Campinas e Americana, Estado de São Paulo.



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

fronteiras da zona endêmica, alcançando as regiões do ocidente de Minas Gerais e São Paulo. 10.4 milhões de pessoas habitam esta “zona epizootica” ou de transição. O restante, a zona costeira não-endêmica, inclui 15 estados e é habitado por 126.3 milhões de pessoas.

Devido à irrupção da atividade da febre amarela na área endêmica e ao aumento da mobilidade da população humana, têm ocorrido recentes casos importados de febre amarela na zona costeira, como por exemplo o Rio de Janeiro, renovando as preocupações sobre urbanização. O risco de febre amarela urbana é realçado pela expansão da distribuição e densidade do *Ae. aegypti*, o qual agora inclui uma extensa área dentro das zonas litorânea, epizootica e endêmica do país.

Um dramático aumento na utilização da vacina contra a febre amarela no Brasil, bem como uma mudança na política para introduzir a imunização para as crianças em todo o país, vêm ocorrendo em resposta ao aumento na atividade epizootica e à ameaça de febre amarela urbana. Foi no contexto da intensificação da vacinação contra a FA e da implementação de um novo programa de vigilância de eventos adversos, que ocorreram estes dois casos fatais.

Política de vacinação e cobertura

Dra. Maria de Lourdes Maia revisou o estado da vacinação contra a febre amarela no Brasil.

Situação histórica

Até 1990, a imunização contra a febre amarela era realizada por equipes da FUNASA, que realizavam campanhas em massa a cada 5 anos na área endêmica. Em 1991, a vacinação tornou-se responsabilidade dos serviços permanentes de vacinação na zona endêmica e era realizada em centros fixos de vacinação. Em 1994, a responsabilidade passou para o Programa Nacional de Imunizações (COPNI) e em 1998 a vacinação de rotina contra a febre amarela para crianças foi introduzida no Programa Ampliado de Imunizações (PAI). Na área endêmica, a vacina é administrada aos 6 meses de idade, enquanto que na área costeira a vacina é administrada aos 9 meses de idade.

Entre 1990 e o presente ano, foram administradas aproximadamente 80 milhões de doses de vacina contra a febre amarela. Estima-se que a cobertura vacinal em 1999 exceda a 90% na maioria dos estados da zona endêmica. Entretanto, a cobertura teórica estimada pelo número de doses aplicadas em função da população total não fornece um quadro preciso, porque a revacinação é prática comum e as populações com fácil acesso aos centros fixos são imunizadas, enquanto bolsões da população das áreas rurais mais distantes, remotas e inacessíveis, escapam da imunização. Por esta razão, o recurso de equipes volantes de vacinação tem sido recentemente utilizado. Ademais, existe uma mobilidade extensa da população humana no Brasil, e a imunização de viajantes, turistas e trabalhadores migrantes permanece um desafio.

Vigilância da segurança da vacina e notificação

A vigilância dos eventos adversos associados à vacina foi iniciada em 1998. O monitoramento da segurança é de responsabilidade da COPNI. A implementação seguiu-se ao treinamento intensivo da equipe de vacinação e outros técnicos de saúde. O sistema é passivo, similar ao do Sistema de Notificação de Eventos Adversos Associados a Vacina (SNEAV) dos Estados Unidos (Vaccine



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

Associated Adverse event Reporting System –VAERS). A notificação tem aumentado a cada ano desde o início do programa. Os números de eventos adversos e doses de vacina aplicadas são mostrados abaixo:

Ano	Doses de Vacina	Eventos Adversos Notificados	Mortes
1998	11.704.233	8	0
1999	14.939.990	129	1
2000 (Jan-Mar)	8.048.966	107	1

A maioria das notificações não é de evento adverso grave e esperado. Ocorreram 3 eventos neurológicos (1 encefalite e 2 paralisias), para uma incidência de 0.09 por milhão, o que não é diferente da incidência histórica da encefalite pós-vacina – uma esperada e rara complicação da vacinação contra a febre amarela.

Os dois eventos adversos fatais que ocorreram dentro de um intervalo de 5 meses (outubro 1999 – fevereiro 2000) apresentaram-se como uma síndrome clínica não esperada e estão descritos com mais detalhes abaixo.

Progresso recente na compreensão da vacina.

Até 1998, o número de doses da vacina contra a febre amarela aplicadas na zona endêmica foi aproximadamente 3-4 milhões/ano, exceto para os anos de intensificação associada ao aumento da atividade epizootica. Uma estratégia agressiva de vacinação foi iniciada como resposta à recente epizootia, com cerca de 17 milhões de doses aplicadas na região endêmica desde 1998. Um adicional de 16 milhões de doses foi administrado na zona de transição do ocidente dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, onde a cobertura tem sido menor que em outros estados endêmicos. O Estado de Goiás também foi incluído nesta intensificação de vacinação, embora mais de 7 milhões de doses de vacina tenham sido aplicadas nos últimos dez anos, número que representa quase o dobro da atual população do estado. Esta alta cobertura vacinal deve ter prevenido um maior número de casos humanos de FA, considerando que este ano mais de 40 localidades do Estado notificaram epizootias extensas em primatas. Todas as faixas etárias, nestas campanhas de intensificação, foram imunizadas.

Assim, das 80 milhões de doses aplicadas desde 1990, aproximadamente 34 milhões (43%) foram usadas nos dois últimos anos. É neste período de aumento da utilização da vacina, acompanhada por um novo programa de vigilância dos eventos adversos associados à vacina, que os dois casos fatais foram reconhecidos.

Efeito dos eventos adversos nos programas de vacinação

Ao final de 1998, o Estado de São Paulo adotou uma política para imunizar o estado inteiro. A ocorrência do caso fatal temporalmente relacionado à vacina contra a febre amarela em fevereiro de 2000 causou uma redução do número de pessoas vacinadas. A vacinação tem sido mantida, porém, agora de forma seletiva – limitada aos viajantes e residentes de partes mais ocidentais do estado consideradas como de alto risco. Além disso, a política nacional de vacinação de rotina das crianças tem sido mudada, como discutido abaixo.



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

Política atual de vacinação

A atual política da COPNI é empreender a imunização de rotina das crianças (aos 6 meses de idade) na zona endêmica, como também alcançar as populações sub-imunizadas nas áreas inacessíveis da zona endêmica. A vacinação é disponibilizada e estimulada através de um sistema de educação em saúde em áreas da zona epizootica e em localidades infestadas pelo *Ae. aegypti*. A imunização dos viajantes que se deslocam para a zona endêmica está sendo intensificada através de um programa de educação médica.

A incorporação da vacina contra a febre amarela ao PAI (crianças aos 9 meses de idade) na região costeira está atualmente suspensa devido a questões sobre a segurança da vacina surgidas com os dois eventos fatais.

Descrição dos Eventos Adversos Graves

O Grupo elogiou as investigações exaustivas e completas dos dois eventos adversos graves realizadas no Brasil.

Caso 1 (ALS).

Descrição clínica (Ver também, Apêndice 2)

A uma menina de 5 anos de idade, branca, procedente de Goiânia, Estado de Goiás, foi administrada a vacina contra a febre amarela 17D (Lote 98UFB088Z) e Tríplice Viral (MMR) em 8 de outubro de 1999. Em 11 de outubro, 3 dias após a vacinação, ela começou a apresentar febre e diarreia, e no dia seguinte anorexia e vômito, prurido vulvar e exsudato, e nestas condições foi atendida em um Pronto Socorro. No momento do exame estava febril (39,6 °C), taquipneica, tinha hiperemia da faringe sem exsudato e sem visceromegalia. Ela estava anêmica (Hct 34%) e tinha níveis elevados de transaminase sanguínea (AST 114, ALT 160). A bilirrubina estava discretamente elevada (1.1 mg/dl). O diagnóstico foi de possível hepatite A e infecção do trato urinário. Em 15 de outubro (4º dia de doença) ela descompensou, com prostração, insuficiência respiratória, aumento dos vômitos e diarreia, desidratação e icterícia de esclerótica. O exame abdominal revelou um fígado aumentado e amolecido. Notou-se possível meningismo. Foram consideradas pneumonia e meningite. O exame do líquido cefalorraquidiano foi normal. O Raio X do tórax revelou infiltrado intersticial difuso no pulmão esquerdo. O hematócrito tinha caído para 30% apesar da desidratação; o número de leucócitos totais foi 12.000, bastões 4%, neutrófilos 88%, linfócitos 8%. Ela foi reidratada e tratada com antibióticos. No dia seguinte (16 de outubro, 5º dia de doença) retornou ao hospital em condições extremas e foi internada para cuidados intensivos. Na internação, ela estava hipotensa, sem perfusão, cianótica, e com insuficiência respiratória aguda. Apresentou uma parada cardiorespiratória, da qual foi ressuscitada, porém faleceu na hora seguinte.

Investigação laboratorial.

(Dr. Pedro Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas) O soro da paciente foi testado para anticorpos e tentativa de isolamento do vírus. O soro foi coletado *post-mortem* em 16 de outubro, 6 dias após o início. O IgM Elisa para FA, dengue-1 e dengue-2, HBc, HAV, hantavírus (SNV) e leptospirose foram negativos. HBsAg negativo. O isolamento do vírus em camundongos recém nascidos e células C6/36 negativos.



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

Amostras *post-mortem* obtidas através de biópsia de fígado, coração, baço, pele e sangue foram examinadas. O vírus foi isolado do coração, baço, pele e sangue em camundongos recém nascidos e células C6/36. O vírus não foi isolado do fígado. Os vírus isolados do coração, baço e pele foram identificados como sendo de FA pela imunofluorescência com anticorpos policlonal e monoclonal.

O vírus em suspensão de tecido do coração foi titulado em camundongos recém-nascidos ($6.7 \log_{10}$ DL₅₀/mL) e células Vero ($4.7 \log_{10}$ pfu/mL). É digno de nota que a taxa de pfu/DL₅₀ é de 0.01, o que sugere que o vírus tem uma virulência que é significativamente mais alta que a esperada para o FA 17D (taxa esperada deveria ser ~10).

Para excluir o envolvimento de outros vírus com o caso, a suspensão original do coração que permitiu o primeiro isolamento do VFA foi também inoculada em camundongos recém nascidos e células da linha C6/36 após ter sido neutralizada por uma alta titulação de fluido ascítico anti febre amarela. Nenhum outro agente foi identificado.

A análise molecular do vírus isolado do Caso 1 foi realizada numa colaboração entre o Instituto Evandro Chagas (Dra. Sueli Rodrigues) e o Instituto Oswaldo Cruz (Dr. Ricardo Galler). O RNA extraído dos tecidos hepático e esplênico, bem como do fluido sobrenadante da cultura celular C6/36 inoculada com tecido cardíaco, foi usado para amplificação por RT-PCR e sequenciamento de nucleotídeo. A análise da seqüência da região final 3' revelou que o vírus não era do tipo selvagem. Sequenciamentos posteriores do gene estrutural (C-M-E) do cDNA feitos do RNA extraído diretamente da amostra hepática revelaram que o vírus isolado do caso 1 foi a amostra vacinal 17DD.

Histopatologia.

O exame histopatológico foi realizado por dois patologistas do Instituto Evandro Chagas (Dra. Vera Lucia Barros) e do Instituto Adolfo Lutz (Dr. Venancio A. F. Alves). As mudanças foram consistentes com aquelas observadas na infecção de febre amarela por vírus selvagem. O fígado apresentou necrose médio zonal, alteração microvesicular adiposa e degeneração eosinofílica dos hepatócitos (corpúsculos de Councilman). O baço mostrou congestão, hemorragia e hipoplasia da polpa branca. O coração mostrou congestão e hemorragia focal. A coloração imunocitoquímica com anticorpos policlonais contra a febre amarela demonstrou grande quantidade de antígenos nos hepatócitos, corpúsculos de Councilman e células Kupffer; o antígeno também foi detectado no baço e em tecido cardíaco.

Amostras restantes.

Uma quantidade muito pequena (25 – 50 µL) de soro congelado permanece como sobra (tem sido repetidamente congelado e descongelado). Estão disponíveis pequenas quantidades de amostras fragmentadas de tecido congelado e blocos de parafina desses tecidos.

Investigações da história pregressa e epidemiológica.

A paciente não tinha viajado anteriormente ao evento. Uma revisão da história pregressa da paciente revelou que ela apresentou baixo peso ao nascer, e que havia apresentado episódios de diarreia e bronquites recorrentes durante a infância. Três meses antes da doença atual, foi hospitalizada com meningite asséptica. Seus familiares apresentavam boa saúde e foram submetidos a teste para HIV, com resultados negativos. Uma investigação epidemiológica extensa foi realizada nas proximidades da



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

residência da família afetada. A família residia em um subúrbio de Goiânia de baixo poder sócio-econômico, próximo a uma área de floresta residual. Um inquérito sorológico de 1.791 residentes não mostrou evidência de infecção de FA recente pelo HI e IgM ELISA. Um inquérito entomológico revelou uma baixa densidade de *Ae. aegypti* e *Haemagogus spp*; a tentativa de isolamento do vírus nos lotes desses mosquitos foi negativa. Concluiu-se que não existia evidência da transmissão do vírus da FA do tipo selvagem em Goiânia.

Foi iniciado um estudo prospectivo para identificar casos de febre amarela (incluindo a reação da vacina contra a febre amarela) entre pessoas com síndrome febril ou febre com icterícia, que procuraram o Hospital de Doenças Tropicais em Goiânia, em novembro de 1999. Nenhum caso foi identificado.

Caso 2 (KCR)

Descrição Clínica (Ver também Apêndice 2)

Uma mulher negra de 22 anos de idade residente em Americana, Estado de São Paulo foi vacinada contra a febre amarela em 17 de fevereiro de 2000 (Biomanguinhos Lote 995F029Z). Ela não recebeu vacinas concomitantes. Em 21 de fevereiro (4 dias após a vacinação), apresentou dor no braço esquerdo (local da vacinação) e febre. Foi atendida no Pronto Socorro do Hospital Municipal de Americana e foram-lhe prescritos analgésicos. Em 24 de fevereiro (3 dias após o início), procurou tratamento em uma clínica (Posto Médico Ipiranga) para febre, cefaléia, mialgia generalizada, e dor de garganta. Recebeu tratamento sintomático. Naquele início de noite buscou novamente por atenção no Pronto Socorro do Hospital Municipal de Americana; o exame revelou faringite intensa. Foi medicada com penicilina e liberada. Na manhã seguinte (25 de fevereiro, 4 dias após o início) retornou ao Posto Médico Ipiranga queixando-se de dor epigástrica; foi medicada com cimetidina e liberada. À noite, retornou ao Pronto Socorro com queixas de piora da doença, febre, e mialgia. Notou-se que estava icterícia e foi internada com hipótese diagnóstica de hepatite. Na internação seu Hct foi 43%, leucócitos 9.600 (7% bastões, 77% PMNs, 8% linfócitos), plaquetas 54.000, creatinina 2.8 mg/dl, AST 430 UI, ALT 190 UI. No exame de urina observou-se, proteinúria 1+, urobilinogênio ++, 103.000 leucócitos/mm³, 36.000 hemácias/mm³. Foi tratada com antibióticos e liberada.

No dia seguinte (26 de fevereiro, 5 dias após o início), ela novamente procurou atendimento médico e foi referenciada ao Hospital Santa Barbara, onde foi internada para tratamento intensivo com hipótese diagnóstica de leptospirose, dengue ou evento adverso da vacina. Notou-se diminuição da diurese e edema das extremidades superiores e inferiores durante as 24 horas anteriores à internação. Na internação foi considerada doente aguda, consciente, icterícia, com edema dos braços e pernas e hepatomegalia. Sua pressão sanguínea era de 110/60 mmHg. Foi tratada com penicilina IV, ranitidina, furosemida, manitol e dopamina. Suas células brancas foram de 27.700, com notável desvio à esquerda, hematócrito 37.7%, plaquetas 38.000, bilirrubina total 11.4, AST 511 UI, ALT 91 UI, gamaGT 62 UI, fosfatase alcalina 530 UI e CPK 155 UI, creatinina 3.9 mg/dl. Recebeu plasma fresco.

Em 27 de fevereiro (6 dias após o início), foi transferida para um hospital de cuidados terciários (Hospital das Clínicas da Unicamp) devido à piora clínica. Na internação, encontrava-se em condições críticas, com insuficiência respiratória, icterícia, cianótica, oligúrica com PA de 110/50 mmHg. O exame físico revelou congestão conjuntival e hematoma periorbital direito. Ainda na emergência, apresentou parada cardíaca e foi ressuscitada, entubada e colocada em ventilação mecânica. Foi



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

transferida para a UTI e tratada com antibióticos (para possível sépsis), plasma fresco, furosemida, dopamina e noradrenalina. Notou-se um extenso hemotórax, que drenava para o tubo orotraqueal. Teve uma queda significativa de seu hematócrito para 17,9%; outros dados laboratoriais não apresentaram alterações significativas quando comparados com aqueles observados anteriormente. Apresentou outra parada cardíaca e faleceu. Foi realizada uma autópsia completa.

Investigações laboratoriais.

Os testes sorológicos foram realizados no Instituto Adolfo Lutz (Dra. Luisa Souza). Uma amostra de soro colhida em 27 de fevereiro (10 dias após a vacinação, 6 dias após o início) foi positiva por IgM ELISA para FA e negativa para dengue-1 e dengue-2. Os testes de IH para FA, outros flavivírus, e EEE foram negativos. Os testes IgM ELISA e aglutinação para leptospirose, IgM ELISA para hantavírus (SNV), IgM anti-HAV, anti HBc, e HbsAg foram negativos.

As culturas de sangue para bactéria foram negativas. Tentou-se o isolamento do vírus em camundongos recém-nascidos e células C6/36 a partir do sangue, coração, cérebro, medula espinhal, cerebelo, rins, fígado, baço, e pulmão. Todos os tecidos continham vírus em um ou ambos os sistemas. O vírus isolado do fígado foi inoculado em camundongos recém-nascidos, os quais adoeceram no 5º dia. O vírus (designado SPH 188811) foi identificado por imunofluorescência indireta-IFI (em C6/36) ou fixação de complemento (cérebro de camundongo) como um flavivírus, muito semelhante ao da febre amarela. A identificação definitiva foi feita pelo sequenciamento de material amplificado por PCR do gene E; este procedimento mostrou tratar-se de cepa idêntica à do vírus 17DD isolado em Goiânia.

Histopatologia.

O exame histopatológico do fígado foi realizado por dois patologistas no Instituto Evandro Chagas (Dra. Vera Lucia Barros) e no Instituto Adolfo Lutz (Dr. Venancio A. F. Alves). As alterações foram consistentes com aquelas observadas nas infecções de febre amarela do tipo selvagem e similares às do Caso 1, embora algo mais moderadas. A imunocitoquímica foi positiva para o antígeno de FA nos hepatócitos, nos corpúsculos de Councilman e células de Kupffer. Outros tecidos estão sendo examinados por patologista do Hospital Unicamp (a ser relatado).

Investigações da história pregressa e epidemiológica.

A paciente vinha apresentando boa saúde e não tinha história de viagem recente. Havia um histórico de hepatite A e “nefrite” quando criança. Havia histórico de ratos na residência, porém uma inspeção não os revelou. A paciente morava em uma área urbana metropolitana. Nos últimos 100 anos não houve notificação de casos de febre amarela nesta região do Estado, e os casos de FA selvagem mais próximos ocorreram a uma distância de mais de 500 km de distância.

Um surto de meningite asséptica ocorreu durante o primeiro trimestre do ano nesta região do Estado de São Paulo; a associação temporal com a campanha de vacinação contra a febre amarela levantou questões sobre a relação com a vacinação. Presume-se que o surto seja de etiologia enteroviral, e não relacionado à vacinação.

Amostras restantes.

Estão disponíveis sangue congelado colhido *post-mortem* do coração, amostras de tecidos congelados, e blocos de parafina de todos os tecidos.



Busca retrospectiva de casos similares: Possível terceira morte associada à vacina em Santos.

Foi feita uma busca retrospectiva por outros casos semelhantes ao Caso 2 em três hospitais que servem a região; não foi encontrado nenhum.

Entretanto, uma morte com características clínicas similares ocorreu em Santos no mês de maio de 1999 durante a campanha de vacinação contra a febre amarela. O paciente era um garoto de 11 anos de idade que iniciou com febre e mal-estar 3 dias após a vacinação. Esta pessoa foi vacinada durante a campanha de vacinação em massa e o lote específico do qual recebeu a dose não foi identificado entre os quatro lotes que foram usados naquela campanha. A doença progrediu com diarreia, icterícia, petéquias e epistaxe. Cinco dias após o início, o paciente tornou-se comatoso e anúrico e morreu. Um dia antes da morte, a AST foi 162, ALT 150, creatinina 3.2, bilirrubina 13.5 e a contagem de plaquetas de 14.000. Não foram realizadas autópsia ou investigações sorológicas; o vírus da febre amarela foi isolado do sangue, porém não foi caracterizado. Não houve evidência de transmissão do vírus da FA do tipo selvagem na região de Santos.

Outras investigações laboratoriais

Seqüenciamento genômico completo

Dr. Galler (Instituto Osvaldo Cruz) relatou a seqüência genômica completa do RNA do vírus isolado do tecido hepático do Caso 1 (ALS). Também, as seqüências região terminal 3' do vírus isolado do coração e baço desta paciente foram determinadas. A seqüência foi comparada com as seqüências publicadas para o vírus Asibi do tipo selvagem, FA 17D-204, e FA 17DD. O vírus isolado do Caso 1 continha mutações na posição do nucleotídeo 2356 no gene E, 2677 em NS1, 6625 em NS4A e 10243 em NS5, todas silenciosas (nenhuma alteração de aminoácido). Uma mutação também foi encontrada no nucleotídeo específico 17D/17DD na região 3' não codificante (NCR) na posição 10367, a qual reverteu para a seqüência do vírus Asibi selvagem. Um re-exame da seqüência original 17DD sugeriu que a vacina era verdadeiramente heterogênea neste nucleotídeo, sugerindo que a mutação ocorreu na composição da vacina durante a aplicação no hospedeiro, ao invés de surgir como uma nova mutação.

Um exame preliminar da seqüência genômica completa do Caso 2, vacinado com um lote diferente, revelou diferenças idênticas nas mesmas posições do nucleotídeo. Isto necessita ser confirmado por exame mais conclusivo (os dados da seqüência tornaram-se disponíveis durante o encontro).

Caracterização biológica.

O Instituto Adolfo Lutz (Dra. Luisa Souza) comparou a neurovirulência do vírus isolado do Caso 2 (SPH 188811) através da 4ª passagem do vírus da febre amarela 17D em cérebro de camundongo (3 passagens em camundongo) e os vírus do tipo selvagem BE H-111 (20 passagens). Estes estudos foram realizados em camundongos de diferentes idades, inoculados por diferentes vias (IC, IP). Pareceu que o vírus SPH 188811 foi mais neurovirulento que a cepa laboratorial de FA 17D; o primeiro foi letal para camundongos inoculados IC de 21 e 45 dias, enquanto o 17D não foi. Deve-se destacar que isto é um resultado inesperado, considerando que o vírus 17D é tipicamente neurovirulento para camundongos de todas as idades inoculados IC.



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

Produção da vacina contra a febre amarela.

Dra. Maria da Luz Fernandes Leal revisou os históricos e os atuais métodos de produção em Biomanguinhos. Não houve mudanças nos métodos de fabricação que pudessem contribuir para os eventos adversos. O lote semente secundário 102/84 SC 285 produzido em 1984 tem sido usado para a produção de todos os lotes de vacina desde 1985 – um total de 370 milhões de doses. Este lote semente secundário foi submetida a teste de segurança em macaco (neuroviluência) em 1984, e tem sido usada subsequente como material de referência em outros 5 testes de neurovirulência em macacos entre 1987 e 1999; em cada caso o perfil de segurança [perfis de viremia (teste para viscerotropismo), escores clínicos e neuropatológicos] foram similares e dentro das especificações da OMS. A vacina liofilizada contém o mesmo estabilizador (8.0 mg de sacarose, 3.0 mg de glutamato de sódio/dose de 0.5 mL) em uso há muitos anos. A potência do vírus nos frascos finais não tem alterações, e é $4.4 \pm 0.2 \log_{10}$ PFU. Os lotes associados com os dois casos fatais foram liberados com títulos de 4.56 e 4.63 \log_{10} pfu/dose. Nenhuma variação significativa é observada na potência dos concentrados finais ou no fator diluição usado para a formulação final da vacina.

Eventos adversos graves associados à vacina contra a febre amarela 17D nos Estados Unidos

Dr. Martin Cetron (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta GA) revisou os resultados de uma análise retrospectiva de dados do SNEAV durante o intervalo de 1990-1998. Este estudo constatou um aumento gradual nos eventos adversos multi-sistêmicos com o avanço da idade. Em pessoas com mais de 65 anos, ocorreram 8.3 eventos por 100.000 vacinações. Quatro casos (3 fatais) ocorreram em pessoas de idades avançadas entre 1996-98. As características clínicas e laboratoriais, com falência hepática e renal e síndrome de choque, eram semelhantes aos dois casos brasileiros. Em dois casos, o vírus da FA 17D foi isolado, e em um caso o sequenciamento parcial revelou uma mutação em E326. Nenhum paciente era imunodeprimido, e a resposta de anticorpo sugeriu uma infecção esmagadora pelo vírus 17D. O sequenciamento genômico completo das cepas do vírus está em projeto no CDC, Ft. Collins. Os casos têm levantado novas preocupações entre os médicos de viajantes nos Estados Unidos e o Comitê Consultivo em Práticas de Imunização sobre a segurança da vacina em idosos.

Conclusões a respeito da relação causal da vacina contra a febre amarela 17DD e os casos fatais no Brasil

O Grupo chegou ao consenso de que o vírus vacinal foi a causa provável da infecção fatal semelhante ao vírus da febre amarela do tipo selvagem.

Foi salientado que, com exceção dos casos nos Estados Unidos, a infecção viscerotrópica semelhante à febre amarela do tipo selvagem representa até agora uma complicação desconhecida da vacinação.

A conclusão referente à causalidade baseou-se nos seguintes pontos:

- Início da doença com proximidade temporal com a imunização (3-4 dias).



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

- Cursos clínicos quase idênticos: uma doença inicial febril não específica, seguida de rápida progressão com icterícia, falência renal, hipotensão, choque, e, em um caso, hemorragia, com morte ocorrendo 5-6 dias após o início.
- Os achados clínico-laboratoriais com elevação das transaminases sanguíneas (AST predominando como na febre amarela selvagem), bilirrubina e creatinina, e trombocitopenia.
- Alterações histopatológicas no fígado (e coração e baço em um caso examinado) patognomônicas para febre amarela, com presença do antígeno específico por imunohistoquímica.
- Vírus da febre amarela 17DD isolado de tecidos múltiplos. Em um caso (Caso 1), no qual foi feita uma avaliação quantitativa, uma titulação muito alta de vírus foi encontrada em tecido (coração).
- Ausência de qualquer outra explicação clara para as doenças.

Certas características clínicas destes casos permanecem controversas e muito pouco entendidas. Os níveis de transaminases são mais baixos que aqueles tipicamente observados na febre amarela selvagem. Isto sugere que o dano tecidual é menor que na doença selvagem, porém as mortes ocorreram rapidamente, e de fato, algo mais rapidamente que na infecção selvagem. Isto sugere que os fatores do hospedeiro ou infecção concomitante, possivelmente septicemia bacteriana, podem ter contribuído para a doença e morte. Ambas as pacientes tinham possíveis fontes para infecção bacteriana (trato urinário ou pulmão), e ambos tinham uma quantidade elevada de células brancas e um desvio à esquerda (em particular o Caso 2). Embora a leucocitose marcante possa estar relacionada à sepsia bacteriana, é também um evento freqüente tardio na febre amarela selvagem.

Com referência a uma avaliação laboratorial maior, o Grupo recomendou o seguinte:

- Os blocos de tecido devem ser re-testados por imunocitoquímica com anticorpos monoclonais específicos para FA 17D e febre amarela selvagem (Dr. Monath fornecerá).
- O material original contendo o vírus da febre amarela deve ser submetido a testes mais rigorosos para outras viroses. Isto poderá requerer a neutralização com anticorpos para a febre amarela e inoculação IC em camundongos e hamsters recém-nacidos e cultura em células Vero. As culturas devem ser observadas para detecção de CPE por no mínimo 7 dias, e uma passagem cega deve ser feita e observada por mais 7 dias. Os camundongos e hamsters devem ser mantidos em observação por 21 dias.
- Todas as amostras que sobraem devem ser cuidadosamente mantidas para estudos que não podem ser feitos atualmente e, se possível, armazenadas em duplicata em freezers diferentes para evitar a possibilidade de perda.



Fatores ligados ao hospedeiro

O Grupo discutiu a possível contribuição dos fatores ligados ao hospedeiro na evolução severa da doença.

O fato de que dois casos ocorreram como eventos isolados em uma população muito extensa (1.461.624 pessoas) que recebeu vacina dos mesmos lotes, sugere que os fatores idiossincrásicos ligados ao hospedeiro foram os responsáveis pelo quadro (desfecho).

O Caso 1 tratou-se de uma criança doente que tinha histórico de diarreia e bronquite recorrentes, aumentando a possibilidade de que era imunocomprometida. Não foi possível determinar se respondeu ou não com anticorpos à vacina, considerando que a única amostra de soro disponível foi obtida muito precocemente após a vacinação. O Caso 2 não tinha história que sugerisse imunodeficiência e provocasse resposta de IgM à vacina no 10º dia. Não é possível avaliar as respostas imunológicas inatas dos pacientes ou respostas de células T à vacina.

Notou-se que, enquanto a imunossupressão tem sido considerada como uma contra-indicação teórica para a vacinação contra a febre amarela, de fato não existem dados que sugiram que a imunodeficiência produza eventos desfavoráveis. Não existem relatos anteriores de eventos adversos associados à vacina contra a febre amarela em pacientes imunodeprimidos. Pequeno número de pessoas com infecção por HIV tem recebido a vacina sem relato de eventos adversos, embora uma alta proporção não tenha respondido imunologicamente com produção de anticorpos específicos.

Dada à baixa incidência de eventos adversos graves seguintes à vacinação contra a febre amarela, é altamente improvável que pudessem ser identificados fatores para predizer ou identificar o risco em um paciente individualmente.

O Grupo concordou com a recomendação de solicitação de uma consultoria imunológica para determinar quais análises retrospectivas poderiam ser realizadas para esclarecer o campo do estado imunológico e genético dos pacientes e membros familiares.

O Grupo também recomendou que o soro dos pacientes seja submetido a testes de neutralização do vírus da febre amarela contra aqueles isolados dos próprios pacientes e um vírus de referência da vacina (17DD). O teste de neutralização é uma medida mais sensível de resposta à vacina que o IgM ELISA.

Fatores específicos ao vírus

A ocorrência de mutações similares nos genomas dos diferentes lotes de vacina associados com os casos sugere que o vírus poderia ter alterado suas características de virulência. Isto é, também apoiado preliminarmente pelos dados de experimentos em camundongos, sugerindo que o vírus isolado dos casos parece ser mais virulento que o esperado.



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

Considerando que nenhuma das mutações genéticas estruturais e não estruturais foi associada com alterações na sequência de aminoácido, as dúvidas se voltam para a região NCR 3', que está envolvida na ciclização do genoma viral e controla a taxa de replicação. É possível também que as alterações na sequência nucleotídica pudessem afetar a tradução das proteínas estruturais e não estruturais. O fato de que a mutação da região NCR 3' do tipo selvagem ter sido encontrada em uma subpopulação minoritária na sequência original da 17DD e presente nos frascos de vacina, sugere que o mutante selecionado ocorreu preferencialmente durante a replicação nas duas pacientes.

Com respeito aos fatores específicos ao vírus, o Grupo fez as seguintes pontuações:

- As alterações prévias no fenótipo da vacina (sobre atenuação, aumento da neurovirulência) têm historicamente associação com certos lotes de vacina contra a febre amarela.
- As sequências genômicas dos lotes de vacina associados com os eventos adversos não têm sido estudadas para determinar se estão enriquecidas com as mutações observadas.
- Se a replicação seletiva do vírus mutante do aglomerado genético heterogêneo na vacina está associado a acidentes vacinais, não é claro o motivo pelo qual isto ocorreu apenas em dois casos.
- Os efeitos das mutações observadas no tropismo e virulência do vírus são atualmente obscuros. A presença de mutações não implica em si mutação do vírus vacinal.
- Para testar a hipótese de que os vírus mutantes isolados dos casos têm tropismo e virulência alterados, deve ser usado um modelo animal apropriado (de febre amarela viscerotrópica). Macacos (*rhesus* ou *Alouatta*) podem ser necessários.

Para direcionar estes pontos, foi desenvolvido um plano para promover pesquisas. As questões, estão pontuadas abaixo:

- Dados de sequenciamento genômico completo serão obtidos do lote semente secundário do vírus e os dois lotes de vacina implicados.
- Sequenciamento genômico completo dos vírus isolados dos dois pacientes serão repetidos em laboratório independente.
- O vírus do terceiro possível caso (Santos) deverá ser inteiramente sequenciado.
- Os vírus acima serão passados uma vez em células Vero, de forma que todas as cepas virais estejam em nível de passagem idêntico; o RNA viral extraído das células será sequenciado, e o fluido sobrenadante de cultura celular será usado como uma fonte para comparações biológicas em modelos animais.
- Uma simples fonte de tecido (fígado ou coração) de cada paciente será usada como as cepas a serem sequenciadas.



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

- As passagens em célula Vero serão realizadas pelo laboratório do Dr. Galler, o sequenciamento será realizado no OraVax, Cambridge MA. Dr. Galler participará diretamente do trabalho no OraVax;
- Serão realizadas caracterizações biológicas do lote semente, dos lotes de vacina e das cepas das pacientes em passagens Vero. Estes estudos poderiam incluir as propostas listadas no Apêndice 3.
- Dependendo do resultado destas análises, poderá ser possível formular novos testes de controle para testar a segurança das vacinas contra a febre amarela.

Vigilância dos eventos adversos associados à vacina.

O reconhecimento de uma nova síndrome clínica de eventos adversos severos multi-sistêmicos necessita que a vigilância para tais eventos seja intensificada.

Atualmente é de importância crítica definir a incidência destes eventos tão precisa e quantitativamente quanto possível, como base para estimativa da relação risco-benefício para a vacinação.

Um ou mais dos seguintes itens poderão servir de propostas para determinação da incidência de eventos adversos graves:

- Vigilância ativa na qual as pessoas são realmente contatadas em um intervalo apropriado após a vacinação. Considerando que os eventos adversos são associados com uma doença aguda que ocorre precocemente após a vacinação, o intervalo de seguimento pode ser breve. Enquanto este é o modo mais preciso para definir os eventos adversos, é difícil, caro e necessita que o seguimento dos pacientes não seja perdido, considerando que os eventos em questão são raros e ocorrem em uma proporção muito pequena. A raridade aparente de eventos adversos graves necessita que sejam empreendidos estudos de vigilância muito mais extensos; o número de indivíduos para um estudo deste tipo é provavelmente enorme e proibitivo.
- Vigilância passiva reforçada, na qual é dada atenção para a busca de síndrome(s) que preencha(m) uma ou mais definições de caso, por exemplo, doenças febris com icterícia. A vigilância poderá incluir internações em hospitais e registros de óbito. A educação dos promotores de educação em saúde com respeito à notificação de casos e obtenção de amostras apropriadas para o diagnóstico é necessária. Os problemas previstos incluem dificuldade na obtenção de registros de imunização e amostras laboratoriais e patológicas apropriadas. Entretanto, o Grupo reconheceu que existem analogias quanto ao conceito original de viscerotomia para a vigilância da febre amarela selvagem. A aplicação de novos métodos diagnósticos (imunohistoquímica e RT-PCR) intensifica o valor destas propostas.

O Grupo recomendou que um protocolo o realce da vigilância dos eventos adversos associados à vacina seja elaborado e implementado pela COPNI. Para este propósito, a COPNI e a Divisão de Quarentena do CDC irão elaborar conjuntamente o protocolo.



Revacinação.

A revacinação, particularmente na zona endêmica, é consenso. O Grupo discutiu a base para o requisito do intervalo de 10 anos para revacinação e reconheceu que a imunidade conferida pela vacina da febre amarela é muito durável e provavelmente por toda a vida na maioria dos casos. Com respeito ao problema de eventos adversos graves associados à replicação do vírus vacinal da febre amarela 17DD (como visto nos dois casos fatais), a revacinação não traz risco, desde que a pessoa vacinada já é imune e, em consequência, o vírus vacinal será eliminado rapidamente pelas respostas humoral e celular preexistentes.

Alterações da bula da vacina.

É de responsabilidade da autoridade nacional reguladora e do fabricante da vacina incluir informações relevantes à segurança para os promotores de cuidados à saúde e pacientes na bula da vacina (encarte de embalagem). O Grupo discutiu a necessidade de assegurar de que a bula da vacina contenha precauções precisas e que alerte quanto aos eventos adversos potenciais. Considerando que a investigação dos dois casos fatais está ainda em progresso e a incidência destes eventos ainda deve ser esclarecida, esta informação pode ser adiada. O Grupo recomendou que as alterações na bula, se indicadas, sejam realizadas o mais breve possível.

Repercussões com respeito à política de vacinação.

O Grupo reconheceu que, enquanto a vacina da febre amarela tem sido associada com casos de encefalite, esta complicação tem sido extremamente rara desde a instituição da menor idade (ou da idade mínima) para o início da vacinação.

A ocorrência de dois casos fatais no Brasil, junto com notificações similares nos Estados Unidos de uma síndrome semelhante à febre amarela selvagem, é completamente inesperada, baseado no conhecimento prévio sobre o comportamento biológico das vacinas contra a febre amarela. Estes eventos têm ocorrido dentro de uma extensa faixa etária. Não tem surgido nenhum fator de risco claro².

Os dois eventos fatais requerem uma mudança sobre percepção da vacina contra a febre amarela como sendo completamente segura

O grupo enfatizou, todavia, que o risco de eventos adversos graves é ainda extremamente pequeno, talvez na ordem de 10^{-6} , enquanto o risco de adquirir a febre amarela selvagem e ter uma taxa de letalidade de ~50% é muito maior na zona endêmica.

Por esta razão, nenhuma mudança na política de saúde pública para imunização é recomendada para os residentes da zona endêmica e áreas ameaçadas pela febre amarela devido às emergências do vírus, p. ex. a “zona epizootica”. Além disso, considerando que os viajantes para a zona endêmica estão sob alto

² Aumento da suscetibilidade com o avanço da idade é sugerido nos Estados Unidos, porém é mais difícil avaliar isto no Brasil, onde a imunização é instituída em idade jovem. Nenhum padrão de aumento da suscetibilidade surgiu em áreas não endêmicas nas quais a imunização primária foi administrada em populações extensas durante os dois últimos anos.



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

risco e podem também tornar-se vetores para introdução da febre amarela na volta às áreas receptivas do país, a vacinação é também obrigatória.

Baseado nos novos conceitos de segurança da vacina, não é mais aconselhável recomendar uma política de vacinação universal no Brasil ou em outros países da América do Sul onde o risco de febre amarela é claramente diferenciado (dividido) entre as zonas endêmica e não endêmica. Em áreas sem risco de febre amarela silvestre, tais como as zonas litorâneas, a aplicação de rotina da vacina no PAI ou em campanhas de imunização em massa não é recomendada. Em vez disto, devem ser substituídos por uma política de vigilância da febre amarela e prontidão para intervenção emergencial. O risco de febre amarela urbana pode também ser mitigado pelo controle do *Ae. aegypti*.

Em resumo, o Grupo apoiou o plano de suspensão da incorporação da vacina da febre amarela ao PAI em regiões não endêmicas do Brasil. Foi recomendado à OPAS que medidas similares para uso seletivo da vacina da febre amarela, baseadas no risco de exposição ao vírus selvagem, devem ser universalmente aplicadas em outros países da América do Sul.

Recomendações

1. Concluir a investigação dos dois eventos adversos graves.

Especificamente: a) Retestar os blocos de tecido pela imunocitoquímica utilizando anticorpos monoclonais específicos para a vacina e vírus da febre amarela do tipo selvagem; b) retestar as amostras originais para outros vírus por neutralização de febre amarela e inoculação de culturas de célula Vero (com segunda passagem cega), camundongos e hamsters; c) Realizar testes de neutralização nos soros de pacientes se houver disponibilidade de material; d) Consultar um imunologista a respeito de testes posteriores que poderão definir o estado imunológico e o tipo HLA das pacientes.

2. Completar e ampliar os estudos sobre o genótipo do vírus isolado das pacientes, os lotes de vacina associados com os eventos adversos e o lote semente secundário usado para a produção da vacina.

Especificamente: a) Preparar as passagens em células vero₁ lisadas para a extração de RNA e preservação de fluido sobrenadante em alíquotas múltiplas congeladas; b) Determinar a seqüência completa genômica dos vírus isolados, dos vírus das vacinas e semente secundária no nível de passagem Vero₁; c) Interpretar os dados da seqüência genômica com respeito a comparações com outras seqüências de vírus da febre amarela e de outros flavivírus, funções do gene e determinantes de virulência.

3. Seqüenciar o genoma do vírus isolado do caso em Santos (terceiro caso fatal suspeito de evento adverso associado à vacina, 1999).

4. Comparar a cepa do vírus das pacientes, os lotes de vacinas implicados e o lote semente secundário no que diz respeito à virulência (neurotropismo e viscerotropismo) em modelos animais apropriados, como descrito no Apêndice 2 deste relatório.



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

5. Elaborar e implementar um protocolo para a vigilância intensificada dos eventos adversos graves associados à vacinação da febre amarela, incluindo doença multi-sistêmica semelhante à febre amarela selvagem.
6. Através da vigilância "intensificada", obter uma avaliação mais precisa e quantitativa da incidência de eventos adversos graves, particularmente eventos multi-sistêmicos, e definir os fatores de risco de tais eventos. Usar esta informação para articular as políticas nacionais para imunização contra a febre amarela baseada nos riscos e benefícios.
7. Baseado nos novos conceitos de segurança extraídos dos eventos adversos graves descritos neste relatório, manter uma política de imunização seletiva de populações de elevado risco.
 - 7.1 Continuar a política de vacinação atual contra a febre amarela em áreas endêmicas e em áreas nas quais a atividade de transmissão do vírus seja evidente ("área epizootica"), incluindo esforços intensificados para alcançar os grupos populacionais com difícil acesso aos locais fixos de vacinação.
 - 7.2 Continuar a política de vacinação dos viajantes para as áreas endêmicas e epizooticas e intensificar a cobertura dos viajantes através de educação médica e outros meios apropriados.
 - 7.3 Em áreas não endêmicas, suspender a aplicação rotineira da vacina contra a febre amarela no PAI. Esta política é aplicável não apenas ao Brasil, mas também aos outros países da América do Sul com áreas endêmica e não endêmica bem definidas.
8. Realizar revisões das bulas da vacina contra a febre amarela, uma vez que os novos conceitos de segurança estejam completamente investigados.



Apêndice 1.

Reunião do Grupo de Especialistas em Febre Amarela

EVENTOS ADVERSOS GRAVES ASSOCIADOS COM A VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA 17D, BRASIL

Brasília, 10-11 de maio de 2000

Lista dos Participantes

Jarbas Barbosa da Silva Jr.

Diretor do Centro Nacional de Epidemiologia, CENEPI/FUNASA/MS, Brasília, DF, Brasil

Expedito Luna

Coordenador de Vigilância Epidemiológica, COVEPI/ CENEPI/ FUNASA/MS, Brasília, DF, Brasil

Maria de Lourdes S. Maia

Coordenadora do Programa Nacional de Imunizações, COPNI/CENEPI/FUNASA/MS, Brasília, DF, Brasil

Thomas P. Monath (Rapporteur)

OraVax Inc., Cambridge, EUA

Marty Cetron

Foreign Quarantine Division, Centers for Diseases Control and Prevention, CDC, Atlanta, EUA

Francisco Pinheiro

Organização Panamericana da Saúde/ Washington, EUA

Otávio P. de Oliva

HVP/Organização Panamericana da Saúde/ Washington, EUA

Bernardus Ganter

Organização Panamericana da Saúde/ Brasília, DF, Brasil

Angel Valencia

Organização Panamericana da Saúde/ Brasília, DF, Brasil

Ricardo Galler

Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/MS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil



Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Instituto Evandro Chagas, CENEPI/FUNASA/MS, Belém, PA, Brasil

Cristina Laval

SMS Goiânia, GO, Brasil

Luís Jacintho da Silva

SUCEN/SES/SP, São Paulo, SP, Brasil

Gabriel Oselka

SES/SP, São Paulo, SP, Brasil

Luísa Terezinha de Souza

Instituto Adolfo Lutz, SES/SP, São Paulo, SP, Brasil

Vera Lúcia R. S. Barros

Instituto Evandro Chagas, CENEPI/FUNASA/MS, Belém, PA, Brasil

Rosely Cerqueira da Oliveira

COVEPI/CENEPI/FUNASA/MS, Brasília, DF, Brasil

Zouraide G. Antunes Costa

COVEPI/CENEPI/FUNASA/MS, Brasília, DF, Brasil

Emanuel de Carvalho Martins

COLAB/CENEPI/FUNASA/MS, Brasília, DF, Brasil

Ademir de Lima e Silva

COPNI/CENEPI/FUNASA/MS, Brasília, DF, Brasil

Maria da Luz Leal

BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ/MS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Mário Moraes

Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, DF, Brasil

José Cássio de Moraes

CVE/SES/SP, São Paulo, SP, Brasil



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

Apêndice 2.

Detalhes dos dois eventos adversos fatais associados com a vacina contra a febre amarela, Brasil, 1999-2000

Parâmetro	Caso 1 (ADS)	Caso 2 (KCR)
Idade/Sexo	5/F	22/F
Raça	Branca	Preta/Mestiça
Ocupação		Trabalhador da indústria de confecções
Município, Estado	Goiânia, Goiás	Americana, São Paulo
Dia da vacinação FA	8/10/99	17/02/00
Lote No.		995F029Z
Vacinações simultâneas	MMR 8/10/99	Nenhuma
Início dos sintomas (dia)	11/10/99 (3º dia após a vacinação)	21/02/00 (4 dias após a vacinação)
Hospitalização	13/10/99 (2º dia após o início) atendida no PS. Seguida como paciente ambulatorial; internada em 16/10	25/02/00 (4 dias após o início); liberada em 26/02; readmitida em 26/02; transferida para cuidados terciários em 27/02.
Data do óbito (dia)	16/10/99 (5º dia após o início)	27/02/00 (6º dia após o início)
Evolução clínica	Início com febre, diarreia, vômito, anorexia, com rápida descompensação	Febre, dor no local da injeção em 21/02 (Dia 1 de doença). Febre, cefaléia, mialgia, dor de garganta, faringite severa ao exame em 24/02 (3º dia após o início); dor epigástrica em 25/02, icterícia (dia 4); rápida descompensação em 26-27/02.
Diagnóstico inicial	Hepatite	Hepatite
Diagnóstico subsequente	?Meningite, Pneumonia	Falência renal aguda, leptospirose, dengue reação a vacina
Evolução		
Hepatite	Fígado aumentado, doloroso, consistência diminuída, icterícia, LFTs (??) AST>ALT anormais	Fígado aumentado, icterícia,, LFTs (??) AST>ALT anormais
Falência Renal	?	Sim
Hemorragia	Não	Hematoma periorbital; hemotórax
Insuf. Resp.	Sim	Sim
Meningismo	Possível	Não
Torpor, coma	Sim	Sim
Choque	Sim	Sim
Bilirrubina Total (pico)	1.1 (Dia 2 após o início)	11.4 (Dia
AST (pico)	114 (Dia 2 após o início)	562 (Dia 6)
ALT (pico)	160 (Dia 2 após o início)	89 (Dia 6)
Creatinina (pico)		4.1 (Dia 5)
Leucócitos	12.000 (Dia 4 após o início)	9.600 (Dia 4) ->27.700 (Dia 6)
Hematócrito	34% (Dia 2)->30% (Dia 4)	43% (Dia 4) -> 17.9% (Dia 6)
Plaquetas (??)		38.000 (Dia 5)
LCR (Liquor)	WNL (??) (Dia 4 após o início)	



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

Proteína na urina (pico)		4+
Autópsia	Biópsias pós morte	Autópsia completa
Fígado	Necrose mediozonal, substituição da gordura microvesicular, infiltrados mononucleares portais, corpúsculos de Councilman; consistentes com febre amarela	Necrose mediozonal, substituição da gordura microvesicular, infiltrados mononucleares portais, corpúsculos de Councilman; consistentes com febre amarela
Rim		pendente
Coração	Edema, congestão, hemorragia focal	"
Baço	Hipoplasia da polpa branca	"
Outros		"
Imunohistoquímica	Fígado, baço: positivo FA (grande quantidade de antígeno); Den negativo.	Fígado, baço: positivo FA (grande quantidade de antígeno); Den negativo.
Sorologia		
FA	IgM negativo (Dia 2)	Positivo
Outros	Negativo anti HAV IgM, HbsAg, Anti HBc IgM, dengue IgM, outros flavivírus IH e IFI.	Negativo anti HAV IgM, HBsAg, Anti HBc IgM, dengue IgM, outros flavivírus IH e IFI; negativo leptospirose e hantavírus (SNV)
Isolamento do vírus	Vírus isolado do coração, baço, pele e sangue identificado como FA; vírus isolado do fígado, porém sem sucesso no re-isolamento.	Vírus isolado do sangue, cérebro, cordão espinhal, cerebelo, fígado, rim, baço, pulmão, coração identificado como sendo de FA.
Outros testes	Sorologia negativa para leptospirose, hepatites A-D, Hantavírus (SNV)	Sorologia negativa para . leptospirose, hepatites A-D, Hantavírus (SNV)
	Neutralização do vírus FA e passagem em suspensão de células Vero e filhotes de camundongos do coração: sem detecção de outro agente causal	
História relevante do passado médico	Prematura, baixo peso ao nascer; doença diarreica concorrente, bronquite. Meningite viral 3 meses antes da doença concorrente.	Hepatite A e nefrite quando criança. Boa saúde, sem problema médico recente.
História de viagem	Não	Não
Residência	Rural, baixo poder sócio-econômico; área de fronteira de floresta dentro da cidade	Urbana; casa inspecionada não revelou ratos
História familiar	Pais HIV negativos	



Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela

Investigação
epidemiológica

Extensivo inquérito sorológico de residentes da área não mostrou morte de macacos, nenhuma evidência de transmissão do Vírus selvagem da FA.
Investigação entomológica: baixa densidade de *Ae. aegypti*, *Haemagogus*. Tentativa de isolamento do vírus negativa.

Nenhuma atividade de FA selvagem na região.



Apêndice 3.

Propostas para investigação da virulência das cepas de vacinas da febre amarela recuperadas dos casos com eventos adversos fatais no Brasil.

1. Comparação das curvas de crescimento *in vitro* em uma multiplicidade padronizada de infecção (duas linhas celulares, Vero e humana diplóide, células MCR-5)
2. Determinar a virulência expressa na proporção de unidades de formação de placas (pfu) para IC e IP em camundongos recém-nascidos LD₅₀. A média de tempo de sobrevivência é mensurada. Para a diluição que é mais próxima, porém acima de LD₅₀, a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier será produzida e o tempo médio de sobrevivência será sumarizado para o teste e preparações padrões. O modelo de risco proporcional de Cox será usado para investigar o efeito da diluição sobre o tempo de sobrevivência.
3. Para os vírus que diferirem em virulência (razão PFU: LD₅₀), um exame mais detalhado de virulência será feito, usando um vírus controle de referência apropriado (p. exemplo: o lote semente secundário ou outra cepa selecionada da vacina contra a febre amarela). Camundongos de diferentes idades (p. exemplo: 3, 7, 21 dias) serão inoculados com a dose padronizada do teste e vírus controle. As taxas de mortalidade, tempo médio de sobrevivência (AST), e títulos de vírus cerebral (área sob a curva e pico dos títulos) serão determinadas. Os dados de resposta quântica de sobrevivência aos 21 dias serão analisados usando técnicas de análises de probit. Isto inclui a checagem das linhas paralelas em escala de probit e a estimativa da taxa de potência e seus intervalos de confiança de 95%. Se o paralelismo não for obtido, então a taxa de valores LD₅₀ do vírus controle e teste serão apresentados, com intervalo fiducial de 95% para a taxa. A área sob a curva para os títulos de vírus no cérebro serão comparadas pelas técnicas ANOVA.
4. O Viscerotropismo será estudado em um modelo animal apropriado. Os hamsters mostraram-se promissores como um modelo de viscerotropismo da febre amarela (Dr. R. Tesh, Universidade do Texas, Galveston). Os macacos (rhesus ou *Alouatta*) são delicadamente sensíveis à doença viscerotrópica induzida pela febre amarela selvagem. A rota de inoculação deve incluir tanto a subcutânea como a intra-hepática. Será realizado um estudo piloto envolvendo um pequeno número de animais inoculados com as cepas dos dois casos e uma cepa controle apropriada (vacina), seguido por estudos mais amplos se necessário. Medidas de efeito incluirão testes de viremia, clínico-laboratoriais da função do fígado, febre e sinais clínicos, e histopatologia. Dr. Monath fornecerá um protocolo existente que poderá ser modificado para estes estudos, os quais podem ser realizados no Brasil (Biomanguinhos e/ou Instituto Evandro Chagas).