Vanda Akico Ueda Fick de Souza

A AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG ANTI-SARAMPO E SUA IMPORTÂNCIA NA AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE VACINAS

Tese apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública - Área de Serviços de Saúde Pública

Orientadora: Prof.Dra. Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini

São Paulo
1996

b

Vanda Akico Ueda Fick de Souza

A AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG ANTI-SARAMPO E SUA IMPORTÂNCIA NA AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE VACINAS

Tese apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública - Área de Serviços de Saúde Pública

Orientadora: Prof.Dra. Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini

São Paulo
1996

Às

537 crianças vacinadas contra o sarampo que possibilitaram a realização deste trabalho e a milhões de crianças que sofrem as consequências do sarampo por não terem sido vacinadas

Às crianças Guilherme e Joãozito, por muito nos ensinar.

Ao

Dan,

por tentar compreender

e aceitar a escolha desses caminhos.

Ao

Dr. João Fernandes,

pela orientação nos caminhos a percorrer na vida.

Ao

Dan,

por tentar compreender

e aceitar a escolha desses caminhos.

AGRADECIMENTOS

À Prof.Dra. Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini, pela acolhida, constante disponibilidade e orientação, que me permitiram concluir com tranquilidade o presente trabalho.

Ao Dr. Cláudio Sérgio Pannuti, Chefe do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelas valiosas sugestões a este trabalho, pelo constante incentivo, amizade e carinho durante todos estes anos que trabalhamos juntos, e pela maravilhosa oportunidade que me foi dada para integrar o grupo de Virologia do IMT.

À Laura Masami Sumita, pela dedicação e perfeição durante o desenvolvimento dos trabalhos laboratoriais e pela amizade e carinho em todos os momentos.

A todos os amigos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo, pelo nosso crescimento:

Aluisio Augusto C. Segurado
Ana Cristina Hablitzel
Bruno Andrade Cardi
Clarisse Martins Machado
Cynthia Liliane M. do Canto
Eduardo Massad
Eliseu A. Waldman
Eufrosina Setsu Umezawa
Flávio Buratti Gonçalves
Francisca Lúcio de Oliveira
Glória Parra de Lazzari
Guilherme e Joãozinho
Jandira Takeda
João Renato Rebello Pinho
Jussara C. S. P. de Moraes
Luciana Andrea Cardillo

Lucy Santos Vilas Boas
Marcos Aurélio Wolff
Maria Angela de C. F. Pinca
Maria Clara C. C. Fernandes
Maria Cristina D. Silva Fink
Maria do Carmo Berthe Rosa
Marli de Paula Estevan
Paulo Ricardo Fernandes
Raymundo S. Azevedo Neto
Silvia Helena da Silva
Sonia Aparecida dos A. Ferraz
Sonia Pedroso Gomes
Vanessa Lillian de Carvalho
Wilton Santos Freire

Ao Prof.Vicente Amato Neto, Chefe do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias e a todos os colegas, pela minha acolhida no Departamento.

Ao Centro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjac, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pelo constante apoio nas pesquisas por nós realizadas.

À minha mãe e meus irmãos, pela união familiar, que me permitiu atingir este estágio.

E acima de tudo a DEUS, pela vida.

RESUMO

Com o objetivo de otimizar a avaliação de eficácia de vacinas contra o sarampo, discriminando-se imunização primária de secundária com uma única amostra pós-vacinal, o teste de avidéz de anticorpos IgG anti-sarampo foi padronizado e avaliado no presente estudo.

Aplicando-se a técnica de ELISA e a uréia 7M durante 10 minutos como agente dissociante da ligação antígeno-anticorpo, determinou-se o *cut-off* do baixo índice de avidéz (BIA) para definição de primo-vacinação como 29% e o tempo adequado de coleta da amostra pós-vacinal como 10 semanas. Observou-se BIA em todas as 164 amostras de soro colhidas até 10 semanas após primo-vacinação aos 9 meses com as vacinas Biken-CAM 70 e Edmonston-Zagreb. Após primo-vacinação aos 9 meses com a vacina Schwarz, BIA foi detectado em 233 das 242 (96,3%) amostras colhidas em papel de filtro.

No grupo de 41 crianças vacinadas que apresentavam história prévia de vacinação e/ou anticorpos na amostra pré-vacinal (reinfecção), 39/41 (95,1%) das amostras apresentaram altos índices de avidéz. Falhas vacinais primária e secundária foram detectadas, respectivamente, em 1/5 e 4/5 amostras de crianças que tinham história de vacinação, mas ausência de anticorpos na amostra pré-vacinal.

Nenhuma das 90 amostras de crianças vacinadas no passado com 2 doses da vacina Biken-CAM70 (aos 6 e 11 meses) e nenhum dos 42 soros de cordão umbilical, apresentou BIA.

Conclui-se que a determinação da avidéz de anticorpos IgG contra o vírus do sarampo, pela técnica utilizada no presente estudo é altamente eficaz na discriminação entre primo-vacinação e reinfecção ou infecção passada, podendo ser utilizada na avaliação de eficácia de vacinas contra o sarampo empregando-se apenas uma amostra pós-vacinal.

ABSTRACT

In an attempt to improve methods for evaluation of measles vaccine efficacy, by discriminating primary from secondary immunization with only one post-vaccination sample, a measles IgG antibody avidity assay was standardized and evaluated.

Using ELISA and treatment with 7M urea for 10 minutes to dissociate antigen-antibody bounds, the cut-off of low avidity indices (LAI) after primary measles vaccination was defined as 29% and 10 weeks as the term for collection of post-vaccination samples.

Low avidity indices were observed in all 164 samples collected up to 10 weeks after primary vaccination at 9 months with Biken-CAM70 and Edmonston-Zagreb vaccines. After vaccination with Schwarz vaccine, LAI were detected in 233 of 242 (96.3%) filter paper blood samples.

In the group of 41 vaccinated children who had a history of previous vaccination and/or measles antibody in pre-vaccination samples (reinfection), all but two (95,1%) presented high avidity indices.

Primary and secondary measles vaccine failures were detected, respectively, in 1/4 and 4/5 children who had a history of previous vaccination but no measles antibody was detected in pre-vaccination samples.

None of 90 children vaccinated in the past with 2 doses of measles vaccine (at 6 and 11 months) and none of 42 cord sera had LAI.

We conclude that the measles antibody avidity antibody assay presented in this study is highly efficient in discriminating primary vaccination from reinfection or past infection and can be applied in the evaluation of measles vaccine efficacy, using only one post-vaccination sample.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. O sarampo	2
2. O vírus do sarampo	3
3. As vacinas do sarampo	5
4. Estratégias e barreiras para controle do sarampo	7
4.1. Controle do sarampo no Estado de São Paulo e Brasil	9
4.2. Barreiras na eliminação do sarampo	13
4.3. Vacinas de altos títulos	16
5. Recomendações para investimentos em pesquisas em sarampo	19
6. Perspectivas de novas vacinas	20
7. Avaliação sorológica de eficácia de vacinas	23
8. Aidez de anticorpos IgG	26
8.1. Mecanismo de maturação da afinidade de anticorpos IgG	26
8.2. Importância da afinidade de anticorpos IgG nas doenças infecciosas	28
8.3. Métodos para determinação da aidez de anticorpos	29
OBJETIVOS	33
CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
1. Amostras de soros	36
2. Sorologia	39
2.1. Preparo de antígeno	39
2.2. Preparo das placas	40
2.3. ELISA - Aidez de IgG	40
2.4. Padronização da concentração de uréia e do tempo de exposição	41
2.5. Determinação dos títulos de anticorpos anti-sarampo	42
3. Análise Estatística	42

RESULTADOS	43
1. Padronização e avaliação do método para determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-sarampo	44
1.1. Padronização da concentração de uréia e do tempo de exposição	44
1.2. Avidéz de anticorpos IgG em imunização primária	47
1.2.1. Determinação do valor limite (<i>cut-off</i>) do Baixo Índice de Avidéz (BIA) de anticorpos IgG para definição de infecção primária	47
1.2.2. Evolução da avidéz e determinação da época adequada de coleta da amostra pós-vacinal	48
1.3. Avidéz de anticorpos IgG após vacinação de crianças soropositivas (reinfecção e de crianças com falhas vacinais	52
1.4. Avidéz de anticorpos IgG em infecção passada	55
1.5. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do Baixo Índice de Avidéz	57
2. Aplicação da técnica para o estudo da avidéz em eluatos de papel de filtro	58
3. Comparação dos índices de avidéz e títulos de anticorpos em primo-vacinação, de acordo com o tipo de vacina administrado	59
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

INTRODUÇÃO

1. O SARAMPO

O sarampo é uma doença infecciosa aguda altamente contagiosa, causada por vírus pertencente à família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*. É uma doença exclusiva da espécie humana. Embora os primatas possam ser infectados, não ocorre manutenção do vírus nesses animais que permita sua reintrodução na população humana (BELLINI et al., 1994).

A doença manifesta-se por um quadro clínico constituído de febre, tosse, coriza, conjuntivite, enantema característico (manchas de Koplik), que é seguido de um exantema máculo-papular generalizado (NORRBY, 1990). O sarampo e suas complicações são ainda considerados responsáveis por mais mortes infantis no mundo do que todas as outras doenças preveníveis por vacinação juntas e mais do que qualquer outra doença infecciosa específica (CHILDREN, 1994).

As complicações da doença são mais frequentemente caracterizadas por diarreia, pneumonia, otite média e laringotraqueobronquite (KAMBARAMI et al., 1991; KOSTER et al., 1981; MAKHENE e DIAZ, 1993). A pneumonia pelo próprio vírus do sarampo ou por diversos outros agentes virais e bacterianos, é a principal causa de morte (BECKFORD et al., 1985; KASCHULA et al., 1983; MARKOWITZ e NIEBURG, 1991)

Estas complicações, que estão associadas a uma depressão imunológica mais grave durante o curso da doença, são decorrentes de diversos fatores que se interrelacionam: papel imunossupressor do vírus, deficiência nutricional e infecção simultânea por outros agentes (DOSSETOR et al., 1977; COOVADIA et al., 1974; GRIFFIN et al., 1994). Os linfócitos T ativados por outros agentes são mais suscetíveis à replicação completa do vírus do sarampo (HYYPPIA et al., 1985; LUCAS et al., 1978; VYDELINGUM et al., 1995). Por outro lado, o aumento da replicação viral associado à desnutrição leva a uma queda maior da resposta imune celular, resultando em uma maior suscetibilidade às infecções por outros agentes

infecciosos (TAMASHIRO et al., 1987, WHITTLE et al., 1978, MORLEY, 1983).

Complicações mais tardias, como a pan-encefalite esclerosante sub-aguda, que é uma doença degenerativa do sistema nervoso central, pode manifestar-se vários anos após o sarampo e é devido à uma infecção persistente por vírus do sarampo defectivo, sem capacidade de replicação. Outras doenças, tais como a esclerose múltipla e lupus eritematoso sistêmico tem sido associadas ao sarampo (GERSHON, 1995)

2. O VÍRUS DO SARAMPO

O vírus do sarampo é composto de RNA de fita simples não segmentado, com polaridade negativa, que codifica 6 principais proteínas estruturais: N (60 kDa), P (72 kDa), H (78-80 kDa), F (duas subunidades de 41 e 18 kDa), M (37kDa) e L(210 kDa). Apresenta envelope lipídico, onde estão localizadas as proteínas H, F e M. Nas células infectadas, a proteína M parece ter função de estabilizar e organizar a membrana citoplasmática para brotamento do vírus. A proteína H é responsável pela interação do vírus com receptores de membrana e parece ainda agir em conjunto com a proteína F, para permitir a fusão do envelope viral com a membrana celular no processo de penetração do vírus na célula (BELLINI et al., 1994)

O vírus do sarampo tem sido considerado um vírus antigenicamente estável, embora variabilidades já tenham sido descritas por BIRRER et al., em 1981 e por SHESHERADARAN et al., em 1983, com o uso de anticorpos monoclonais. Estudos recentes de análise da sequência genômica dos genes que codificam as proteínas H, F e N, realizada por ROTA et al. (1994a), mostraram diferenças inferiores a 0,5-0,6% entre a amostra Edmonston selvagem e as cepas vacinais, a despeito das diferentes origens geográficas e diferentes formas de atenuação. As maiores divergências nas sequências foram encontradas nas vacinas CAM-70 e S-191.

TAMIN et al. (1994) ao realizar análise genômica das amostras selvagens isoladas mais recentemente, observou em amostra isolada em 1989, em Chicago, uma variação no antígeno H, com substituição de presumivelmente 19 aminoácidos, quando comparada à cepa Moraten. Essas diferenças foram também detectadas por anticorpos monoclonais produzidos contra cada um dos vírus, assim como através de neutralização cruzada com soros humanos.

De 1954 a 1989, a taxa média de variação neste gene foi de 0,08% ao ano, ao passo que no período de 1977 a 1989 foi de 0,13% ao ano. Essa taxa mais acelerada de variação das amostras mais recentes foi considerada, comparável em magnitude, à variação do vírus da influenza tipo A, um vírus que evolui em resposta à pressão imunológica (BELLINI et al., 1994). Não foi observada variação no antígeno F e a taxa de mutação nos antígenos N e M, durante o período de 1977-1989 foi somente de 0,03% ao ano.

ROTA et al. (1994b) ao sequenciarem os genes N e M de 16 amostras selvagens isoladas entre 1954 e 1989, detectaram diferenças em cerca de 76 nucleotídeos (4,75%) do gene N e cerca de 36 nucleotídeos (2,6%) do gene M.

Entretanto, o papel dessas variações na epidemiologia do sarampo ainda não está esclarecido. Assim, ainda que tenham ocorrido certas diferenças na reatividade dos anticorpos produzidos pela vacinação e pela infecção natural, quando se procedeu à reação de neutralização cruzada, observou-se que os vírus selvagens foram neutralizados por anticorpos induzidos pela vacinação, tendo sido os mesmos também eficazes na prevenção da doença. Contudo, admite-se como possível a hipótese de que variantes futuras possam acumular substituições de amino-ácidos suficientes para que os anticorpos induzidos por vacinação não mais previnam a doença (BELLINI et al., 1994, TAMIN et al., 1994).

3. AS VACINAS DO SARAMPO

A introdução de vacinação contra o sarampo foi possível após o isolamento do vírus por ENDERS e PEEBLES, em 1954. Esta cepa, denominada Edmonston, foi atenuada através de 24 passagens em células renais humanas, 28 passagens em células primárias de âmnio, 6 passagens em cavidade amniótica de ovo embrionado e 3 passagens em fibroblasto de embrião de galinha (MILOVANOVIC et al., 1957; ENDERS et al., 1960), dando origem à vacina Edmonston B (ENDERS et al., 1962), licenciada nos Estados Unidos em 1963.

Embora altamente imunogênica, eventos adversos, tais como febre e exantema foram observados nos testes iniciais (KATZ et al., 1960; 1962). Esses eventos adversos foram reduzidos administrando-se simultaneamente imunoglobulina humana (HILLEMAN et al., 1962; STOKES et al., 1962; WEIBEL et al., 1962).

A vacina do sarampo inativada com formol e precipitada com alumínio (KARZON et al., 1962; FELDMAN, 1962; WARREN et al., 1962; NORRBY et al., 1963), foi também licenciada nos Estados Unidos em 1963. Entretanto, seu uso foi suspenso em virtude da curta duração da imunidade e pelo risco de desenvolvimento, nas crianças vacinadas com essa vacina, de sarampo atípico com severa reação de hipersensibilidade tardia após exposição ao vírus selvagem (FULGINITI et al., 1967; RAUH e SCHMIDT, 1965; GOKIERT e BEAMISH, 1970).

A elevada frequência de eventos adversos pós-vacinais com a vacina atenuada Edmonston B, estimularam diversos pesquisadores a desenvolver formas mais atenuadas do vírus, através de passagens adicionais em outros sistemas celulares, que deram origem às cepas mais utilizadas atualmente, a saber, Schwarz (SCHWARZ, 1962), Moraten (HILLEMAN et al., 1968), Zagreb (IKIĆ, 1983) e AIK-C (MAKINO, 1983) (Figura 1).

Fonte: BELLINI et al. (1994)*

Além das vacinas originadas da cepa Edmonston, diversas outras vacinas atenuadas foram desenvolvidas com cepas isoladas em outros países, tais como a cepa Tanabe, isolada no Japão que deu origem à vacina CAM-70 (OKUNO, 1971). Da cepa Leningrad, isolada na Rússia originaram-se as vacinas Leningrad-16, Changchun-47 e Beijing-47 e de uma cepa isolada na China originou-se a vacina Shangai -191 (JIANZHI, 1983) (Figura 2).

Fonte: BELLINI et al. (1994)

A disponibilidade de vacinas, a natureza monotípica do vírus, a restrição da doença à população humana e a facilidade de identificação clínica da maioria dos casos de sarampo, permitiram considerar o sarampo como a doença ideal para ser erradicada (REUMAN, 1979) e em 1979, os Estados Unidos deram início à campanha para eliminação do sarampo no país (WOOD e BRUNELL, 1995).

4. ESTRATÉGIAS E BARREIRAS PARA CONTROLE DO SARAMPO

Os programas de eliminação do sarampo, implantados pela maioria dos países desenvolvidos, tem por objetivo a interrupção completa da transmissão do vírus através de "herd immunity" (imunidade de rebanho) (FOX, 1983; FINE, 1993), isto é, a resistência de um grupo a uma doença para o qual uma grande proporção de indivíduos estão imunes, reduzindo assim a probabilidade de contato entre um infectante e um suscetível. Para alcançar esse objetivo tem-se utilizado como estratégia básica a manutenção

de alta cobertura vacinal, assim como a implementação de sistemas de vigilância de casos e investigação de surtos (CUTTS e MARKOWITZ, 1994).

Entretanto, segundo SHEPARD, 1994, a análise econômica dos investimentos prioritários para o controle do sarampo sugere que os países que se lançaram em estratégias para a eliminação do sarampo deveriam esperar até que hajam recursos e organização para realizar esta meta quase simultaneamente em todo o mundo. E que, um país que tenha alcançado sucesso na eliminação do sarampo, deve ainda tomar todas as precauções para assegurar que o mesmo não seja reintroduzido.

A meta global da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o ano de 1995 foi uma redução de 90% e 95%, respectivamente, na incidência e na mortalidade por sarampo, em relação à era pré-vacinal (WHO, 1992a). Em 1990, essa redução foi de aproximadamente 61% e 86%, respectivamente. Para se atingir a meta global de redução na mortalidade, todos os países deveriam alcançar mais que 90% de cobertura vacinal em 1995 (GELLIN, 1994). Em 1993, a estimativa global foi de 77%, com diferentes níveis nos diversos países. Na África, onde cerca de 50% dos países apresentaram em 1991 coberturas inferiores a 60%, níveis inferiores a 30% foram verificados na Etiópia, Nigéria, Moçambique e Chad. Mesmo em países desenvolvidos, como a Itália, a cobertura vacinal em 1991 foi de apenas 42%. (CUTTS e MARKOWITZ, 1994)

Baseado em dados de cobertura vacinal da OMS e organizando os países de acordo com similaridades demográficas e epidemiológicas, NOKES et al., em 1995 desenvolveram um modelo matemático, cujos resultados indicaram para o ano 2000, uma redução de apenas 70% na morbidade, muito aquém portanto da meta da OMS para 1995.

4.1. Controle do sarampo no Estado de São Paulo e Brasil

A vacinação contra o sarampo foi introduzida no Brasil no final da década de 60, mas a coordenação de atividades a nível nacional iniciaram-se a partir de 1973, com a introdução do Programa Nacional de Imunizações e tornou-se compulsória por leis federais em 1977. A idade mínima para vacinação passou de 8 meses em 1973 para 7 meses em 1976 e para 9 meses em 1982 (RISI, 1983).

Apesar dos contínuos esforços dos programas de imunização contra o sarampo, nos 10 anos iniciais não se observou um grande impacto nos padrões epidemiológicos da doença (RISI, 1983). Em 1986 foram notificados no país 129.126 casos, com uma taxa de incidência de 94,5 por 100.000 habitantes, cujos números estima-se serem ainda maiores, devido às deficiências na notificação (PANNUTI et al., 1991). Em 1986 e 1987, inquéritos domiciliares realizados na Grande São Paulo, pelo Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CVE), para investigar a morbidade por sarampo em crianças menores de 15 anos, demonstraram uma significativa sub-notificação da doença. A média anual de casos estimada durante os anos de 83 a 86 foi de 64.000/ano, devido à ocorrência de epidemias, principalmente pelo acúmulo de suscetíveis na população (SÃO PAULO, 1991).

Em 1984, no Estado de São Paulo, o esquema vacinal que até então era de 2 doses aos 7 e 15 meses de idade, passou para dose única aos 9 meses. Neste mesmo ano ocorreu uma epidemia na Grande São Paulo, que não pôde ser atribuída à mudança recente no esquema e foi considerada consequente à cobertura vacinal deficiente, à baixa soroconversão aos 7 meses (idade mínima em que se administrava a 1ª dose), acrescida de baixa porcentagem (40 a 50%) de crianças que retornam para aplicação da 2ª dose aos 15 meses de idade (SÃO PAULO, 1984).

Os dados do inquérito domiciliar revelaram ainda, uma cobertura vacinal em torno de 80% em menores de 5 anos no período de 1983 a 1985. Considerando-se a soroconversão em torno de 80% aos 9 meses em nosso

meio (PANNUTI, 1987), uma cobertura real de cerca de 65% foi estimada nesses dois anos subsequentes à introdução do esquema de dose única aos 9 meses. Em 1986, foram observados altos coeficientes de incidência em todo o Estado de São Paulo, com deslocamento para faixas etárias mais elevadas (escolares, adolescentes e adultos jovens) (SÃO PAULO, 1986).

Em 1987, baseado nos dados do inquérito domiciliar, o CVE introduziu novas medidas de controle do sarampo, que consistiram de campanha de vacinação em massa não seletiva em crianças menores de 15 anos e manutenção de altos níveis de cobertura vacinal com vacinação de rotina aos 9 meses e revacinação aos 18 meses (atualmente aos 15 meses), baseado em estudo realizado em nosso meio, demonstrando que a revacinação de crianças vacinadas antes dos 12 meses de idade, apresentou eficácia semelhante àquela observada em crianças vacinadas com uma dose aos 12 meses de idade ou mais (LOPES, 1984).

Além disso, foi implantado um programa de vigilância epidemiológica mais ativa. A notificação compulsória que era restrita aos casos hospitalizados, estendeu-se a todos os casos, com confirmação laboratorial (SABIN, 1991) dos casos considerados suspeitos de acordo com os critérios do Center for Disease Control, EUA (CDC), isto é, febre acima de 38,5°C; erupção máculo-papular generalizada com duração de 3 dias ou mais; e um ou mais dos seguintes sintomas: tosse, coriza, conjuntivite; e/ou presença de manchas de Koplik (SÃO PAULO, 1987).

Na campanha de vacinação em massa realizada em maio de 1987, foram vacinadas 8.565.000 crianças entre 9 meses e 14 anos, o que correspondeu a uma cobertura vacinal de 91% em todo o Estado. Em setembro de 1987, um inquérito soro-epidemiológico na faixa etária 0 - 14 anos realizado na Grande São Paulo, com a finalidade de avaliar o impacto da campanha na imunidade dessa população, demonstrou uma soroprevalência de 94,1% nesse grupo (PANNUTI et al., 1991).

Em 1992, uma nova campanha não seletiva foi realizada com a vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola combinadas). Foram vacinadas

crianças entre 1 e 10 anos de idade, com posterior avaliação, por meio de inquéritos soro-epidemiológicos, realizados em São Paulo, em 1992, 1993 e 1994. Em 1992, na faixa etária de 1 a 10 anos foi observada uma prevalência de anticorpos anti-sarampo em títulos iguais ou superiores a 100 mUI/ml 97,7%. Em 1993 e 1994 foram encontradas, respectivamente, 98,6 e 97,1% de soroprevalência na faixa etária de 1 a 14 anos, mostrando a eficiência do programa na manutenção da imunidade populacional (MASSAD et al., 1992).

O sucesso do programa também pode ser avaliado pelo declínio acentuado na incidência da doença, como pode ser observado na Tabela 1. O aumento de casos em 1989 na Grande São Paulo, se deu às custas de casos na população maior de 15 anos, principalmente em conglomerados habitacionais, constituída em grande parte por migrantes de outros Estados e trabalhadores da indústria de construção civil (SÃO PAULO, 1991).

TABELA 1. Número de casos ambulatoriais e hospitalizados e coeficientes de incidência por 100 mil habitantes no Estado de São Paulo, 1987 a 1994

	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994
Número de casos	4928	419	1503	873	339	160	227	107
Coeficiente de incidência	16,06	1,33	4,65	2,63	0,99	0,47	0,69	0,32

Fonte: SVE/CIS/CVE 1987 SVE/CVE de 1988 a 1993

No Brasil, mudanças mais evidentes no comportamento epidemiológico do sarampo são mais recentes e com distribuição regional desigual, devido a grandes diferenças nas coberturas vacinais entre os estados. Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 1992b), no período de 1980 a 1989, a cobertura vacinal de rotina no país manteve-se entre 60 e 70%. A partir de 1990 com o aumento da cobertura vacinal de rotina e intensificação de medidas de controle, com a realização de campanha de vacinação e implantação de um sistema diferenciado de vigilância epidemiológica em 1992 (BRASIL, 1992a), houve também um

decréscimo na incidência em todo o território nacional (Tabela 2). Em 1995, dados provisórios fornecidos pelo Ministério da Saúde, mostraram no país, 88% de cobertura vacinal em menores de 1 ano.

TABELA 2. Número de casos notificados de sarampo no Brasil, distribuídos por faixa etária no período de 1987 a 1993.

faixa etária	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993
<1	8.754	3.738	3.433	7.054	5.215	1.408	540
1-4	21.065	10.433	7.239	16.088	9.769	1.888	793
5-9	11.160	5.702	4.988	12.025	10.566	1.526	747
10-14	7.201	2.396	2.094	10.077	6.247	1.009	429
>15	3.451	1.040	470	3453	3.773	1.000	618
Ignorado	1.255	644	364	3.018	1.106	266	459
TOTAL	66.059	26.179	22.853	61.435	42.532	7.934	3.586

Fonte: Ministério da Saúde

Esse período de baixa incidência denominado de “período de lua de mel”, ocorre geralmente após imunização em massa, durante o qual indivíduos mais velhos estão imunes por infecção natural e o mais jovens estão imunes por vacinação (CUTTS, 1991).

4.2. Barreiras na eliminação do sarampo

Entretanto, mesmo em países com elevada cobertura vacinal (que passaram por esse período de baixa incidência) surtos de sarampo vem sendo relatados.

POLAND e JACOBSON (1994), revisando a literatura concernente a surtos de sarampo em populações altamente imunizadas, constataram em 18 publicações do período de 1977 a 1992, que 30 a 100%(média 77%) dos casos de sarampo ocorreram em indivíduos previamente vacinados. De acordo com estes autores, os atuais programas visando a eliminação do sarampo, baseados em "herd immunity", não podem operar como mecanismo protetor enquanto 100% da população não estiver imune e que somente seriam eficazes para populações que se misturam de forma aleatória. Na população em idade escolar, geralmente há um maior contato entre os indivíduos, violando as hipóteses dos modelos comuns de transmissão do sarampo (WOOD e BRUNELL, 1995).

A ocorrência de surtos em países com elevada cobertura vacinal, é atribuída principalmente às falhas vacinais primárias e embora em menor escala, às falhas secundárias (NKOWANE et al., 1987; CHERRY et al. 1973; MATHIAS et al., 1989). As falhas vacinais primárias são caracterizadas pela ausência de resposta imunológica após imunização e ocorrem em uma proporção que varia de 10 a 25% dos vacinados, dependendo da idade da administração e da região geográfica. Por outro lado, nas falhas vacinais secundárias, embora haja sensibilização com produção de anticorpos, há posterior decaimento desses anticorpos a níveis não protetores, ocorrendo em 2 a 5% dos vacinados (WHO, 1992c).

As falhas vacinais ocasionadas por fatores relacionados à vacina, isto é, por perda da potência, devido à estocagem e/ou manipulação inadequadas da vacina, foram minimizadas pela introdução de vacinas com estabilidade térmica superior (HEYMANN, 1982) aos critérios mínimos estabelecidos pela OMS (WHO, 1981). Entretanto, em nosso meio, este fator pode ser importante causa de falha vacinal. OLIVEIRA et al. (1991) em

estudo de avaliação das condições de estocagem da vacina do sarampo no Rio de Janeiro, relataram títulos inferiores aos mínimos estabelecidos pelo fabricante em todas as 14 amostras de vacina recolhidas nas Unidades Sanitárias.

O fator mais importante de falha vacinal relacionado ao hospedeiro, é a presença de anticorpos passivos de origem materna ou administrados artificialmente, que mesmo em pequenas concentrações interferem na resposta à vacinação com as vacinas de uso corrente (ALBRECHT et al., 1977).

A extinção de anticorpos maternos varia nas diversas regiões geográficas, apresentando correlação inversa com o nível socio-econômico (BLACK et al., 1986). Estudos iniciais, utilizando a reação de inibição da hemaglutinação, de baixa sensibilidade, demonstraram extinção total de anticorpos maternos aos 12 meses nos Estados Unidos (KRUGMAN et al., 1965), aos 6 meses no Quênia (MINISTRY, 1977) e aos 5 meses em São Paulo (SOERENSEN et al., 1985). Entretanto, utilizando a reação de neutralização por redução de placas, de alta sensibilidade, ALBRECHT et al. (1977), relataram a persistência destes anticorpos por períodos mais prolongados nos Estados Unidos.

A persistência de anticorpos maternos é o principal determinante na elaboração de recomendações para definir a idade para vacinação. Para obtenção de eficácia ótima, a vacina do sarampo deve ser administrada em idade em que as crianças tenham perdido os anticorpos maternos, isto é, quando se tem as maiores taxas de soroconversão. Entretanto, deve-se também levar em consideração o grupo etário que apresente maior risco de infecção grave (ORENSTEIN et al., 1986).

Alguns estudos mostraram que uma vacinação em idade precoce pode levar a uma resposta imunológica alterada à revacinação (DESEDA-TOUS et al., 1978; WILKINS E WEHRLE, 1979; LINNEMAN et al., 1982,). WILKINS E WEHRLE (1979) relataram ausência de resposta à revacinação, pelo teste de inibição da hemaglutinação, em 51,4% das 37 crianças que não

havam respondido à vacinação aos 6 e 10 meses. Estes achados foram confirmados por LINNEMANN et al. (1982). BLACK et al. (1984) e STETLER et al. (1986) relataram também a ocorrência de resposta inadequada após revacinação, embora anticorpos neutralizantes em baixos títulos tenham sido detectados após revacinação. Resultados discordantes foram relatados por outros autores (LAMPE et al., 1985; MURPHY et al., 1984; MCGRAW, 1986). Em estudo realizado em nosso meio, LOPES et al. (1989) observaram que a revacinação de crianças primo-vacinadas antes de 12 meses resultou em eficácia sorológica e proteção clínica semelhante à observada em crianças vacinadas com uma dose após 12 meses de idade e recomendaram para países em desenvolvimento, um esquema de 2 doses, a primeira aos 8 meses e revacinação após 1 ano de idade.

Embora a revacinação durante surtos de sarampo tenha se mostrado eficaz na prevenção da doença em crianças que haviam sido vacinadas precocemente (SHASBY et al., 1977; DAVIS et al., 1987), estudos mais recentes têm demonstrado que a duração da imunidade conferida pela revacinação nem sempre é duradoura. MARKOWITZ et al. (1992), estudando a persistência de anticorpos após revacinação em estudantes sem anticorpos detectáveis pela reação de inibição da hemaglutinação, observaram, empregando a reação de neutralização por redução de placas, que todos os indivíduos sem anticorpos no momento da revacinação (falha vacinal primária), responderam e mantiveram títulos em níveis protetores durante 6 anos. Por outro lado, 36% daqueles com níveis baixos de anticorpos (falha vacinal secundária) apresentaram no mesmo período, queda nos títulos a níveis não protetores, isto é, inferiores a 120 (CHEN et al., 1990), embora todos tenham apresentado soroconversão logo após revacinação.

COHN et al. (1994), ao revacinar voluntários soronegativos, observou que apenas 58% desenvolveram e mantiveram os títulos de anticorpos no período de 1 ano, 12% não desenvolveram nenhuma resposta e 30%, que inicialmente haviam respondido, negativaram nesse período.

Baseada em dados de soroconversão e incidência por idade, a OMS recomenda nos países em desenvolvimento a vacinação de rotina aos 9 meses de idade, em que a eficácia varia de 80 a 90%. Em situações específicas, quando crianças mais jovens estiverem sob risco, tais como, durante epidemias, ou em campos de refugiados e hospitais, é recomendado o esquema de duas doses aos 6 e 9 meses. Nos países desenvolvidos, onde a persistência de anticorpos contra o sarampo é por tempo mais prolongado, a vacinação é realizada entre 12 e 15 meses de idade (CUTTS e MARKOWITZ, 1994).

Contudo, pesquisas encontram-se em andamento para diminuição da idade mínima para vacinação nos Estados Unidos, baseados no fato que atualmente neste país há predominância de nascimento de crianças de mães vacinadas (CARSON et al., 1995; WOOD e BRUNELL, 1995). Nestas crianças, há extinção mais rápida de anticorpos maternos (LENNON e BLACK, 1986; MALDONADO, 1995) porque as mesmas apresentam menores títulos de anticorpos ao nascimento, com decaimento mais rápido a níveis não detectáveis quando comparadas àquelas nascidas de mães que tiveram a doença (JENKS et al., 1988; PABST et al., 1992; KACICA et al., 1995).

Embora a vacinação atualmente previna mais de 1,5 milhão de mortes, estima-se ainda, que mais de 1 milhão de crianças, morram por ano devido a essa doença nos países em desenvolvimento (SABIN, 1992; CHILDREN, 1994).

4.3. Vacinas de altos títulos

Com a finalidade de superar o efeito de anticorpos maternos e assim possibilitar a vacinação de crianças mais jovens, os estudos se concentraram nas vacinas de altos títulos, como a vacina Edmonston-Zagreb, face à sua superioridade imunogênica quando comparada à cepa Schwarz (MARKOWITZ e BERNIER, 1987; KHANUM et al., 1987; SABIN et al., 1984).

Para avaliar a eficácia da vacina Edmonston-Zagreb de alto título, estudos foram realizados em países em desenvolvimento, tais como, México (MARKOWITZ et al., 1990), Perú (BERRY et al., 1992), Senegal (GARENE et al., 1991), Guiné-Bissau (AABY et al., 1988), Gambia (WHITTLE et al., 1984; 1988a; 1988b) e Haiti (JOB et al., 1991). Taxas de soroconversão entre 84 e 100% foram observadas em crianças entre 4 e 6 meses de idade, por essas pesquisas que utilizaram diferentes doses da vacina e diferentes vias de administração (aerosol e subcutânea). Contudo, por via intradérmica, MORAIS et al. (1994), relataram apenas 26-35% de soroconversão com a vacina Edmonston-Zagreb.

Com base nestes estudos, a OMS recomendou, em 1989, o uso da vacina Edmonston-Zagreb(E-Z) de alto título (dose de 5,0 log₁₀ UFP), aos 6 meses de idade, em países onde o sarampo era causa significativa de morte em crianças menores de 9 meses (WHO, 1990b).

Entretanto, estudo prospectivo realizado no Senegal por GARENE et al. (1991), apresentou evidências de uma maior mortalidade entre as crianças que receberam a vacina E-Z de alto título, em comparação com o grupo que recebeu a vacina Schwarz em dose padrão. Essa maior mortalidade, foi confirmada posteriormente por HOLT et al. (1993) e AABY et al. (1993b), em crianças do sexo feminino do Haiti e Guiné-Bissau, que haviam sido vacinadas com a vacina Edmonston-Zagreb de alto título. Os determinantes dessa maior mortalidade no sexo feminino ainda não foram esclarecidos (AABY et al., 1993b; AABY et al., 1994).

Frente a essas evidências a OMS desencorajou o uso dessa vacina, recomendando a revisão dos dados relativos à segurança, imunogenicidade e eficácia em crianças menores de 9 meses(WHO, 1992b).

Para verificar o papel imunossupressor prolongado dessa vacina, LEÓN et al. (1992), realizaram avaliação imunológica em crianças peruanas, 2-4 anos após administração de vacinas de altos títulos (Edmonston-Zagreb e Schwartz) e vacina padrão. Embora os resultados se encontrassem dentro dos parâmetros de normalidade, uma menor porcentagem de linfócitos CD4

e uma resposta mais baixa à estimulação por fitohemaglutinina foram observadas em crianças imunizadas com as vacinas de altos títulos.

Entretanto, SAMB et al., 1995, no Senegal, não observaram efeito imunossupressor prolongado dessa vacina. De acordo com esses autores, a idéia de uma imunossupressão clinicamente importante associada com a vacina Edmonston-Zagreb de alto título encontra pouco suporte, pelo fato de a vacina não estar associada com excesso de mortalidade em países de baixa taxa de mortalidade infantil. Além disso, em áreas com alta taxa de mortalidade, a comparação foi realizada somente com aqueles que receberam a vacina Schwarz, mas não em comparação com crianças não vacinadas. A menor mortalidade no grupo que recebeu a vacina Schwarz, foi atribuída a efeitos benéficos inespecíficos desta vacina na sobrevivência das crianças (AABY, 1993a; AABY et al., 1994; SAMB, 1995) por ativação inespecífica do sistema imunológico, produzindo proteção contra outros agentes infecciosos (AABY et al., 1995).

Outra vacina de uso corrente, a AIK-C em dose padrão, apresenta-se como uma forte candidata para imunização mais precoce. TIDJANI et al. (1989), observaram 85,8% de soroconversão quando aplicada a crianças entre 4 e 5 meses de idade. No mesmo estudo as vacinas Edmonston-Zagreb de alto título e a Schwarz, resultaram respectivamente em 90,8 e 42,7% de soroconversão.

BOLOTOWSKI et al. (1994), também comparando esta vacina com Edmonston-Zagreb, Leningrad 16 e Schwarz de títulos padrão e médio, em crianças de 6 meses de idade, observaram uma maior soroconversão (83%) com a vacina AIK-C em dose padrão.

5. RECOMENDAÇÕES PARA INVESTIMENTOS EM PESQUISAS EM SARAMPO

No encontro do "Children's Vaccine Initiative Ad Hoc Committee on Investment Strategy for Measles Control" (CHILDREN, 1994), realizado em março de 1993, foi delineado um documento consensual visando o controle global do sarampo. Este documento recomenda a melhoria e expansão do uso de vacinas correntes, bem como apoiar o desenvolvimento de novas vacinas, com uma estratégia de investimentos equilibrada. Novos recursos para pesquisa, tanto em nível de pesquisas básicas quanto aplicadas, deveriam ser mobilizados de acordo com as seguintes prioridades:

- **Imunologia:**-Os estudos imunológicos devem ser dirigidos para definir os componentes e mecanismos de imunidade protetora durável e a ontogenia da resposta imune ao vírus do sarampo
- **Virologia:**-Definir a relação estrutural e funcional do vírus do sarampo, em particular as características genéticas e distinção entre vírus atenuado e vírus selvagem; adquirir tecnologia para obtenção de clones infecciosos; definir e caracterizar os receptores celulares para o vírus.
- **Estudos clínicos:**- Definir os mecanismos de imunossupressão pós-sarampo; os cofatores envolvidos na doença grave (estado nutricional, infecções concomitantes, intensidade da exposição); avaliar os efeitos imunológicos da administração precoce das vacinas licenciadas.
- **Modelos animais:**- Estabelecer modelos em animais, para o estudo da virulência e patogênese do vírus, da imunossupressão pós-sarampo, do sarampo atípico e para o estudo das vacinas existentes e em desenvolvimento.
- **Desenvolvimento de novas vacinas:** Testar os candidatos a vacinas já existentes em animais e, quando apropriadas, em humanos. Estudar a aplicabilidade e eficácia de vias alternativas de administração; desenvolver novas vacinas para superar anticorpos maternos; que possam ser administradas por via oral, que sejam seguras, eficazes e termicamente estáveis.

- Estudos epidemiológicos e operacionais das estratégias de controle que visam avaliar a contribuição do sarampo na mortalidade infantil e o impacto da vacinação na saúde infantil, principalmente nos países em desenvolvimento; estabelecer uma vigilância global de cepas de vírus do sarampo; estudos prospectivos para estabelecer fatores de risco para doença grave; reforçar pesquisas para estabelecer estratégias.

6. PERSPECTIVAS DE NOVAS VACINAS

Com o objetivo de se obter uma vacina efetiva antes de 6 meses de idade, para utilização em países em desenvolvimento, um plano para o desenvolvimento de novas vacinas foi recentemente implantado pelo Programa Global para Vacinas e Imunização da OMS (OSTERHAUS et al., 1994).

Embora diversos países, incluindo o Brasil, não tenham atualmente necessidade de vacinas aplicáveis nessa idade, em virtude da manutenção de programas de controle do sarampo, novas vacinas capazes de superar os anticorpos maternos, que minimizem as falhas vacinais; que possam ser administradas por outras vias (mais fáceis e mais baratas) e que sejam termicamente estáveis são desejáveis e estudos nesta área tem sido incluídos entre as prioridades do Comitê em Estratégias de Investimento para o Controle do Sarampo (CHILDREN, 1994). Além disso, o desenvolvimento e distribuição dessas vacinas nos países em desenvolvimento resultaria em decréscimo na incidência da doença, diminuindo a probabilidade de importação de sarampo por outros países (WOOD e BRUNELL, 1995).

Atualmente, as pesquisas em novas vacinas contra o sarampo estão dirigidas principalmente às vacinas de vírus vivos recombinantes, utilizando-se como vetores, o vírus da vaccinia (DRILLIEN et al., 1988; WILD et al., 1992), vírus canaripox (TAYLOR et al., 1992) e Adenovírus (ALKHATIB et al., 1990; FOOKS et al., 1995). Nestas, genes codificadores de proteínas virais

envolvidas na indução de imunidade contra a infecção são clonados e inseridos no genoma do vetor, sendo o vírus da vaccinia um importante candidato. Este possui uma história de segurança e eficácia na erradicação da varíola, apresenta uma série de hospedeiros, e possui um genoma grande, onde um gene estranho pode ser inserido sem provocar distúrbios nas propriedades do vírus. Além disso, é uma vacina que apresenta baixo custo, tanto para produção quanto para administração e é eficaz, induzindo à resposta humoral e celular através de uma única inoculação. Outra característica importante é sua estabilidade térmica, não necessitando refrigeração, ao contrário do que ocorre com as vacinas atenuadas, onde a cadeia de frio é importante fator de falha vacinal (MACKETT e SMITH, 1986; OSTERHAUS et al., 1994).

Estudos com recombinantes de vírus da vaccinia expressando individualmente (DRILLIEN et al., 1988; BRINCKMANN et al., 1991) ou em conjunto (WILD et al., 1992), os antígenos H, F e NP do vírus do sarampo, demonstraram a capacidade destes recombinantes de induzirem resposta imunológica neutralizante.

DRILLIEN et al. (1988) imunizaram camundongos, através de escarificação, com vírus da vaccinia recombinante codificando os antígenos H ou F. O recombinante codificando antígeno H induziu à produção de anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação. O recombinante contendo o gene F, por outro lado, induziu apenas à produção de anticorpos neutralizantes. Entretanto, em ambos houve proteção contra uma dose letal de cepa de vírus de panencefalite esclerosante sub-aguda, 3 semanas após imunização.

Posteriormente, WILD et al., 1992, desenvolveram vírus da vaccinia recombinante expressando isoladamente o antígeno H, ou conjuntamente, H e F; H e NP ou H, F e NP. Camundongos imunizados com os diferentes recombinantes apresentaram níveis similares de anticorpos neutralizantes que permaneceram constantes por um período de observação de 7 meses.

Outra vacina, cuja aplicação tem sido considerada, é aquela produzida através de incorporação de proteínas de membrana do vírus a estruturas denominadas ISCOM (complexo imunoestimulante). A matrix do iscom é composto de um glicosídeo (Quil A), extraído da casca da *Quillaja saponaria*, que se apresenta na forma micelar na concentração crítica de 0,03%. Nesta forma micelar, o Quil A, apresenta provavelmente regiões que permitem interações hidrofóbicas com as proteínas de membrana para formação dos complexos (MOREIN et al., 1984), dando origem a estruturas moleculares estáveis, com diâmetro médio de 35 nm (TAKAHASHI et al., 1990).

A vantagem dos ISCOMs com antígenos de membrana do vírus do sarampo, quando inoculados em camundongos, reside no fato de que induzem não somente à produção de anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação, como anticorpos anti-glicoproteína F, isto é, anticorpos inibidores de hemólise e de fusão. Estes anticorpos não são produzidos pela administração de vacinas inativadas (NORRBY, 1975). Além disso, não foram observados eventos adversos após sua administração (MOREIN et al., 1984; DE VRIES et al., 1988).

A melhor resposta imunológica induzida pelos ISCOMs, em relação às vacinas inativadas ou compostas de subunidades, parece ser devido à via de processamento para apresentação dos antígenos, que ocorre tanto a nível de linfócitos T que reconhecem antígenos do complexo principal de histocompatibilidade da classe I (Tcitotóxico - CD8) quanto da classe II (T auxiliar - CD4). (BINNENDIJK et al., 1992; TAKAHASHI et al., 1990).

Os peptídeos sintéticos (OBEID et al., 1994) apresentam-se também como candidatos a vacinas. PARTIDOS et al. (1991), demonstraram a capacidade destes peptídeos de induzirem produção de anticorpos contra o vírus do sarampo em camundongos. A ausência de interferência de anticorpos maternos na produção destes anticorpos foi demonstrada por OBEID e STEWARD (1994).

7. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE VACINAS

Novos candidatos a vacinas, após comprovação de sua eficácia em animais são avaliados em seres humanos. Inicialmente as vacinas são aplicadas em voluntários, para avaliar a segurança, a dose necessária e ainda obter informações preliminares quanto à imunogenicidade (Fase I). A etapa seguinte (Fase II) compreende testes expandidos acerca da segurança e imunogenicidade, assim como estudos preliminares de eficácia (HERRINGTON, 1990). As fases subsequentes (Fases III e IV), que compreendem estudos de campo de eficácia de vacinas, podem ser avaliadas pela resposta imunológica pós-vacinal, que é o método mais simples e rápido, embora não substitua a avaliação direta da proteção clínica (CLEMENS e STANTON, 1990).

No caso do sarampo, a eficácia de vacinas é comumente avaliada pela sorologia (eficácia sorológica). A principal vantagem desse método de avaliação é que não requer exposição à doença, tendo porém, a desvantagem de fornecer somente uma medida indireta da proteção clínica conferida pela vacina (MARKS et al., 1982).

Em todas as etapas de avaliação de novas vacinas, assim como no estudo de novos esquemas vacinais com as vacinas atualmente disponíveis, os métodos sorológicos assumem um papel fundamental. Os métodos sorológicos mais frequentemente utilizados são a reação de inibição da hemaglutinação (RIH), a reação de neutralização por redução de placas (RNP) e ELISA-IgG (WHO, 1990). Além destes, outros métodos, tais como imunofluorescência indireta (RIF) (SOUZA et al., 1990) e "immunodot" (VAZ DE LIMA et al., 1994), tem sido avaliados em nosso meio.

A reação de inibição da hemaglutinação (NORRBY, 1962), além de apresentar menor sensibilidade, tem como fator limitante, o uso exclusivo de hemácias de macaco, que são de difícil obtenção. Por outro lado, a reação de neutralização por redução de placas (ALBRECHT et al., 1981), embora altamente sensível, é tecnicamente complexa e demorada (WHO, 1990a).

Sua alta sensibilidade torna seu emprego importante na determinação de anticorpos passivos e na identificação de falhas vacinais secundárias.

A técnica de ELISA, introduzida para o sarampo por VOLLER e BIDWELL, em 1976, é um método bastante sensível, de execução simples e rápida. SOUZA et al. (1991), ao comparar esta técnica com as reações de inibição da hemaglutinação, neutralização por redução de placas e imunofluorescência indireta(IgG), consideraram as vantagens da técnica de ELISA(IgG) em virtude da maior facilidade de execução e sensibilidade equivalente à reação de neutralização por redução de placas, quando aplicada a soros de crianças vacinadas.

Aplicando-se estas técnicas, que permitem determinar anticorpos IgG (ELISA e RIF) ou anticorpos de classe não especificada (RIH ou RNP), as avaliações sorológicas de vacinas são rotineiramente realizadas através de soroconversão, isto é, por resultado negativo na amostra pré-vacinal e positividade após vacinação. Contudo, quando anticorpos de origem materna estão presentes na amostra pré-vacinal, a soroconversão é definida pelo aumento de 4 vezes nos títulos de anticorpos. A soropositividade é definida pela presença de anticorpos em títulos iguais ou superiores a 100 mUI/ml e a sua determinação é realizada utilizando-se soro padrão. A definição de soropositividade em unidades internacionais é importante para se ter uma maior homogeneidade nos estudos de avaliação de vacinas do sarampo, porque as diversas técnicas sorológicas apresentam diferentes sensibilidades (WHO, 1988)

A metodologia de avaliação sorológica de vacinas com duas amostras de sangue é utilizada com a finalidade de evitar a inclusão no estudo, de crianças previamente imunizadas. Esse cuidado é necessário porque informações incorretas acerca da história vacinal ou doença são frequentes. PANNUTI et al. (1987) observaram em um estudo realizado na cidade de São Paulo, que 31 de 285 (10,8%) crianças que receberam a vacina contra o sarampo na ausência de história de vacinação ou doença, de acordo com informações da mãe, apresentavam anticorpos na amostra pré-vacinal, em títulos sugestivos de infecção pregressa e não de anticorpos transferidos

através da placenta. SABIN et al. (1983), em estudo realizado no México, relatou 43% de soropositividade, com títulos indicativos de imunidade, em amostras pré-vacinais de crianças entre 12 e 47 meses de idade, que haviam sido selecionadas para vacinação, em virtude de ausência de história de imunização anterior ou doença.

Como a ausência de anticorpos na amostra pré-vacinal não assegura tratar-se de primo-vacinação, devido a falhas vacinais secundárias ou a informações incorretas, essa metodologia de avaliação poderia apresentar erros por estar sendo aplicada a crianças previamente estimuladas com antígenos do vírus do sarampo.

Nas falhas vacinais primárias, não há estimulação antigênica durante a primeira imunização, e a criança responderá a uma reimunização, por meio de uma resposta do tipo primária (HAYDEN, 1979), com elevação lenta de anticorpos e em títulos mais baixos (HIDAKA et al., 1994).

Nas falhas vacinais secundárias, entretanto, embora haja estimulação antigênica, há decaimento dos anticorpos a níveis não detectáveis pelas técnicas empregadas usualmente e a resposta a uma reimunização será do tipo secundário, com elevação nos títulos de anticorpos maior e mais rápida que numa estimulação primária (HIDAKA et al., 1994). A inclusão destes casos na avaliação de vacinas poderia superestimar a eficácia de uma vacina.

Além disso, dois outros inconvenientes podem ser observados nessa metodologia, a saber, necessidade de duas amostras de sangue e possibilidade de perdas durante a pesquisa ocasionada por crianças que não retornam para a coleta da amostra pós-vacinal.

Embora a determinação de anticorpos específicos da classe IgM em apenas uma amostra seja rotineiramente utilizada para diagnóstico de infecção recente, não tem sido empregada para avaliação sorológica de vacinas. VAZ DE LIMA et al. (1994) avaliaram o dot-ELISA para pesquisa de anticorpos IgM contra o sarampo em amostras pós-vacinais de crianças

vacinadas e relataram 92,3% de positividade em amostras colhidas 30 dias após vacinação. Entretanto, esta técnica é demorada e de difícil aplicação em larga escala. Além disso, a positividade para anticorpos IgM não discrimina imunização primária de uma reimunização, já que essa classe de imunoglobulina foi detectada em casos de sarampo em crianças com falhas vacinais secundárias (ERDMAN et al., 1993).

Para diagnóstico sorológico de infecção primária recente, uma nova alternativa para substituir a pesquisa de anticorpos IgM é a determinação de anticorpos IgG de baixa avidéz.

8. AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG

8.1. Mecanismo de maturação da afinidade de anticorpos IgG

Em imunização primária com antígeno proteico, a resposta humoral inicia-se pela ligação do antígeno a receptores de membrana (IgM e IgD) presentes em linfócitos B, os quais são induzidos por linfócitos T auxiliares, à proliferação com expansão do clone e diferenciação. Durante o processo de diferenciação, ocorrem diversos fenômenos imunológicos, tais como, a produção de diferentes classes de imunoglobulinas, a maturação da afinidade de anticorpos e a geração de células de memória. Inicialmente são produzidos predominantemente anticorpos da classe IgM, porque as células estimuladas primeiro expressam apenas IgM. Embora parte das células apresentem receptores de membrana constituídos de IgM e IgD, esta última não é secretada. Por indução de novos isotipos("isotype switch"), há então, diferenciação de clones produtores de anticorpos de outras classes (IgG, IgA). Essa resposta humoral inicialmente consiste de anticorpos de baixa afinidade, que no decorrer do tempo são substituídos por aqueles de maior afinidade. A esse fenômeno denominamos maturação da afinidade(ABBAS, 1994; NOSSAL, 1992)).

Esta maturação ocorre através de mutação somática nos genes que codificam a região hipervariável (CDR1, CDR2 e CDR3) das cadeias L e H

da imunoglobulina, quando linfócitos B sensibilizados migram para centros germinativos presentes nos órgãos linfóides. Neste local, ocorre uma proliferação rápida das células, com intensa mutação da região hipervariável do gene que codifica a imunoglobulina. Ao mesmo tempo, os anticorpos circulantes se ligam a antígenos residuais, levando à ativação do sistema complemento. Os complexos imunes concentram-se, então, nas células dendríticas foliculares através de ligação com receptores para Fc e C3b presentes nestas células. Há então, interação das imunoglobulinas de membrana dos linfócitos mutados com pequenas quantidades de antígenos expostos nas células dendríticas foliculares. Os linfócitos B hipermutados que apresentarem receptores com baixa afinidade, ou que não reconhecerem o antígeno presente nas células dendríticas foliculares serão eliminados.

Por outro lado, os linfócitos B que apresentarem interação de alta afinidade, serão selecionados e sobrevivem, deslocando-se para áreas adjacentes aos folículos linfóides, e desenvolvendo-se em células produtoras de anticorpos de alta afinidade. Parte dessas células migra para a polpa vermelha do baço, córtex e medula dos linfonodos e medula óssea, tornando-se esta última, 2 a 3 semanas após a imunização, o principal local de produção de anticorpos de alta afinidade. Outra parte destas células hipermutadas se diferencia em células de memória, que podem sobreviver na circulação por meses ou anos na ausência de estímulo antigênico. As células de memória, numa imunização secundária, desenvolverão uma resposta humoral constituída basicamente de anticorpos de alta afinidade.

Esta resposta ocorre mais rapidamente que numa resposta primária, e na presença de menor quantidade de antígeno (MOND et al., 1974; STEINER e EISEN, 1967b).

8.2. Importância da afinidade de anticorpos IgG nas doenças infecciosas

Essa mudança sequencial na afinidade dos anticorpos IgG durante uma imunização (EISEN e SISKIND, 1964; STEINER e EISEN, 1967a) permite portanto, distinguir uma infecção primária recente de uma infecção passada ou reinfecção e a determinação de anticorpos de baixa afinidade tem se apresentado como uma ferramenta eficaz no diagnóstico de diversas doenças infecciosas (HEDMAN et al., 1993).

Além da aplicação diagnóstica, a importância da afinidade dos anticorpos na patogênese das doenças infecciosas tem sido objeto de recentes estudos. A maior eficiência dos anticorpos de alta afinidade foram relatadas nas funções imunológicas mediadas por anticorpos, tais como, na reação de fixação do complemento (FAUCI et al., 1970), na neutralização de vírus (BLANK et al., 1972), na atividade bactericida (HETHERINGTON e LEPOW, 1992) e na eliminação imunológica de antígenos solúveis (ALPERS et al., 1972).

O papel protetor dos anticorpos de alta afinidade na transmissão vertical do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi relatada por DEVASH et al., em 1990. Neste estudo, todas as 11 mães de recém-nascidos infectados pelo HIV, apresentaram anticorpos anti gp120 de baixa afinidade, em contraste com as 4 mães de crianças não infectadas, com anticorpos de alta afinidade.

CHARGELEGUE et al. (1993; 1995) demonstraram a correlação da afinidade de anticorpos IgG contra os antígenos p24 e p17 em pacientes HIV positivos na progressão da doença. Os autores concluíram que a presença de anticorpos de baixa afinidade e a progressiva redução nos títulos de anticorpos são melhores na predição precoce da evolução da doença do que a contagem de células CD4. Por outro lado, a afinidade dos anticorpos contra a glicoproteína gp-41 do HIV, apresentaram um comportamento diferente, com uma correlação positiva com a duração da infecção (RADKOWSKI et al., 1993). Diferenças na maturação da afinidade de

anticorpos contra diferentes antígenos foram também relatadas por MAURACHER et al. (1992), estudando a avidéz de anticorpos contra as proteínas E1 e E2 do vírus da rubéola.

BROWN et al. (1984), demonstraram menor afinidade de anticorpos anti-HBs do vírus da hepatite B em pacientes com hepatite crônica, quando comparados com pacientes com hepatite aguda.

WEN et al. (1990), estudando afinidade de anticorpos anti-Hbc em pacientes com hepatite crônica e portadores assintomáticos, também demonstraram maior afinidade dos anticorpos nos portadores assintomáticos.

A afinidade do anticorpo é definida pela força de ligação entre um epítipo e o anticorpo, e é resultante de forças atrativas e repulsivas entre as moléculas envolvidas (STEWART e LEW, 1985). Entretanto, para antígenos complexos, com múltiplos determinantes antigênicos, como os microrganismos, as reações antígeno-anticorpo, envolvem a ligação de diversos epítipos com os anticorpos correspondentes. A força de ligação resultante de todas essas ligações, é denominada avidéz de anticorpos ou afinidade funcional (UNDERWOOD, 1988).

8.3. Métodos para determinação da avidéz de anticorpos

A avidéz de anticorpos pode ser determinada por diversas técnicas. As técnicas clássicas, baseadas no cálculo da constante de equilíbrio (UNDERWOOD, 1988), embora sejam os métodos mais precisos, não são aplicáveis em rotina diagnóstica, devido à sua complexidade.

São também de relativa complexidade, o radioimunoensaio com duplo radioisótopo (GAZE et al., 1973; WEN et al., 1990, CHARGELEGUE et al., 1993, 1994), a técnica de competição (SIMON et al., 1993) e de curva dose-resposta (RADKOWSKI et al., 1992, LEHTONEN e MEURMAN, 1982), que

foram utilizados para estudar a afinidade dos anticorpos na patogênese de diversas doenças.

Para aplicação diagnóstica, a avidéz de anticorpos tem sido determinada empregando-se mais frequentemente a reação imunoenzimática (ELISA) com duas técnicas principais, descritas a seguir.

- Prevenção da formação do complexo antígeno-anticorpo (princípio da diluição), que consiste na adição de agentes caotrópicos (Dietilamina ou Guanidina-HCl) ao diluente do soro (DEVEY et al., 1988; INOUE et al., 1984).

- Dissociação do complexo antígeno-anticorpo (princípio da eluição), através de tratamento da placa com agentes caotrópicos (urêia ou tiocianato) (HEDMAN e SEPPALA, 1988; PULLEN et al., 1986)

Utilizando o método de inibição da ligação de anticorpos de baixa avidéz ao antígeno da fase sólida (princípio da diluição), com guanidina-HCl adicionada ao diluente do soro, INOUE et al. (1984) pesquisaram anticorpos de baixa avidéz em infecções passadas e recentes pelos vírus da encefalite japonesa, rotavírus e rubéola.

Baseado no mesmo princípio, DEVEY et al. (1988), utilizando a dietilamina (DEA) como agente caotrópico, determinaram a avidéz de anticorpos IgG1 e IgG4 contra o toxoide tetânico. Posteriormente esta técnica foi empregada também por THOMAS e MORGAN-CAPNER (1988, 1991a) para determinar avidéz de anticorpos das sub-classes IgG1 e IgG3 contra o vírus da rubéola. Utilizando esta técnica, THOMAS et al. (1992), demonstraram a superioridade da determinação de anticorpos IgG1 de baixa avidéz contra o vírus da rubéola para diagnóstico de infecção primária pelo vírus da rubéola em amostras colhidas mais tardiamente. Anticorpos de baixa avidéz foram detectados em 91% das amostras colhidas 3 a 4 meses após o aparecimento do exantema, onde apenas 9% apresentavam anticorpos da classe IgM.

Entretanto, o método é de difícil aplicação em larga escala, porque é necessário proceder-se à titulação do soro por meio de diluições em PBS e em DEA. O "DEA-shift", é então calculado, a partir de gráficos obtidos com as absorbâncias nas várias diluições do soro nos dois diluentes(THOMAS, 1989).

Além disso, a dietilamina como agente caotrópico foi questionado por GOLDBLATT et al. (1993). De acordo com esses autores, resultados semelhantes foram obtidos com solução tamponada alcalina(pH 11,3) e DEA, o que sugere que a inibição da ligação do anticorpo ao antígeno descrito com a utilização do DEA, se deve essencialmente ao pH alcalino provocado pela diluição do DEA no tampão.

O princípio da eluição, com finalidade diagnóstica, foi utilizada pela primeira vez por PULLEN et al. (1986), para determinação da avididade de anticorpos anti-vírus da rubéola. Neste estudo, os autores empregaram como agente dissociante do anticorpo complexado ao antígeno na fase sólida, o tiocianato de amônia, mas seu emprego tem sido limitado (FITZGERALD et al., 1988).

O método utilizando a uréia como agente caotrópico, foi introduzido por HEDMAN e SEPPALA(1988) que, comparando diversos outros agentes como SDS, tiocianato de potássio, pH ácido e guanidina-HCl, relataram melhores resultados com a uréia, para distinção entre infecção aguda e infecção passada pelo vírus da rubéola. Posteriormente, ENDERS e KNOTEK (1989), aplicaram este método para determinação de avididade de sub-classes de IgG contra o vírus da rubéola.

Desde então, a técnica de ELISA, utilizando a uréia tem sido a mais aplicada com essa finalidade em outras infecções virais, tais como as causadas por citomegalovírus (BLACKBURN et al., 1991), Vírus Respiratório Sincicial (MEURMAN et al., 1992), Vírus da hepatite C (WARD et al., 1994), Parvovírus B-19 (SODERLUND et al., 1995), vírus de Epstein-Barr (GRAY, 1995), vírus da varicela (JUNKER e TILLEY, 1994). O método também tem

sido largamente empregado no diagnóstico de toxoplasmose (CAMARGO et al., 1991; HEDMAN et al., 1989a; LAPPALAINEN et al., 1993)

Com relação ao vírus do sarampo, este método foi utilizado por TUOKKO (1995), para diagnóstico de doença, que observou baixa avidéz (I.A.<30%), em todas as amostras colhidas até 7 semanas após o aparecimento do exantema.

Além do ELISA, outras técnicas sorológicas foram empregadas na determinação da avidéz, utilizando o mesmo princípio acima citado.

KANGRO et al. (1991), empregando o radioimunoensaio, estudaram a avidéz de anticorpos contra o vírus da varicela-zoster.

A técnica de imunofluorescência indireta, foi empregada por WARD et al. (1993a, 1993b) e WARD & GRAY (1994) para o estudo de avidéz de anticorpos em infecções pelo Herpesvirus 6. Posteriormente, essa técnica foi empregada para outros vírus, tais como, citomegalovírus (LUTZ et al., 1994), vírus de Epstein-Barr (GRAY,1995; ORY et al.,1993) e parvovírus B-19 (GRAY et al., 1993)

A determinação da avidéz de anticorpos IgG, pela sua capacidade de distinguir infecção primária de reinfecção apresentaria grandes vantagens na avaliação da eficácia sorológica de vacinas do sarampo administradas em dose única, pois permitiria discriminar, com uma única amostra pós-vacinal, as crianças que já foram previamente estimuladas com antígenos do vírus.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a utilização da determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-sarampo na avaliação sorológica de vacinas contra o sarampo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Padronizar uma técnica imunoenzimática para determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-sarampo, empregando a uréia como agente caotrópico.

2. Após a definição das condições adequadas de execução do teste, avaliar a aplicabilidade do método para avaliação de eficácia sorológica de vacinas, em amostra sérica única, determinando:

a) A evolução temporal da avidéz de anticorpos IgG após primo-infecção pelo vírus vacinal;

b) A avidéz de anticorpos IgG em primo-vacinação, em reinfeção, após revacinação de crianças com falhas vacinais e em infecção passada;

c) Os parâmetros de credibilidade do teste (sensibilidade, especificidade e valores preditivos)

3. Avaliar a aplicabilidade do método após vacinação com diferentes tipos de vacina em amostras colhidas por diferentes métodos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. AMOSTRAS DE SORO E ELUATOS

Foram incluídas no presente estudo, 579 amostras de soro que apresentaram títulos de anticorpos IgG anti-sarampo superiores a 100 mUI/ml pela técnica de ELISA, as quais foram agrupadas segundo tipo de vacina, história de imunização anterior e sorologia pré-vacinal (Tabela 3).

GRUPO 1 (PRIMO-INFECÇÃO VACINAL): Neste grupo foram incluídas 406 amostras de soro de crianças vacinadas contra o sarampo, sem história anterior de vacinação ou doença e que não apresentaram anticorpos na amostra pré-vacinal. Este grupo foi dividido em sub-grupos, de acordo com o tipo de vacina.

O sub-grupo BK, constituído de 127 amostras colhidas 14 a 62 dias após vacinação aos nove meses de idade com a vacina do sarampo cepa Biken-CAM70, no período de agosto a dezembro de 1984, nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) de São Paulo.

O sub-grupo EZ, constituído de 37 amostras de crianças vacinadas aos 9 meses de idade na UBS de Vila Mariana, com a cepa Edmonston-Zagreb (7.000 DICT₅₀/0,5ml), por via intradérmica, no período de junho a setembro de 1991, colhidas 47 a 87 dias após vacinação.

O sub-grupo SW, constituído de 242 amostras colhidas em papel de filtro de acordo com a técnica de SOUZA e CAMARGO (1966), 42 a 70 dias após vacinação, de crianças vacinadas aos 9 meses de idade nas UBSs do Município de Ribeirão Preto com a cepa Schwarz, no período de setembro de 1992 a fevereiro de 1993.

GRUPO 2 (REINFECÇÃO/FALHA VACINAL): Neste grupo foram incluídas 41 amostras de soro de crianças vacinadas contra o sarampo com a cepa Biken-CAM70 na idade entre 9 e 144 meses nas UBSs de São Paulo, no período de agosto a dezembro de 1984, que no momento da vacinação apresentaram história de vacinação ou doença e/ou anticorpos na amostra

pré-vacinal. As amostras que foram colhidas 14 a 39 dias após vacinação, foram divididas em sub-grupos de acordo com história de imunização prévia e sorologia pré-vacinal.

O sub-grupo $H_{(-)}S_{(+)}$ constituiu-se de 26 amostras de crianças que no momento da vacinação não apresentaram história prévia de imunização ou doença, porém apresentaram anticorpos na amostra pré-vacinal em títulos indicativos de infecção prévia e no sub-grupo $H_{(+)}S_{(+)}$ as 10 amostras eram provenientes de crianças que no momento da vacinação apresentaram história de vacinação anterior e anticorpos na amostra pré-vacinal (REINFECÇÃO).

No sub-grupo $H_{(+)}S_{(-)}$ (FALHA VACINAL) as 5 amostras eram provenientes de crianças que no momento da vacinação, embora apresentassem história de vacinação, a sorologia pré-vacinal foi negativa.

GRUPO 3 (INFECÇÃO VACINAL PREGRESSA): Foram estudados 90 soros provenientes de crianças vacinadas contra o sarampo na UBS de Cotia, com duas doses da vacina Biken-CAM 70, aos 6 e 11 meses de idade, no período de novembro de 1986 a setembro de 1988, e que foram colhidas 5 a 17 meses após administração da segunda dose. Nesse período as crianças não apresentaram história de sarampo.

GRUPO 4 (TRANSFERÊNCIA PLACENTÁRIA): 42 soros de cordão umbilical, colhidos no Hospital do Servidor Público de São Paulo, no período de novembro de 1980 a agosto de 1981.

Todas as amostras foram mantidas estocadas a -20°C e processadas no período compreendido entre março de 1992 a janeiro de 1994.

TABELA 3. Distribuição da população em grupos, segundo tipo de vacina, história de imunização prévia e sorologia pré-vacinal.

GRUPO	SUB-GRUPO	Nº	VACINA	IMUNIZAÇÃO ANTERIOR	SOROLOGIA PRÉ-VACINAL
1	BK	127	Biken CAM70	Negativa	Negativa
Primo-infecção vacinal	EZ	37	Edmonston-Zagreb	Negativa	Negativa
	SW	242	Schwarz	Negativa	Negativa
2	H ₍₋₎ S ₍₊₎ *	26	Biken CAM70	Negativa	Positiva
Reinfecção/	H ₍₊₎ S ₍₊₎	10	Biken CAM70	Positiva	Positiva
Falha vacinal	H ₍₊₎ S ₍₋₎	5	Biken CAM70	Positiva	Negativa
3					
Infecção Pregressa		90	Biken CAM70	-	-
4					
Transferência placentária		42	Soros de cordão umbilical		

*H₍₋₎; H₍₊₎: história de vacinação negativa e positiva
 S₍₋₎; S₍₊₎: sorologia pré-vacinal negativa e positiva

2. SOROLOGIA

Anticorpos IgG contra o vírus do sarampo foram determinados por reação imunoenzimática (ELISA) de acordo com a técnica descrita por SOUZA et al. (1991) com algumas modificações.

2.1.Preparo do antígeno

As garrafas tipo Roux, contendo monocamada de células VERO foram inoculadas com cerca de 3 ml de suspensão de vírus do sarampo, amostra Toyoshima, obtido no Instituto Adolfo Lutz. Após incubação durante uma hora a 37°C, para adsorção dos vírus às células, adicionaram-se 70 ml de meio de Eagle(MEM) contendo 1% de soro fetal bovino(Cultilab), 100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 2µg/ml de anfotericina B. Após 4 a 5 dias de incubação a 37°C, quando mais de 75% de efeito citopático era observado, as células foram destacadas da garrafa com pérolas de vidro. A suspensão celular obtida, foi então centrifugada durante 10 minutos a 800g e o sedimento lavado 3 vezes com PBS (solução salina fosfatada, pH 7,2) estéril. O sedimento resultante foi ressuspenso em volume de PBS correspondente a 1:50 do volume de fluido original e submetida à ruptura por ultra-som durante 1 minuto. Após adição de igual volume de solução a 0,5% de desoxicolato de sódio (Difco) em PBS e incubação a 4°C durante 1 hora, com agitações frequentes, a suspensão foi clarificada por centrifugação em microcentrífuga a 6.500g durante 1 minuto. O sobrenadante foi então, dividido em alíquotas e conservado a -70°C.

O antígeno controle foi preparado simultaneamente, com células VERO não infectadas.

2.2. Preparo das placas

As diluições ótimas dos antígenos viral e controle, para sensibilização das placas, foram determinadas por titulação em bloco, após ajustar as concentrações proteicas dos mesmos, determinadas pela técnica de BRADFORD (1976). Para titulação dos antígenos, foram utilizados 1 soro controle positivo de título baixo, 1 soro positivo de título elevado e 2 soros negativos

Em colunas alternadas da placa de microtitulação (Hemobag), foram colocados 50 µl da diluição ótima do antígeno viral, seguidas da diluição correspondente de antígeno controle. As placas foram então incubadas em câmara úmida, durante 2 horas à temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com PBST (PBS contendo 0,1% de Tween 80 e timerosal a 1:10.000) e utilizadas no mesmo dia ou conservadas a -70°C por períodos inferiores a 1 semana, acondicionadas em sacos plásticos e caixas de isopor.

2.3. ELISA - Avidéz de IgG

A determinação da avidéz de IgG através da técnica ELISA, foi realizada segundo técnica descrita por HEDMAN e ROUSSEAU (1989), com algumas modificações.

Para bloqueio dos sítios livres de adsorção da placa, as placas foram inicialmente incubadas durante 1 hora a 37°C com 100µl de solução bloqueadora (SB), constituída de PBST contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). Após desprezar-se a solução bloqueadora, foram adicionados 50 µl de soro diluído a 1:100 em SB, em 2 cavidades contendo antígeno viral e duas com antígeno controle. Após incubação a 37°C durante 1 hora, as mesmas foram lavadas 2 vezes com PBST e incubadas com 100µl de PBST contendo ou não uréia. Após duas novas lavagens, adicionaram-se, então, 50µl de conjugado anti IgG humano com peroxidase (Sigma), na diluição ótima (1:1.000), em SB. Após incubação a 37°C durante 40 minutos,

as placas foram lavadas 4 vezes com PBST, adicionando-se a seguir, 50 μ l de solução de substrato e cromógeno (peróxido de hidrogênio (Sigma) a 0,03% e O-fenilenodiamina (Sigma) a 0,4mg/ml em tampão citrato 0,1M, pH 5,0). Após incubação à temperatura ambiente, em câmara escura, durante 20 minutos, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ l de H₂SO₄ 2,5N, procedendo-se à leitura a 492 nm em espectrofotômetro de placas (Titertek Multiskan II).

Os resultados, expressos como Δ DO (Diferença de Densidade Óptica), foram calculados, subtraindo-se da absorbância da cavidade com antígeno viral, aquela obtida com o controle de células.

O índice de avides (I.A.) foi calculado segundo a equação:

$$\text{I.A.(\%)} = \frac{\Delta\text{DO COM URÉIA}}{\Delta\text{DO SEM URÉIA}} \times 100$$

2.4. Padronização da concentração de uréia e do tempo de exposição.

Para a padronização da concentração ótima de uréia e o tempo adequado de exposição, foram selecionados dentre as amostras da população estudada, dois grupos de amostras. O grupo A constituiu-se de 22 amostras pós-vacinais de crianças do grupo INFECÇÃO PRIMÁRIA, cujas amostras pós-vacinais foram colhidas 56 a 87 dias após a vacinação e o grupo B, constituído de 29 soros do grupo REINFECÇÃO, colhidos 14 a 39 dias após vacinação e 8 soros do grupo INFECÇÃO PREGRESSA, colhidos 5 a 17 meses após administração da segunda dose de vacina.

As amostras foram testadas com uréia 6, 7 e 8M, com exposição por 5 minutos e uréia 7M, durante 10 minutos.

2.5.Determinação dos títulos de anticorpos anti-sarampo.

Para determinação dos títulos de anticorpos anti-sarampo, expressos em mili-unidades internacionais(mUI/ml), utilizou-se soro de referência fornecido pelo National Institute for Biological Standards and Control, Hertford, Inglaterra. A curva padrão foi construída com diluições seriadas do soro, contendo 20, 10, 5, 2 e 1 mUI/ml, que foram incluídas em cada série de reações. Os títulos foram calculados através de reta de regressão, utilizando-se programa de computador (Microsoft Excel 5.0).

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo uso de programa de computador Statgraphics 5.0. A comparação das frequências foi feita pelo teste de χ^2 . Para análise dos dados quantitativos, foi empregado o teste de análise de variância múltipla (ANOVA), após avaliação da homogeneidade das variâncias. Foram consideradas significantes as diferenças entre valores cuja probabilidade de igualdade foi menor que 0,05 (WOOLSON, 1987).

RESULTADOS

1. PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG ANTI-SARAMPO

1.1. Padronização da concentração de uréia e tempo de exposição

Inicialmente as amostras foram analisadas com uréia nas concentrações 8, 7 e 6M, com exposição durante 5 minutos.

Utilizando um *cut-off* de 30%, de acordo com o critério de HEDMAN e ROUSSEAU (1989), as concentrações de uréia de 7 e 6 M, não permitiram uma discriminação satisfatória de infecção primária (Grupo A) de reinfecção e infecção passada (Grupo B). Com a uréia 6 M (Fig. 3), apenas uma amostra do grupo A apresentou Índice de Aidez (I.A.) inferior a 30% e com a uréia 7M, 3/22 (13,6%) deste grupo apresentaram I.A. superiores a 30% (Fig.4).

A concentração de uréia 8M, por outro lado, revelou 4/37 (10,8%) das amostras do grupo de reinfecção (Fig.5), com índices de aidez inferiores a 30%.

Optamos então por aumentar o tempo de exposição à uréia 7M para 10 minutos. Essas condições permitiram uma separação nítida dos 2 grupos (Fig.6), tendo sido por isso escolhida para utilização no presente estudo.

Fig. 3 . Índices de avidéz em infecção primária (grupo A) e reinfecção ou infecção passada (grupo B) utilizando uréia 6M/5min.

Fig. 4. Índices de avidéz em infecção primária (grupo A) e reinfecção ou infecção passada (grupo B) utilizando uréia 7M/5min.

Fig. 5. Índices de avidéz em infecção primária (grupo A) e reinfeção ou infecção passada (grupo B) utilizando uréia 8M/5min.

Fig. 6. Índices de avidéz em infecção primária (grupo A) e reinfeção ou infecção passada (grupo B) utilizando uréia 7M/10min.

1.2. Avidéz de anticorpos IgG após primo-vacinação

O estudo da avidéz de anticorpos IgG em imunização primária, durante a padronização e avaliação do método, foi realizada em 164 amostras provenientes de crianças vacinadas contra o sarampo aos 9 meses, pertencentes aos sub-grupos BK e EZ, do grupo 1, isto é, soros provenientes de crianças sem história de imunização anterior e que não apresentaram anticorpos anti-sarampo na amostra pré-vacinal.

1.2.1. Determinação do valor limite (*cut-off*) do Baixo Índice de Avidéz (BIA) para definição de infecção primária pelo vírus vacinal.

Para determinação do *cut-off* do Baixo Índice de Avidéz para definição de infecção primária pelo vírus vacinal, as 164 amostras, foram agrupadas de acordo com o tempo decorrido entre a vacinação e a coleta da amostra pós-vacinal, determinando-se as respectivas médias e desvios-padrão dos índices de avidéz (Tabela 4).

Tabela 4. Índices médios de avidéz e desvio padrão em soros de crianças primo-vacinadas aos 9 meses, de acordo com a época de coleta da amostra pós-vacinal

Coleta	Nº amostras	I.A.média	Desvio padrão
<6 semanas	118	7,86	4,41
6-8 semanas	22	14,89	4,71
>8 semanas	24	18,53	9,07

Nos soros colhidos com menos de 6 semanas, o I.A. médio foi 7,86, com desvio padrão igual a 4,41. As amostras colhidas entre 6 e 8 semanas, apresentaram I.A. médio de 14,89 e desvio padrão de 4,71. Após 8 semanas o I.A. médio e desvio padrão foram respectivamente 18,53 e 9,07.

O valor limite para BIA foi então calculado através da média (14,89) mais 3 desvios-padrão (3x4,71) das amostras pós-vacinais colhidas no

intervalo de 6 a 8 semanas após vacinação, sendo definido no presente estudo como 29% (significância de 99,7%).

1.2.2. Evolução da avidéz e determinação da época adequada de coleta da amostra pós-vacinal

Distribuindo-se os I.A. de acordo com o tempo (semanas) decorrido entre a primo-vacinação aos 9 meses e a coleta da amostra pós-vacinal, observou-se que todas as amostras colhidas até 10 semanas após vacinação apresentaram BIA. Após esse período 2/6 (33,3%) das amostras apresentaram I.A. superiores a 29% (Tabela 5).

Entre estas duas variáveis (avidéz e tempo de coleta) observou-se um coeficiente de correlação de 0,67 (Fig.7).

Tabela 5. Índice de avidéz de anticorpos IgG, em crianças primo-vacinadas contra o sarampo aos 9 meses de idade, segundo o tempo decorrido (semanas) entre a vacinação e a coleta da amostra pós-vacinal.

Coleta (semana)	Intervalo médio(dias)	Nº amostras	Nº Amostras com BIA (%)	I.A. média
2 ^a	14	4	4 (100,0)	8,16
3 ^a	19	49	49 (100,0)	6,81
4 ^a	25	35	35 (100,0)	7,74
5 ^a	32	24	24 (100,0)	8,88
6 ^a	40	7	7 (100,0)	12,89
7 ^a	46	6	6 (100,0)	16,32
8 ^a	55	15	15 (100,0)	14,46
9 ^a	61	15	15 (100,0)	15,28
10 ^a	67	3	3 (100,0)	13,97
após 10 ^a	80	6	4 (66,7)	28,95
Total	34	164	162 (98,78)	10,37

Fig. 7. Índices de avidéz, de acordo com o tempo decorrido entre primo-vacinação aos 9 meses e coleta da amostra pós-vacinal (semanas)

Os resultados obtidos em amostras de soros de crianças primo-vacinadas, pertencentes ao grupo 1, considerando-se as amostras colhidas em intervalo igual ou inferior a 10 semanas após vacinação mostraram que no sub-grupo BK, cujas amostras foram colhidas no intervalo entre 14 e 62 dias após vacinação, as médias das ΔDO sem e com uréia foram respectivamente, 0,76 e 0,07, que resultou em um I.A. de 8,3.

Por outro lado, o sub-grupo EZ, cujas amostras foram colhidas mais tardiamente (entre 47 e 70 dias após vacinação), as médias das ΔDO sem e com uréia foram respectivamente, 0,74 e 0,12, resultando em um I.A. de 15,1 (Tabela 6).

No sub-grupo BK os I.A. de avidéz variaram de 0,2 a 20,9 e no sub-grupo EZ a variação foi entre 7,8 e 25,6 (Fig.8)

A média dos I.A. e do tempo de coleta do sub-grupo BK foram significativamente inferiores aos do sub-grupo EZ (Fig.9 e 10).

Tabela 6. Índices de avidéz de anticorpos IgG anti-sarampo e respectivas Δ DO com e sem uréia, em soros de crianças primo-vacinadas contra o sarampo com as vacinas Biken-CAM 70 (BK) e Edmonston-Zagreb (EZ), colhidos entre 2 e 10 semanas após vacinação.

GRUPO	Nº	COLETA DO SORO* (média)	Δ DO PRÉ-VACINAL	Δ DO PÓS-VACINAL SEM URÉIA	Δ DO PÓS-VACINAL COM URÉIA	I.A. MÉDIA
BK	127	14 - 62 (26)	0,04	0,76	0,07	8,3
		p<0,0001				p<0,0001
EZ	31	47 - 70 (58)	0,05	0,74	0,12	15,1

* tempo decorrido em dias entre a vacinação e a coleta do soro

Fig 8. Distribuição dos índices de avidéz em soros de crianças primo-vacinadas contra o sarampo com as vacinas Biken-CAM70 e Edmonston-Zagreb, colhidas entre 2 e 10 semanas após vacinação.

Fig 9. Médias dos índices de avidéz das amostras de crianças primo-vacinadas contra o sarampo com as vacinas Biken-CAM70 e Edmonston-Zagreb, colhidas entre 2 e 10 semanas após vacinação, com respectivos intervalos de confiança (95%).

Fig 10. Médias dos dias decorridos entre primo-vacinação com as vacinas Biken-CAM70 e Edmonston-Zagreb e coleta das amostras pós-vacinais, com respectivos intervalos de confiança (95%).

1.3. Avidéz de anticorpos IgG após vacinação de crianças soropositivas (reinfecção) e de crianças com falhas vacinais.

Os resultados obtidos em 36 amostras de soro dos sub-grupos $H_{(-)}S_{(+)}$ e $H_{(+)}S_{(+)}$ (Reinfecção), isto é, que apresentavam anticorpos na amostra pré-vacinal, mostraram que 35/36 (97,2%) apresentaram índices de avidéz superiores a 29% (Tabela 7). A única amostra com baixo índice de avidéz, era proveniente de criança de 9 meses do grupo $H_{(-)}S_{(+)}$, isto é, sem história de vacinação mas com positividade na amostra pré-vacinal. A exemplo da amostra pós-vacinal, colhida 14 dias após a imunização, a amostra pré-vacinal dessa criança apresentou também baixo índice de avidéz (19,8%).

No sub-grupo $H_{(-)}S_{(+)}$, foram observados I.A. entre 28,4 e 90,4, com média de 52,9% e no sub-grupo $H_{(+)}S_{(+)}$, houve variação entre 58,2 e 83,5, com média de 64,6% (Fig.11).

No sub-grupo $H_{(+)}S_{(-)}$ (Falha vacinal), isto é, de crianças com história de vacinação, mas soronegativas no momento da vacinação, uma amostra apresentou-se com baixa avidéz e era proveniente de criança de 15 meses vacinada aos 7 meses. Neste sub-grupo o índice de avidéz variou entre 21,2 e 55,1, com média de 45,1%.

Após constatar a homogeneidade das variâncias dos I.A. ($p>0,1$), a análise de variância múltipla pelo método LSD, demonstrou que o sub-grupo $H_{(+)}S_{(+)}$ apresentou I.A. médio significativamente superior aos dos demais sub-grupos (Fig.12).

Por outro lado, a análise de variância dos títulos de anticorpos(log) revelaram diferença significativa apenas entre as médias dos sub-grupos $H_{(+)}S_{(+)}$ e $H_{(+)}S_{(-)}$ (Fig.13).

Tabela 7. Distribuição das crianças do grupo 2 (reinfecção/falha vacinal), de acordo com sorologia pré-vacinal, índice de avidéz e títulos de anticorpos IgG anti-sarampo

SUB-GRUPO	M.G.T.* PRÉ- VACINAL	ÍNDICE <29%	AVIDEZ ≥29%	TOTAL	ΔDO MÉDIA SEM URÉIA	ΔDO MÉDIA COM URÉIA	I.A. MÉDIA	M.G.T. PÓS- VACINAL
H ₍₋₎ S ₍₊₎ (Reinfecção)	4.159	1 (3,8)	25 (96,2)	26 (100,0)	1,28	0,69	52,9	8.891
H ₍₊₎ S ₍₊₎ (Reinfecção)	769	0 (0,0)	10 (100,0)	10 (100,0)	1,29	0,86	64,6 p<0,05	13.998
H ₍₊₎ S ₍₋₎ (Falha vacinal)	Negativo	1 (20,0)	4 (80,0)	5 (100,0)	1,25	0,56	45,0	3.312

*M.G.T. : média geométrica dos títulos

Fig.11. Índices de avidéz após vacinação contra o sarampo em crianças com história e/ou anticorpos na amostra pré-vacinal (Grupo 2)

Fig.12. Médias dos índices de avidéz após vacinação contra o sarampo em crianças com história de imunização anterior e/ou anticorpos na amostra pré-vacinal, com respectivos intervalos de confiança (95%).

Fig.13. Médias dos títulos de anticorpos após vacinação contra o sarampo em crianças com história de imunização anterior e/ou anticorpos na amostra pré-vacinal, com respectivos intervalos de confiança (95%).

1.4 Avidéz de anticorpos IgG em infecção passada

As amostras provenientes de crianças do grupo 3 (2 doses de vacina do sarampo aos 6 e 11 meses), e amostras pós vacinais colhidas 5 a 17 meses após administração da segunda dose) e as amostras de cordão umbilical (grupo 4), apresentaram na totalidade índices de avidéz superiores a 29%. No grupo 3, as médias das ΔDO sem e com uréia foram respectivamente, 1,18 e 0,85, resultando em um índice de avidéz médio de 66,3%. No grupo 4, as médias das ΔDO sem e com uréia foram respectivamente, 1,28 e 0,88, com I.A. médio de 66,6% (Tabela 8).

No grupo 3, os I.A. variaram de 33,2 a 94,3 e no grupo 4 a variação foi de 34,9 a 99,6 (Fig. 14).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos I.A. dos 2 grupos. Por outro lado, a análise de variância demonstrou que a média geométrica dos títulos de anticorpos em sangue de cordão (3.808 mUI/ml) foram estatisticamente superiores aos das crianças do grupo 3 (1.234 mUI/ml) (Fig.15).

Tabela 8. Índices de avidéz e títulos de anticorpos IgG anti-sarampo em soros de crianças vacinadas no passado com 2 doses de vacina do sarampo (grupo 3) e em soros de cordão umbilical (grupo 4).

GRUPO	I.A. $\geq 29\%$	ΔDO SEM URÉIA	ΔDO COM URÉIA	I.A. MÉDIA	M.G.T.* (mUI/ml)
3	90 (100%)	1,18	0,85	66,3	1.234
4	42 (100%)	1,28	0,88	66,6	3.808

p<0,001

*M.G.T. : média geométrica dos títulos

Fig.14. Índices de avidéz em soros de crianças vacinadas com duas doses de vacina do sarampo (grupo 3) e em soros de cordão umbilical (grupo 4)

Fig.15. Títulos médios de anticorpos em soros de crianças vacinadas com 2 doses aos 6 e 11 meses (grupo 3) e em soros de cordão umbilical (grupo 4) com os respectivos intervalos de confiança (95%).

1.5. Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos do Baixo Índice de Aidez (BIA)

Para cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do Baixo Índice de Aidez (BIA) para diagnóstico de imunização primária, foram considerados como BIA positivo, os índices de aidez inferiores a 29%. Por outro lado, considerou-se como BIA negativo, os índices de aidez iguais ou superiores a 29%, indicativos de reinfecção.

Para a determinação destes índices, foram incluídos no grupo primo-imunização, as amostras provenientes de crianças dos sub-grupos BK e EZ, cujas amostras foram colhidas até 10 semanas após vacinação. No grupo reinfecção foram incluídas as crianças que apresentaram anticorpos na amostra pré-vacinal (sub-grupos $H_{(-)}S_{(+)}$ e $H_{(+)}S_{(+)}$).

No grupo 1 (primo-vacinação), todas as 158 amostras colhidas apresentaram BIA positivo, que resultou em uma sensibilidade do teste de 100%. No grupo 2 (reinfecção), 35 das 36 amostras apresentaram BIA negativos, resultando em uma especificidade de 97,2%. Os valores preditivos positivo e negativo foram respectivamente, 99,3% e 100% (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição dos resultados de Baixo Índice de Aidez (BIA) em imunização primária e em reinfecção.

BIA	Imunização primária	Reinfecção	Total
Positivo	158	1	159
Negativo	0	35	35
Total	158	36	194

2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA PARA O ESTUDO DA AVIDEZ EM ELUATOS DE PAPEL DE FILTRO

Quando aplicada a 242 amostras (Grupo SW) de crianças primovacinadas contra o sarampo com a cepa Schwarz, colhidas em papel de filtro 6 a 10 semanas após a administração da vacina, a técnica apresentou 96,3% ($\pm 2,4$) de sensibilidade, isto é, 233 das 242 amostras apresentaram BIA. As 9 amostras com índices de avides superiores a 29% (média 35,0) foram colhidas com 45, 46, 49, 50, 56, 59, 60, 62 e 64 dias após vacinação. O índice de avides variou de 0,7 a 48,8, com média de 14,5.

Quando foi considerada a coleta da amostra pós-vacinal no período proposto de 6-8 semanas, das 219 amostras colhidas neste período, 214 apresentaram BIA, correspondendo a uma sensibilidade de 97,7% ($\pm 1,9$), que não mostrou diferença estatisticamente significativa com a obtida quando foi considerada a coleta entre 6 e 10 semanas.

3. COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE AVIDEZ E TÍTULOS DE ANTICORPOS EM PRIMO-VACINAÇÃO, DE ACORDO COM O TIPO DE VACINA ADMINISTRADO

Para verificar se o tipo de vacina ou o método de coleta poderia apresentar diferenças na resposta imunológica humoral, analisamos os I.A. e o títulos de anticorpos IgG em amostras pós-vacinais colhidas entre 6 e 10 semanas após imunização com os 3 tipos de vacina (BK, EZ e SW) (Tabela 10)

Com as vacinas BK e EZ, foi observado BIA em 100% das amostras colhidas nesse período. Com a cepa Schwarz, houve 96,3% de amostras com BIA. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as proporções do BIA para as 3 vacinas ($p>0,2$).

Tabela 10. Índices de avides e títulos de anticorpos anti-sarampo em crianças primo-vacinadas contra o sarampo, de acordo com a cepa vacinal

GRUPO	Nº. AMOSTRAS	BIA	I.A. MÉDIA	M.G.T.* (mUI/ml)
BK	9	9/9 (100,0%)	14,3	412
EZ	31	31/31 (100,0%)	15,1	384
SW	242	233/242 (96,3%)	14,5 $p>0,8$	907 $p<0,002$
$p>0,2$				

* M.G.T.: Média geométrica dos títulos

A análise de variância demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre as médias dos índices de avides dos 3 grupos (Fig.16).

Fig.16. Médias dos índices de avides após vacinação com as vacinas Biken CAM-70, Edmonston-Zagreb e Schwarz, em amostras colhidas entre 6 e 10 semanas após vacinação e respectivos intervalos de confiança(95%).

Com relação aos títulos de anticorpos, a análise de variância demonstrou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,002$). Após verificar a homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett $p > 0,2$), a análise de variância múltipla pelo método de LSD, demonstrou que o título médio da vacina Schwarz, foi estatisticamente superior ao das vacinas Biken-CAM70 e Edmonston-Zagreb (Fig.17)

Fig.17. Médias dos títulos de anticorpos após vacinação com as vacinas Biken-CAM70, Edmonston-Zagreb e Schwarz, com respectivos intervalos de confiança (95%).

DISCUSSÃO

Com a finalidade de facilitar a avaliação sorológica de vacinas contra o sarampo, discriminando-se imunização primária de reimunização pela determinação da avidéz de anticorpos IgG pós-vacinal, o presente estudo foi desenvolvido empregando-se a técnica imunoenzimática (ELISA) e a uréia como agente caotrópico.

Embora diversos outros agentes caotrópicos, tais como dietilamina (THOMAS e MORGAN-CAPNER, 1988)), guanidina-HCl (INOUE, 1984) e tiocianato de potássio (PULLEN et al., 1986, MACDONALD et al., 1988), tenham sido utilizados na determinação da avidéz de anticorpos, vários fatores levaram à escolha da uréia, para aplicação no presente estudo, a saber, facilidade de execução, ausência de toxicidade, disponibilidade do reagente no laboratório e eficiência do método para diagnóstico de infecção primária por diversos outros agentes infecciosos.

Os diversos estudos para determinação da avidéz com uréia, empregaram diferentes concentrações e tempo de exposição, assim como diferentes formas de cálculo do índice representativo da avidéz. Tornou-se por isso necessário no presente estudo, a padronização de algumas condições, como concentração de uréia e tempo de exposição ao agente dissociante, para adequarmos o teste às nossas condições. Além disso, visando uma maior facilidade de aplicação em larga escala, optamos pelo método do índice de avidéz em diluição única do soro, obtido através da razão entre as absorbâncias com e sem uréia (HEDMAN e ROUSSEAU, 1989).

Inicialmente utilizamos uréia nas concentrações de 6, 7 e 8M, com exposição por 5 minutos, em dois grupos de soros, um representando infecção primária (Grupo A) e outro grupo representando infecção passada ou reinfecção (Grupo B).

Para o grupo de infecção primária, selecionamos amostras de soros de crianças primo-vacinadas, que não apresentavam anticorpos na amostra pré-vacinal, que haviam sido colhidas mais tardiamente (acima de 8

semanas após vacinação). Essa seleção teve por finalidade, obter maior sensibilidade do teste para detecção de anticorpos de baixa avidéz, já que após a imunização os mesmos são substituídos por aqueles de maior avidéz no decorrer do tempo (STEINER e EISEN, 1967a). A seleção de soros do grupo B, que se constituiu de crianças com anticorpos na amostra pré-vacinal e crianças vacinadas com duas doses da vacina, teve por finalidade assegurar a presença de anticorpos de alta avidéz.

Com a uréia 6M (Fig.3), apenas uma das 22 amostras do grupo de infecção primária (Grupo A) apresentou baixo índice de avidéz (<30%), de acordo com o critério de HEDMAN e ROUSSEAU (1989), inicialmente adotado neste estudo. A uréia nessa concentração foi empregada por vários autores, para diagnóstico de toxoplasmose aguda (HEDMAN et al., 1989a; JOYNSON et al., 1990; LECOLIER e PUCHEU, 1993; LAPPALAINEN et al., 1993). A baixa capacidade discriminatória da uréia 6M, observada no presente trabalho, pode ter sido devido à forma diferente de calcular o índice representativo de avidéz e o tempo de exposição à uréia. Naqueles estudos, as placas foram submetidas a 3 lavagens de 5 minutos com uréia 6M e o índice foi definido pela razão entre título com uréia e título sem uréia (HEDMAN et al., 1989a; JOYNSON et al., 1990; LAPPALAINEN et al., 1993). LECOLIER & PUCHEU (1993), por sua vez, fixaram um *cut-off* do índice de avidéz mais elevado (50%) para diferenciação entre toxoplasmose aguda e crônica. No presente estudo, porém, não foi possível definir o *cut-off* neste nível mais elevado porque diversas amostras do grupo A apresentaram avidéz acima de 50% quando se utilizou a uréia na concentração 6M.

Além disso, diferentes resultados podem ser devido ao tipo de antígeno e forma de sensibilização das placas (THOMAS e MORGAN-CAPNER, 1991b). INOUE et al. (1984) relataram variabilidade nos resultados para detecção de anticorpos contra o vírus da rubéola, com a utilização de placas comerciais de diferentes procedências. De acordo com esses autores, os antígenos adsorvidos à placa podem sofrer uma leve desnaturação devido ao congelamento e descongelamento, acarretando ausência de interação dos anticorpos de baixa avidéz no ELISA, ao contrário

do que ocorre com os anticorpos de alta avidéz. Essa conclusão foi baseada no fato de que, IgG isoladas de soros de indivíduos com infecção recente, apresentando altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação, apresentaram baixa reatividade pelo ELISA. Por outro lado, soros de infecção tardia, com baixos títulos pela RIH, apresentaram alta reatividade pelo ELISA.

LEW (1984) e STEWARD e LEW (1985), salientaram a importância de se utilizar placas sensibilizadas com alta densidade epitópica, para minimizar a interferência da afinidade na quantificação de anticorpos pelo ELISA, porque o emprego de placas sensibilizadas com baixa concentração de antígeno permite detectar predominantemente anticorpos de maior avidéz (NIETO et al., 1984).

Baseado nesse princípio, DEVASH et al. (1990), empregaram um método com limitação de antígeno para sensibilização das placas, para demonstrar a correlação entre ausência de transmissão vertical de HIV e anticorpos de alta afinidade em soros de mães HIV positivas.

No presente estudo as placas sensibilizadas foram mantidas a -70° , e utilizadas em um prazo não maior que uma semana após sensibilização para evitar a desnaturação do antígeno.

Além disso, empregamos placas sensibilizadas com concentração de antígeno que permitisse o máximo de absorbância com o soro controle positivo para se obter uma alta densidade epitópica adsorvida à placa.

Com a uréia 7M/5min, também não foi possível a distinção total entre os dois grupos, porque 3 das 22 amostras do grupo A (13,6%) apresentaram índices de avidéz superiores a 30%, embora todas as amostras do grupo B tenham apresentado elevados índices de avidéz (Fig.4).

Com a uréia 8M/5 min, todas as amostras do grupo de infecção primária (Grupo A) apresentaram baixos índices de avidéz. Entretanto, em soros de crianças do grupo B, observamos que 4 das 37 (10,8%) amostras

testadas apresentaram índices inferiores a 30% , levando a uma resolubilidade igualmente baixa (Fig.5).

Algumas alternativas para otimizar a distinção entre os dois grupos por nós aventadas, foram a saber, o aumento do tempo de exposição à uréia 7M, a diminuição do tempo de exposição à uréia 8M ou a diminuição do *cut-off* da uréia 8M para 20%.

BLACKBURN et al. (1991) empregaram a uréia 8M durante 3 minutos para distinção entre infecção primária e reinfecção por citomegalovírus e relataram que em crianças entre 3 e 12 meses com positividade para anticorpos da classe IgM, apenas 55% apresentaram baixos índices de avidéz. Essa baixa sensibilidade pode ter sido causada pelo reduzido tempo de exposição.

Além disso, no presente estudo consideramos que para análise de grande número de placas, haveria maior dificuldade no controle do tempo de exposição à uréia, e optamos por isso pelo aumento do tempo da uréia 7M para 10 minutos. Nestas condições, todas as amostras do grupo de crianças revacinadas ou vacinadas no passado com duas doses (Grupo B) apresentaram, como era esperado, índices de avidéz superiores a 30% e todas as amostras obtidas de crianças primo-vacinadas (Grupo A) apresentaram índices de avidéz inferiores a 30% (Fig.6).

Além disso, a resolubilidade do teste, isto é, a distância entre o maior índice do grupo A e o menor índice do grupo B, foi maior com a uréia 7M/10 min (6,29%) do que aquela considerando *cut-off* de 20% com uréia 8M/5 min (5,02%).

Durante a determinação da concentração ideal de uréia e do tempo de exposição foi adotado o critério de HEDMAN e ROUSSEAU (1989), isto é, índice de avidéz inferior a 30%, para definição de primo-infecção. Entretanto, para avaliação da técnica na população estudada, procuramos determinar o limite do índice de avidéz mais adequado. Para tanto, utilizamos um limite correspondente à média mais 3 desvios padrões (significância de 99,74%),

que resultou em um valor (29%), semelhante ao utilizado por HEDMAN e ROUSSEAU (1989) e também por outros autores (BLACKBURN et al., 1991; TUOKKO, 1995).

Para determinação desse limite foram utilizados somente soros de crianças primo-vacinadas aos 9 meses pertencentes ao Grupo 1, colhidos entre 6-8 semanas após vacinação (Tabela 4). A escolha desses critérios teve por finalidade uma maior homogeneidade da amostra, de acordo com o calendário atual de vacinação contra o sarampo em nosso meio, assim como seguir a recomendação da OMS (WHO, 1988), para a coleta da amostra pós-vacinal nos estudos de eficácia de vacinas.

Durante a avaliação de eficácia de vacinas, ocorre frequentemente retardamento da coleta das amostras pós-vacinais, porque as mães não retornam dentro do período recomendado pela OMS (6-8 semanas). Como há um aumento gradativo na avidéz de anticorpos após imunização primária (EISEN e SISKIND, 1964; STEINER e EISEN, 1967a), procuramos analisar a evolução do índice de avidéz em amostras colhidas em diversos intervalos de tempo (semanas) após imunização por uma reta de regressão (Fig.7), cujos resultados apresentaram um coeficiente de correlação de 0,67. Os dados dessa análise permitiram fixar o tempo limite para a coleta da amostra pós-vacinal em 10 semanas. As 158 amostras colhidas até esse período apresentaram em sua totalidade, índices de avidéz inferiores a 29%. Após 10 semanas 2/6 (43,3%) das amostras apresentaram índices de avidéz superiores a 29% (Tabela 5). Estes resultados demonstram a importância da época de coleta da amostra pós-vacinal para avaliação sorológica de vacinas com este método.

No grupo de crianças primo-vacinadas, o sub-grupo BK apresentou índices de avidéz inferiores ao sub-grupo EZ (Fig.9). Essa diferença pode ser atribuída à coleta mais precoce das amostras pós-vacinais do sub-grupo BK, que foi entre 14 e 62 dias (média 26 dias) e não ao tipo de vacina e via de administração, porque o tempo decorrido entre a vacinação e a coleta da amostra pós-vacinal do sub-grupo EZ, que recebeu intradermicamente a vacina Edmonston-Zagreb, variou de 47 a 70 dias (média 58 dias),

significativamente superior ao do grupo que foi vacinado com a vacina Biken-CAM70 por via sub-cutânea (Fig.10).

Além disso, quando foram analisadas somente as amostras colhidas no período entre 6 e 10 semanas, não foram observadas diferenças significantes entre os dois sub-grupos tanto na avidéz quanto nos títulos de anticorpos (Fig.16 e 17).

No grupo de reinfectedos (Grupo 2), onde eram esperados elevados índices de avidéz, devido à resposta do tipo secundário ser predominantemente de alta avidéz (STEINER e EISEN, 1967b), 1 das 36 amostras testadas (2,8%) apresentou BIA (Tabela 7).

Esta amostra com BIA era proveniente de uma criança de 9 meses pertencente ao grupo $H_{(-)}S_{(+)}$, isto é, sem história de imunização ou doença mas com anticorpos presentes na amostra pré-vacinal. Esta criança poderia ter recebido a vacina ou apresentado infecção sub-clínica pelo vírus selvagem em época recente à vacinação efetuada nesta pesquisa. Além disso, a amostra pós-vacinal dessa criança foi colhida apenas 14 dias após vacinação, quando anticorpos de baixa avidéz de uma eventual imunização anterior recente ainda poderiam estar presentes. Esta suposição é apoiada, pelo encontro de anticorpos de baixa avidéz na amostra pré- vacinal (I.A.=19,8%). Uma coleta em época adequada, ou seja, mais tardiamente, poderia ter afastado esta possibilidade, pela demonstração de uma maior avidéz dos anticorpos.

No grupo de crianças com falhas vacinais ($H_{(+)}S_{(-)}$), isto é, que apresentavam história de vacinação, mas a sorologia pré-vacinal era negativa, composto de 5 amostras, uma delas apresentou BIA. Essa amostra era proveniente de criança, com idade de 15 meses que tinha história de imunização prévia aos 7 meses. Esses dados indicam tratar-se de um caso de falha vacinal primária, porque a resposta à revacinação foi com anticorpos de baixa avidéz, que caracteriza uma imunização primária (STEINER e EISEN, 1967a). A presença destes casos, durante estudos de eficácia de vacinas, não levaria a falsos resultados, já que nas falhas

vacinais primárias, não há estimulação antigênica (HAYDEN, 1979), e portanto a criança, quando revacinada, apresentaria comportamento semelhante ao de primo-vacinada.

As outras 4 amostras do sub-grupo $H_{(+)}S_{(-)}$ apresentaram elevados índices de avidéz. De acordo com a definição de falhas vacinais (HAYDEN, 1979) e as características da resposta imune secundária (MOND et al., 1974; STEINER e EISEN, 1967b), já mencionadas anteriormente, estes resultados sugerem tratar-se de casos de falhas vacinais secundárias. Embora as amostras pré-vacinais destes casos não tenham sido testadas pela sensível reação de neutralização de placas (RNP), a negatividade pelo ELISA sugere tratar-se de amostras com títulos inferiores a 120 pela RNP, que indica suscetibilidade ao vírus selvagem (CHEN et al, 1990).

A alta avidéz destes casos não pode ser atribuída ao tempo de coleta, porque as mesmas foram colhidas apenas 14 a 23 dias após vacinação. Esta precocidade na resposta imunológica com alta avidéz constitui mais uma evidência de resposta do tipo secundário.

Esse tipo de falha vacinal foi anteriormente relatada, durante surtos de sarampo, pela ausência de anticorpos IgM em indivíduos vacinados que adquiriram o sarampo (NAGY et al., 1984; CHERRY et al., 1973; LINNMENAN, et al., 1973). Para identificação destas falhas vacinais, os autores utilizaram as reações de imunofluorescência indireta (NAGY et al., 1983) ou inibição da hemaglutinação com 2-mercaptoetanol. Nestas técnicas, reações falso-negativas podem ocorrer devido à competição dos anticorpos da classe IgG. Por outro lado, as técnicas para determinação de anticorpos da classe IgM com anticorpos marcados, tais como a RIF e ELISA indireta, podem apresentar falso resultados positivos, devido à presença de fator reumatoide (HERRMANN, 1988).

Além disso, testes mais sensíveis para detecção desses anticorpos, utilizadas recentemente, mostraram que mesmo em falhas vacinais secundárias, definidas pela ascensão rápida de anticorpos da classe IgG, os anticorpos IgM podem estar presentes (ERDMAN et al., 1993; HIDAKA et al.,

1994). Neste aspecto, o índice de avidéz seria vantajoso em relação à detecção de anticorpos IgM para diferenciar uma infecção primária de uma reinfeção.

Embora o número de amostras neste grupo tenha sido reduzido e estudos mais expandidos sejam necessários, os resultados sugerem que esta técnica pode ser aplicada na identificação das falhas vacinais.

Os índices de avidéz dos 3 sub-grupos do grupo 2 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Fig.12). Entretanto, os títulos de anticorpos do sub-grupo $H_{(+)}S_{(-)}$ foram significativamente inferiores aos do sub-grupo $H_{(+)}S_{(+)}$. A ausência de diferença estatisticamente significativa entre o sub-grupo $H_{(+)}S_{(-)}$ e $H_{(-)}S_{(+)}$ pode ter sido devido ao número reduzido de amostras do primeiro sub-grupo, que foi de apenas 5 (Fig.13).

O sub-grupo $H_{(+)}S_{(-)}$, com sorologia pré-vacinal negativa e o sub-grupo $H_{(+)}S_{(+)}$, com média geométrica dos títulos de anticorpos de 769 mUI/ml na amostra pré-vacinal, apresentaram aumento significativo no título de anticorpos, ao contrário do que ocorreu com o sub-grupo $H_{(-)}S_{(+)}$, com amostra pré-vacinal com títulos elevados (4.159 mUI/ml). Isto está de acordo com dados da literatura (KRUGMAN et al., 1965, STOKES et al., 1961), onde Krugman et al. (1965) relataram que após revacinação, apenas 1 entre 6 crianças com títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação de 1:16 e 1:32 apresentaram aumento significativo, ao contrário do que ocorreu em 25/36 crianças com títulos iguais ou inferiores a 1:8. O mesmo fenômeno foi relatado por STOKES et al. (1961), durante re-exposição de indivíduos imunes por infecção natural ao vírus do sarampo selvagem.

O método foi também eficaz na distinção de infecção passada, ao ser aplicado em soros de crianças vacinadas no passado com 2 doses de vacina do sarampo (Grupo 3) e nos soros de cordão umbilical de recém-nascidos, cujas mães tinham entre 30 e 42 anos de idade (Grupo 4). Todas as amostras dos dois grupos apresentaram I.A. superiores a 29%, com médias equivalentes (66,3 e 66,7, respectivamente), embora os títulos de anticorpos do Grupo 4 tenham sido superiores ao do Grupo 3 (Tabela 8). Esses

resultados demonstram que os títulos de anticorpos não interferiram na determinação da avidéz.

O teste mostrou-se altamente sensível para discriminação de primo-vacinação, isto é, a ocorrência de resultado positivo para BIA, foi de 100%, para amostras colhidas até 10 semanas após vacinação. Resultados semelhantes foram obtidos por HEDMAN et al. (1989b) para avaliação de resposta imunológica à vacina da rubéola. Estes autores relataram uma sensibilidade de 97%, em amostras colhidas 2 meses após vacinação.

Na população de reinfetados, isto é, aqueles que apresentavam anticorpos na amostra pré-vacinal (sub-grupos $H_{(-)}S_{(+)}$ e $H_{(+)}S_{(+)}$), onde são esperados resultados negativos para baixa avidéz, a especificidade foi de 97,2%. Entretanto, de acordo com as considerações anteriores, relativas ao caso de baixa avidéz do grupo $H_{(-)}S_{(+)}$, é possível sugerir que a especificidade e o valor preditivo positivo seriam também de 100%.

Embora a população representativa de alto índice de avidéz tenha sido composta de 168 amostras pertencentes aos grupos de reinfecção, infecção pregressa e transferência placentária, em número semelhante ao do grupo de primo-vacinação, para a determinação dos parâmetros de credibilidade do teste, a análise foi restrita às amostras do grupo de reinfecção composta de 36 amostras, por ser esse o grupo especificamente representativo em avaliações sorológicas de vacinas contra o sarampo. Eventuais diferenças numéricas no tamanho dos grupos foram compensadas pela alta resolubilidade do teste, isto é, 100% de BIA em imunização primária e 2,8% em reinfecção. Nestas condições, a análise do tamanho amostral revelou necessidade de um mínimo de 13 amostras em cada grupo (para $\alpha=0,01\%$ e $\beta=99\%$), o que foi amplamente superado pelos nossos números.

Ao aplicarmos o teste a eluatos de papel de filtro provenientes de uma população vacinada aos 9 meses, com a vacina Schwarz, o método apresentou uma sensibilidade de 96,3% (233/242) em amostras colhidas no período entre 6 e 10 semanas após vacinação.

Ainda que a coleta tenha sido programada para ser efetuada entre 6-8 semanas, muitas crianças não retornaram no período proposto, necessitando de busca ativa por parte das UBSs, o que retardou a coleta. Das 219 amostras estudadas, que foram colhidas no período proposto, 214 apresentaram I.A. inferiores a 29%, resultando em uma sensibilidade do teste de 97,7% (+/- 2,0), com diferença estatisticamente não significativa à obtida quando se considerou toda a população (colhidas entre 6 e 10 semanas). Estes resultados permitem assegurar a aplicabilidade do teste em condições de acordo com a nossa realidade.

Embora o teste inicialmente avaliado com os outros sub-grupos de vacinados (BK e EZ) tenha revelado 100% de BIA em amostras colhidas até 10 semanas após a vacinação (Tabela 4), quando aplicado ao grupo que recebeu a vacina Schwarz, revelou 9/242 (3,7%) de amostras com I.A. superiores a 29%. Embora essas crianças não apresentassem história de imunização e as amostras pré-vacinais tenham sido negativas, não pode ser descartada a possibilidade de ter ocorrido uma imunização anterior recente, que poderia ter induzido à maturação mais rápida da avidéz.

Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas proporções de BIA dos 3 sub-grupos, em amostras colhidas neste intervalo ($p>0,2$) (Tabela 11)

Quando a vacina Schwarz foi comparada com as vacinas Biken-CAM70 e Edmonston-Zagreb, em amostras colhidas entre 6 e 10 semanas após vacinação, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes nas médias dos índices de avidéz dos 3 sub-grupos (Fig.15), embora a vacina Schwarz tenha induzido à produção de títulos mais elevados que as outras vacinas ($p<0,01$) (Fig.17).

A indução de títulos mais elevados de anticorpos demonstram a maior imunogenicidade da cepa Schwarz. Além disso, esta vacina apresentou no presente estudo, eficácia de 89,1% (85,1 - 93,1%)*, superior ao da vacina Biken-CAM70 ($p<0,05$) em crianças de mesma idade, em estudo realizado

em 1984 por PANNUTI et al. (1987), que relataram uma soroconversão de 78,04% (72,38 - 83,70%).

A maior imunogenicidade da cepa Schwarz em relação à Biken-CAM70 foi também relatada por BERRY et al. (1992), durante estudo de eficácia de vacinas de altos títulos. Naquele estudo, os autores observaram que, embora ambas as vacinas tenham apresentado taxas de soroconversão semelhantes em crianças entre 8 e 9 meses, os títulos de anticorpos induzidos pela cepa Schwarz foram significativamente superiores. Essa capacidade de indução de títulos mais elevados de anticorpos da vacina Schwarz foi também relatada por BOLOTOVSKI et al. (1994), em estudo comparativo das vacinas AIK-C, Edmonston-Zagreb, Leningrad-16 e Schwarz, em crianças de 6 e 9 meses de idade.

Os resultados do presente estudo demonstram, portanto, que o tipo de vacina e os títulos de anticorpos não interferiram na determinação do BIA para definição de infecção primária, assim como a via de administração e o tipo de coleta da amostra.

Com base nos resultados, foi possível construir um fluxograma para avaliação de eficácia de vacinas contra o sarampo, aplicadas em esquema de uma dose (Fig.18).

Fig.18. Fluxograma para avaliação de eficácia sorológica de vacinas contra o sarampo, administradas em dose única, pela determinação da avidéz de anticorpos IgG anti sarampo

O método da uréia para determinação da avidéz foi avaliado no presente estudo após primo-vacinação aos 9 meses de idade. É desejável, entretanto, o desenvolvimento de estudos sobre a aplicação desta técnica na avaliação de vacinas a serem administradas em idade mais precoce, época em que podem estar presentes anticorpos de origem materna. Esses anticorpos são de alta avidéz, como pudemos observar neste estudo, onde todas as amostras de cordão umbilical apresentaram elevados I.A. (média 66,6%).

Blackburn et al (1991), estudando avidéz de IgG contra o citomegalovírus em soros de crianças entre 3 e 12 meses de idade, com provável infecção primária, devido à presença de anticorpos específicos da classe IgM, observaram que nos grupos de crianças com 3 meses e 4-6 meses de idade, apenas 4/10 (40,0%) e 4/8 (50,0%) das amostras testadas apresentaram respectivamente, I.A. inferiores a 30%. Por outro lado, naquelas com 7-12 meses de idade, baixos índices foram observados em 7/9 (77,8%) das amostras. De acordo com os autores, esses resultados são indicativos de interferência dos anticorpos maternos no teste.

Entretanto, nos países em desenvolvimento, os anticorpos contra o sarampo transferidos através da placenta, embora possam estar presentes na faixa etária de 4-6 meses, em níveis detectáveis pela sensível RNP (ALBRECHT et al., 1981), geralmente não são detectados pela técnica de ELISA. Aplicando essa técnica a soros de crianças do México, SABIN et al. (1983), relataram total soronegatividade aos 6 meses, 25% de soropositividade aos 4 meses e 21% aos 5 meses, com médias geométricas dos títulos de anticorpos entre 16 e 21.

Como a técnica por nós empregada é realizada na diluição 1/100, é pouco provável que a presença destes anticorpos em baixas concentrações possam interferir significativamente na determinação da avidéz de anticorpos após imunização nesta faixa etária. Além disso, numa criança vacinada aos 4 meses, se a amostra for colhida cerca de 10 semanas após vacinação (tempo limite para coleta da amostra pós-vacinal definida no presente

estudo), a criança estará com mais de 6 meses, idade em que não seriam mais detectados anticorpos pelo ELISA.

Além disso, é possível ainda especular sobre a possibilidade de se retardar a coleta da amostra pós-vacinal. SABIN et al (1984) relataram soroconversão mais tardia em crianças vacinadas entre 4 e 6 meses, e consideraram como causa provável, a imaturidade imunológica. Além disso, a maturação da avidéz de anticorpos parece ser dependente da idade (DORIA et al, 1978) e uma criança vacinada contra o sarampo em idade mais precoce poderia apresentar anticorpos de baixa avidéz por tempo mais prolongado que o observado neste estudo.

O presente método teria ainda grande utilidade para avaliação de outros esquemas com as vacinas do sarampo atualmente disponíveis, mesmo para países desenvolvidos que têm programas para controle do sarampo, como por exemplo, os Estados Unidos. Neste país, a primovacinação é realizada aos 12 meses de idade, porque os anticorpos de origem materna eram considerados persistentes mesmo após um ano de idade (ALBRECHT et al, 1977). Entretanto tem-se observado uma mudança neste comportamento, com extinção mais rápida destes anticorpos (LENNON e BLACK, 1986; KACICA et al, 1995), em virtude da atual predominância de crianças nascidas de mães vacinadas e estudos de eficácia da vacina administrada aos 9 meses encontram-se em andamento (WOOD e BRUNELL, 1995).

Conclui-se que a determinação do índice de avidéz pela técnica de ELISA, empregando-se a uréia como agente dissociante, é altamente eficiente na avaliação sorológica de esquema de dose única de vacinas do sarampo, pois permite, com uma única amostra sérica pós-vacinal, a discriminação entre imunização primária e reinfecção.

CONCLUSÕES

O presente estudo de padronização e avaliação do teste de avidéz de anticorpos IgG anti-sarampo para avaliação de eficácia de vacinas, utilizando uréia como agente caotrópico, permite as seguintes conclusões:

Conclusão geral

O teste de avidéz de anticorpos IgG anti-sarampo permite uma adequada avaliação de esquema de vacinação contra o sarampo em dose única, utilizando-se uma única amostra pós-vacinal.

Conclusões específicas

1. A concentração de uréia de 7M e o tempo de exposição de 10 minutos foram as condições ideais para determinação da avidéz de anticorpos para o vírus do sarampo, em teste com diluição única de soro, padronizado no presente estudo.
2. O *cut-off* do índice de avidéz para definição de primo-vacinação em amostras colhidas entre 6 e 8 semanas após vacinação, foi de 29%.
3. A análise temporal da avidéz após primo-vacinação demonstrou aumento da avidéz de anticorpos IgG com o tempo após vacinação e permitiu definir como 10 semanas, o tempo máximo para coleta da amostra pós-vacinal.
4. A sensibilidade do teste para Baixo Índice de Avidéz (BIA), em primo-vacinação foi de 100% com as vacinas Biken-CAM 70 e Edmonston Zagreb e 96,3% com a vacina Schwarz, em amostras colhidas entre 6 e 10 semanas após vacinação.
5. A especificidade do teste para BIA foi de 97,2% quando aplicado ao grupo com reinfecção e infecção passada.
6. Os valores preditivos positivo e negativo foram respectivamente, 99,3% e 100%.
7. Em nossa população de crianças com história de vacinação e sem anticorpos na amostra pré-vacinal, houve distinção entre falha vacinal primária e secundária.

8. O teste pode ser aplicado a diferentes cepas vacinais e em amostras colhidas em papel de filtro.
9. Os resultados permitiram sugerir um fluxograma a ser seguido em pesquisas de avaliação de eficácia de vacinas contra o sarampo
10. O método mostrou-se simples, de fácil execução e altamente eficiente na discriminação entre primo-vacinação e reinfecção/infecção passada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABY, P.; JENSEN, T.G.; HANSEN, H.L.; KRISTIANSEN, H.; THARUP, J.; POULSEN, H.; SODEMANN, M.; JAKOBSEN, M.; KNUDSEN, K.; SILVA, M.C. & WHITTLE, H. - Trial of high-titer Edmonston-Zagreb measles vaccine in Guinea-Bissau: protective efficacy. *Lancet*, 2: 809-811, 1988.
- AABY, P.; ANDERSEN, M.; SODEMANN, M.; JAKOBSEN, M.; GOMES, J. & FERNANDES, M. - Reduced childhood mortality after standard measles vaccination at 4-8 months compared with 9-11 months of age. *Brit.med.J.*, 307: 1308-1311, 1993a.
- AABY, P.; KNUDSEN, K.; WHITTLE, H.; LISSE, I.M.; THAARUP, J.; POULSEN, A.; SODEMANN, M.; JAKOBSEN, M.; BRINK, L.; GANSTED, U.; PERMIN, A.; JENSEN, T.G.; ANDERSEN, H. & SILVA, M.C. - Long-term survival after Edmonston-Zagreb measles vaccination in Guinea-Bissau: increased female mortality rate. *J.Pediat.*, 122: 904-908, 1993b.
- AABY, P.; SAMB, B.; SIMONDON, F.; KNUDSEN, K.; SECK, A.M.C.; BENNETT, J.; MARKOWITZ, L.; RHODES, P. & WHITTLE, H. - Sex-specific differences in mortality after high-titre measles immunization in rural Senegal. *Bull. Wld.Hlth Org.*, 72: 761-770, 1994.
- AABY, P.; SAMB, B.; SIMONDON, F.; SECK, A.M.C.; KNUDSEN, K. & WHITTLE, H. - Non-specific beneficial effect of measles immunization: analysis of mortality studies from developing countries. *Brit.med.J.*, 311: 481-485, 1995.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. *Cellular and molecular immunology*. 2.ed.Philadelphia, W.B.Saunders, 1994.
- ALBRECHT, P.; ENNIS, F.A.; SALTZMAN, E.J. & KRUGMAN, S. - Persistence of maternal antibody in infants beyond 12 months: mechanism of measles vaccine failure. *J.Pediat.*, 91: 715-718, 1977.
- ALBRECHT, P.; HERRMANN, K. & BURNS, G.R. - Role of virus strain in conventional and enhanced measles plaque neutralization. *J.virol.Meth.*, 3: 251-260, 1981.
- ALKHATIB, G.; RICHARDSON, C. & SHEN, S. - Intracellular processing, glycosylation, and cell-surface expression of the measles virus fusion protein (F) encoded by a recombinant adenovirus. *Virology*, 175: 262-270, 1990.
- ALPERS, J.H.; STEWARD, M.W. & SOOTHILL, J.F. - Differences in immune elimination in inbred mice. The role of low affinity antibody. *Clin.exp.Immunol.*, 12: 121-132, 1972.
- BECKFORD, A.P.; KASCHULA, R.O.C. & STEPHEN, C. - Factors associated with fatal cases of measles. *S.Afr.med.J.*, 68: 858-863, 1985.
- BELLINI, W.J.; ROTA, J.S. & ROTA, P.A. - Virology of measles virus. *J.infect.Dis.*, 170(suppl 1): S15-S23, 1994.
- BERRY, S.; HERNANDEZ, H.; KANASHIRO, R.; CAMPOS, M.; AZABACHE, V.; GOMEZ, G.; GUTIERREZ, M.; WEIRS, B.; QUADROS, C. & HALSEY, N. - Comparison of high titer Edmonston-Zagreb, Biken-CAM and Schwarz

- measles vaccines in peruvian infants. *Pediat.infect.Dis.J.*, 11: 822-827, 1992.
- BINNENDIJK, R.S.; BAALEN, C.A.; POELEN, M.C.M.; VRIES, P.; BOES, J.; CERUNDOLO, V.; OSTERHAUS, A.D.M.E. & UYTDEHAAG, F.G.C.M.- Measles virus transmembrane fusion protein synthesized de novo or presented in immunostimulating complexes is endogenously processed for HLA Class I- and Class II-restricted cytotoxic T cell recognition. *J.exp.Med.*, 176: 119-128, 1992.
- BIRRER, M.J.; UDEM, S.; NATHENSON, S. & BLOOM, B.R. - Antigenic variants of measles virus. *Nature*, 293: 67-69, 1981.
- BLACK, F.L.; BERMAN, L.L.; LIBEL, M.; REICHEL, C.A.; PINHEIRO, F.P.; ROSA, A.T.; FIGUEIRA, F. & GONZALES, E.S. - Inadequate immunity to measles in children vaccinated at an early age: effect of revaccination. *Bull.Wld. Hlth. Org.*, 62: 315-319, 1984.
- BLACK, F.L.; BERMAN, L.L.; BORGONHO, J.M.; CAPPER, R.A.; CARVALHO, A.A.; COLLINS, C.; GLOVER, O.; HIJAZI, Z.; JACOBSON, D.L.; LEE, Y.L.; LIBEL, M.; LINHARES, A.C.; MENDIZABAL-MORRIS, C.A.; SIMÕES, E.; SIQUEIRA-CAMPOS, E.; STEVENSON, J. & VECCHI, N. - Geographic variation in infant loss of maternal measles antibody and in prevalence of rubella antibody. *Amer.J.Epidem.*, 124: 442-452, 1986.
- BLACKBURN, N.K.; BESSELAAR, T.G.; SCHOU, B.D. & O'CONNELL, K.F.- Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J.med.Virol.*, 33: 6-9, 1991.
- BLANK, S.E.; LESLIE, G.A. & CLEM, L.W. - Antibody affinity and valence in viral neutralization. *J.Immunol.*, 108: 665-673, 1972.
- BOLOTOVSKI, V.M.; GRABOWSKY, M.; CLEMENTS, C.J.; ALBRECHT, P.; BRENNER, E.R.; ZARGARYANTZS, A.I.; LITVINOV, S.K. & MIKHEYEVA, I.V. - Immunization of 6 and 9 month old infants with AIK-C, Edmonston-Zagreb, Leningrad-16 and Schwarz strains of measles vaccine. *Int.J.Epidem.*, 23: 1069-1077, 1994.
- BRADFORD, M.M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Plano para o controle e eliminação do sarampo no Brasil. Situação atual. *Inf. epidem. SUS*, 2: 73-80, 1992a.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Série histórica de coberturas vacinais de rotina por unidade federada, Brasil. 1980-1991. *Inf. epidem. SUS*, 5: 145-146, 1992b.
- BRINCKMANN, U.G.; BANKAMP, B.; REICH, A.; TER MEULEN, V. & LIEBERT, U.G. - Efficacy of individual measles virus structural proteins in the protection of rats from measles encephalitis. *J.gen. Virol.*, 72: 2491-2500, 1991.

- BROWN, S.E.; HOWARD, C.R.; ZUCKERMANN, A.J. & STEWARD, M.W. - Determination of the affinity of antibodies to hepatitis B surface antigen in human sera. *J.immunol.Meth.*, **72**: 41-48, 1984.
- CAMARGO, M.E.; SILVA, S.M.; LESER, P.G. & GRANATO, C.H. - Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. *Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo*, **33**: 213-218, 1991.
- CARSON, M.M.; SPADY, D.W.; ALBRECHT, P.; BEELER, J.A.; THIPPHAWONG, J.; BARRETO, L.; GRIMSRUD, K.M. & PABST, H.F. - Measles vaccination of infants in a well-vaccinated population. *Pediat.infect.Dis.J.*, **14**: 17-22, 1995
- CHARGELEGUE, D.; O'TOOLE, C.M. & COLVIN, B.T. - A longitudinal study of the IgG antibody response to HIV-1 p17 gag protein in HIV-1⁺ patients with haemophilia: titre and avidity. *Clin.exp.Immunol.*, **93**: 331-336, 1993.
- CHARGELEGUE, D.; STANLEY, C.M.; O'TOOLE, C.M.; COLVIN, B.T. & STEWARD, M.W. - The affinity of IgG antibodies to gag p24 and p17 in HIV-1-infected patients correlates with disease progression. *Clin.exp.Immunol.*, **99**: 175-181, 1995.
- CHEN, R.T.; MARKOWITZ, L.E.; ALBRECHT, P.; STEWART, J.A.; MOFENSON, L.M.; PREBLUD, S.R. & ORENSTEIN, W.A.- Measles antibody: reevaluation of protective titers. *J.infect.Dis.*, **162**: 1036-1042, 1990.
- CHERRY, J.D.; FEIGIN, R.D.; SHACKELFORD, P.G.; HINTHORN, D.R. & SCHMIDT, R.R. - A clinical and serologic study of 103 children with measles vaccine failure. *J.Pediat.*, **82**: 802-808, 1973.
- CHILDREN'S VACCINE INIATIVE AD HOC COMMITTEE ON AN INVESTMENT STRATEGY FOR MEASLES CONTROL - A Bellagio Consensus. *J.infect.Dis.*, **170**(supl1): S63-S64, 1994.
- CLEMENS, J.D. & STANTON, B.F. Longer term evaluation of vaccine efficacy. Methodological issues for phase III and phase IV trials. In: WOODROW, G.C. & LEVINE, M.M., ed. *New generation vaccines*. New York, Marcel Dekker, 1990. p.51-66.
- COHN, M.L.; ROBINSON, E.D.; FAERBER, M.; THOMAS, D.; GEYER, S.; PETERS, S.; MARTIN, M.; MARTIN, A.; SOBEL, D.; JONES, R.; LARKIN, L. & RICHERT, J.R. - Measles vaccine failures: lack of sustained measles-specific immunoglobulin G responses in revaccinated adolescents and young adults. *Pediat.infect.Dis.J.*, **13**: 34-38, 1994.
- COOVADIA, H.M.; PARENT, M.A.; LOENING, W.E.K.; WESLLEY, A.; BURGESS, B.; HALLET, F.; BRAIN, P.; GRACE, J.; NAIDOO, J.; SMYTHE, P.M. & VOS, G.H.. An evaluation of factors associated with the depression of immunity in malnutrition and in measles. *Amer.J.clin.Nutr.*, **27**: 665-669, 1974.
- CUTTS, F.T.; HENDERSON, R.H.; CLEMENTS, C.J.; CHEN, R.T. & PATRIARCA, P.A. - Principles of measles control. *Bull.Wld.Hlth Org.*, **69**: 1-7, 1991.
- CUTTS, F.T. & MARKOWITZ, L.E. - Successes and failures in measles control. *J.infect.Dis.*, **170**(supl 1): S32-S41, 1994.

- DAVIS, R.M.; WHITMAN, E.D.; ORENSTEIN, W.A.; PRELUB, S.R.; MARKOWITZ, L.E. & HINMAN, A.R. - A persistent outbreak of measles despite appropriate prevention and control measures. *Amer.J.Epidem.*, **126**: 428-449, 1987.
- DE VRIES, P.; VAN BINNENDIJK, R.S.; VAN DER MAREL, P.; VAN WEZEL, A.L.; VOORMA, H.O.; SUNDQUIST, B.; UYTDEHAAG, F.G.C.M. & OSTERHAUS, A.D.M.E. - Measles virus fusion protein presented in a immune-stimulating complex (Iscom) induces haemolysis-inhibiting and fusion-inhibiting antibodies, virus-specific T cells and protection in mice. *J.gen.Virol.*, **69**: 549-559, 1988.
- DESEDA-TOUS, J.; CHERRY, J.D.; SPENCER, M.J.; WELLIVER, R.C.; BOYER, K.M.; DUDLEY, J.P.; ZAHRADNIK, J.M.; KRAUSE, P.J. & WALBERGH, E.W. - Measles revaccination. Persistence and degree of antibody titer by type of immune response. *Amer.J.Dis.Child.*, **132**: 287-290, 1978.
- DEVASH, Y.; CALVELLI, T.A.; WOOD, D.G.; REAGAN, K.J. & RUBINSTEIN, A. - Vertical transmission of human immunodeficiency virus is correlated with the absence of high-affinity/avidity maternal antibodies to the gp120 principal neutralizing domain. *Proc.natl.Acad.Sci.(Wash.)*, **87**: 3445-3449, 1990.
- DEVEY, M.E.; BLEASDALE, K.; LEE, S. & RATH, S. - Determination of the functional affinity of IgG1 and IgG4 antibodies to tetanus toxoid by isotype-specific solid-phase assays. *J. immunol.Meth.*, **106**: 119-125, 1988.
- DORIA G.; D'AGOSTARO, G. & PROETTI, A. Age-dependent variations of antibody avidity. *Immunology*, **35**: 601-611, 1978.
- DOSSETOR, J.; WHITTLE, H.C. & GREENWOOD, B.M. - Persistent measles infection in malnourished children. *Brit.med.J.*, **1**: 1633-1635, 1977.
- DRILLIEN, R.; SPEHNER, D.; KIRN, A.; GIRAUDON, P.; BUCKLAND, R.; WILD, F. & LECOCQ, J.P.- Protection of mice from fatal measles encephalitis by vaccination with vaccinia virus recombinants encoding either the hemagglutinin or the fusion protein. *Proc.natl.Acad.Sci. (Wash.)*, **85**: 1252-1256, 1988.
- EISEN, H.N. & SISKIND, G.W.- Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry*, **3**: 996-1008, 1964.
- ENDERS, J.F. & PEEBLES, T.C. - Propagation in tissue culture of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.)*, **86**: 277-286, 1954.
- ENDERS, J.F.; KATZ, S.L.; MILOVANOVIC, M.V. & HOLLOWAY, A. - Studies on an attenuated measles-virus vaccine. I. Development and preparation of the vaccine: technics for assay of effects of vaccination. *N.Engl.J.Med.*, **263**: 153-159, 1960.
- ENDERS, J.F.; KATZ, S.L. & HOLLOWAY, A. - Development of attenuated measles-virus vaccine. *Amer.J.Dis.Child.*, **103**: 335-339, 1962.
- ENDERS, G. & KNOTEK, F. - Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Infection*, **17**: 218-226, 1989.

- ERDMAN, D.D.; HEATH, J.L.; WATSON, J.C.; MARKOWITZ, L.E. & BELLINI, W.J. - Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. *J.med.Virol.*, **41**: 44-48, 1993.
- FAUCI, A.S.; FRANK, M.M. & JOHNSON, J.S. - The relationship between antibody affinity and the efficiency of complement fixation. *J.Immunol.*, **105**: 215-220, 1970.
- FELDMAN, H.A. - Protective value of inactivated measles vaccine. *Amer.J.Dis.Child.*, **103**: 423-424, 1962
- FINE, P.E.M. - Herd immunity: history, theory, practice. *Epidem. Rev.*, **15**: 265-302, 1993.
- FITZGERALD, M.G.; PULLEN, G.R. & HOSKING, C.S. - Low affinity antibody to rubella antigen in patients after rubella infection in utero. *Pediatrics*, **81**: 812-814, 1988.
- FOOKS, A.R.; SCHADECK, E.; LIEBERT, U.G.; DOWSETT, A.B.; RIMA, B.K.; STEWARD, M.; STEPHENSON, J.R. & WILKINSON, G.W. - High-level expression of the measles virus nucleocapsid protein by using a replication-deficient adenovirus vector: induction of an MHC-1 restricted CTL response and protection in a murine model. *Virology*, **210**: 456-465, 1995.
- FOX, J.P. - Herd immunity and measles. *Rev.infect.Dis.*, **5**: 463-466, 1983.
- FULGINITI, V.A.; ELLER, J.J.; DOWNIE, A.W. & KEMPE, C.H. - Altered reactivity to measles virus. *J.Amer.med.Ass.*, **202**: 1075-1080, 1967.
- GARENNE, M.; LEROY, O.; BEAU, J.P. & SENE, I. - Child mortality after high-titre measles vaccines: prospective study in Senegal. *Lancet*, **338**: 903-907, 1991.
- GAZE, S.; WEST, N.J. & STEWARD, M.W. - The use of a double isotope method in the determination of antibody affinity. *J.immunol.Meth.*, **3**: 357-364, 1973.
- GELLIN, B.G. & KATZ, S. - Measles: state of the art and future directions. *J.infect.Dis.*, **170**(supl 1): S3-S14, 1994.
- GERSHON, A.A. - Measles virus (Rubeola). In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E. & DOLIN, R., ed.. *Principles and practice of infectious diseases*. 4.ed. New York, Churchill Livingstone, 1995. V.2, p.1519-1526.
- GOKIERT, J.G. & BEAMISH, W.E. - Altered reactivity to measles virus in previously vaccinated children. *Canad.med.Ass.J.*, **103**: 724-727, 1970.
- GOLDBLATT, D.; VAN ETEN, L.; VAN MILLIGEN, F.J.; AALBERSE, R.C. & TURNER, M.W. - The role of pH in modified ELISA procedures used for the estimation of functional antibody affinity. *J.Immunol.Meth.*, **166**: 281-285, 1993.
- GRAY, J.J.; COHEN, B.J. & DESSELBERGER, U. - Detection of human parvovirus B19-specific IgM and IgG antibodies using a recombinant viral VP1 antigen

- expressed in insect cells and estimation of time of infection by testint for antibody avidity. *J.virol.Meth.*, **44**: 11-24, 1993.
- GRAY, J.J. - Avidity of EBV VCA-specific IgG antibodies: distinction between recent primary infection, past infection and reactivation. *J.virol.Meth.*, **52**: 95-104, 1995.
- GRIFFIN, D.E.; WARD, B.J. & ESOLEN, L.M. - Pathogenesis of measles infections: an hypothesis for altered immune responses. *J.infect.Dis.*, **170**(supl 1): S24-S31, 1994.
- HAYDEN, G.F. - Measles vaccine failure - a survey of causes and means of prevention. *Clin.Pediat.*, **18**: 155-167, 1979.
- HEDMAN, K. & SEPPALA, I. - Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J.clin.Immunol.*, **8**: 214-221, 1988.
- HEDMAN, K. & ROUSSEAU, S.A. - Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *J.med.Virol.*, **27**: 288-292, 1989.
- HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPÄIÄ, I. & MÄKELÄ, O - Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J.infect.Dis.*, **159**: 736-740, 1989a.
- HEDMAN, K.; HIETALA, J.; TIILIKAINEN, A.; HARTIKAINEN-SORRI, A.L.; RÄIHÄ, K.; SUNI, J.; VÄÄNÄNEN, P. & PIETILÄINEN, M. - Maturation of immunoglobulin G avidity after rubella vaccination studied by an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Avidity-ELISA) and by haemolysis typing. *J.med.Virol.*, **27**: 293-298, 1989b.
- HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SÖDERLUND, M. & HEDMAN, L. - Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Rev. med.Microbiol.*, **4**: 123-129, 1993.
- HERRINGTON, D.A. - Initial clinical evaluation of new vaccine candidates. Phase I and phase II trials of safety, immunogenicity, and preliminary efficacy. in: WOODROW, G.C. & LEVINE, M.M., ed. *New generation vaccines*. New York, Marcel Dekker, 1990. p.43-49.
- HERRMANN, K.L. - Antibody detection. In: LENNETE, E.H.; HALONEN, P & MURPHY, F.A., ed. *Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and practice*. Viral, Rickettsial and Chlamydial diseases. New York, Springer-Verlag, 1988. V.2, p.76-101.
- HETHERINGTON, S.V. & LEPOW, M.L. - Correlation between antibody affinity and serum bactericidal activity in infants. *J.infect.Dis.*, **165**: 753-756, 1992.
- HEYMANN, D.L.; SMITH, E.L.; NAKANO, J.H.; JATO, J.G.; MARTIN, G.E. & MABEN, G.K. - Further field testing of the more heat-stable measles vaccines in Cameroon. *Brit.med.J.*, **285**: 531-533, 1982.
- HIDAKA, Y.; AOKI, T.; AKEDA, H.; MIYAZAKI, C. & UEDA, K. - Serological and clinical characteristics of measles vaccine failure in Japan. *Scand.J.infect.Dis.*, **26**: 725-730, 1994.

- HILLEMAN, M.R.; STOKES, J.,JR.; BUYNACK, E.B.; WEIBEL, R.; HALENDA, R. & GOLDNER, H. - Ender's live measles-virus vaccine with human immune globulin. II. Evaluation of efficacy. *Amer.J.Dis.Child.*, **103**: 372-379, 1962.
- HILLEMAN, M.R.; BUYNACK, E.B.; WEIBEL, R.E.; STOKES JR, J.; WHITMAN, J.E. & LEAGUS, M.B. - Development and evaluation of the Moraten measles virus vaccine. *J.Amer.med.Ass.*, **206**: 587-590, 1968.
- HIRAYAMA, M. - Measles vaccines used in Japan. *Rev.Infect.Dis.*, **5**: 495-503, 1983.
- HOLT, E.A.; MOULTON, L.H.; SIBERRY, G.K. & HALSEY, N.A. - Differential mortality by measles vaccine titer and sex. *J.infect.Dis.*, **168**: 1087-1096, 1993.
- HYYPÄÄ, T.; KORKIAMÄKI, P. & VAINIONPÄÄ, R. - Replication of measles virus in human lymphocytes. *J.exp.Med.*, **161**: 1261-1271, 1985.
- IKIĆ, D.M. - Edmonston-Zagreb strain of measles vaccine: epidemiologic evaluation in Yugoslavia. *Rev.infect.Dis.*, **5**: 558-563, 1983.
- INOUE, S.; HASEGAWA, A.; MATSUNO, S. & KATOW, S.- Changes in antibody avidity after virus infections; detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J.clin.Microbiol.*, **20**: 525-529, 1984.
- JENKS, P.J.; CAUL, E.O. & ROOME, A.P.C.H. - Maternally derived measles immunity in children of naturally infected and vaccinated mothers. *Epidem.Infect.*, **101**: 473-476, 1988.
- JIANZHI, X. & ZHIHUI, C. - Measles vaccine in the People's Republic of China. *Rev. infect.Dis.*, **5**: 506-510, 1983.
- JOB, J.S.; HALSEY, N.A.; BOULOS, R.; HOLT, E. FARRELL, D.; ALBRECHT, P.; BRUTUS, J.R.; ANDRIEN, M.; ANDRE, J.; CHAN, E.; KISSINGER, P.; BOULOS, C. & THE CITE SOLEIL/JHU PROJECT TEAM - Successful immunization of infants at 6 months of age with high dose Edmonston-Zagreb measles vaccine. *Pediat.infect.Dis.J.*, **10**: 303-311, 1991.
- JOYNSON, D.H.M.; PAYNE, R.A. & RAWAL, B.K. - Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J.clin.Path.*, **43**: 1032-1033, 1990.
- JUNKER, A.K. & TILLEY, P. - Varicella-zoster virus antibody avidity and IgG-subclass patterns in children with recurrent chickenpox. *J.med.Virol.*, **43**: 119-124, 1994.
- KACICA, M.A.; VENEZIA, R.A.; MILLER, J.; HUGHES, P.A. & LEPOW, M.L. - Measles antibodies in women and infants in vaccine era. *J.med.Virol.*, **45**: 227-229, 1995.
- KAMBARAMI, R.A.; NATHOO, K.J.; NKRUMAH, F.K. & PIRIE, D.J. - Measles epidemic in Harare, Zimbabwe, despite high measles immunization coverage rates. *Bull.Wld.Hlth.Org.*, **69**: 213-219, 1991.

- KANGRO, H.O.; MANZOOR, S. & HARPER, D.R. - Antibody avidity following varicella-zoster virus infections. *J.med.Virol*, 33: 100-105, 1991.
- KARZON, D.T.; WILKELSTEIN, W. ; JENSS, R.; GRESHAM, G.E. & MOSHER, W.E. - Field trial of inactivated measles vaccine. *Amer.J.Dis.Child.*, 103: 425-426, 1962.
- KASCHULA, R.O.C.; DRUKER, J. & KIPPS, A. - Late morphologic consequences of measles: a lethal and debilitating lung disease among the poor. *Rev.infect.Dis.*, 5: 395-404, 1983.
- KATZ, S.L.; ENDERS, J.F. & HOLLOWAY, A. - Studies on an attenuated measles-virus vaccine. II. Clinical, virologic and immunologic effects of vaccine in institutionalized children. *New Engl.J.Med.*, 263: 159-162, 1960.
- KATZ, S.L.; ENDERS, J.F. & HOLLOWAY, A. - Use of Edmonston attenuated measles strain. A summary of three years's experience. *Amer.J.Dis.Child.*, 103: 340-344, 1962.
- KHANUM, S.; UDDIN, N.; GARELICK, H. ; MANN, G. & TOMKINS, A. - Comparison of Edmonston-Zagreb and Schwarz strains of measles vaccine given by aerosol or subcutaneous injection. *Lancet*, 1: 150-153, 1987.
- KOSTER, F.T.; CURLIN, G.C.; AZIZ, K.M.A. & HAQUE, A. - Synergistic impact of measles and diarrhoea on nutrition and mortality in Bangladesh. *Bull.Wld.Hlth.Org.*, 59: 901-908, 1981.
- KRUGMAN, S.; GILES, J.P.; FRIEDMAN, H. & STONE, S. - Studies on immunity to measles. *J.Pediat.*, 66: 471-488, 1965.
- LAMPE, R.M.; WEIR, M.R.; SCOTT, R.M. & WEEKS, J.L. - Measles reimmunization in children immunized before 1 year of age. *Amer.J.Dis.Child.*, 139: 33-35, 1985.
- LAPPALAINEN, M.; KESKELA, P.; KSKINIEMI, M.; ÁMMÄLÄ, P.; HIILESMAA, V.; TERAMO, K.; RAIVIO, K.O.; REMINGTON, J.S. & HEDMAN, K. - Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J.infect.Dis.*, 167: 691-7, 1993.
- LECOLIER, B. & PUCHEU, B. - Intérêt de l'étude de l'avidité des IgG pour le diagnostic de la toxoplasmose. *Path.et Biol.*, 41: 155-158, 1993.
- LEHTONEN, O.P. & MEURMAN, O.H. - An ELISA for the estimation of high-avidity and total specific IgG and IgM antibodies to rubella virus. *J.virol.Meth.*, 5: 1-10, 1982.
- LENNON, J.L. & BLACK, F.L. - Maternally derived measles immunity in era of vaccine-protected mothers. *J.Pediat.*, 108: 671-676, 1986.
- LEÓN, M.E.; WARD, B.; KANASHIRO, K.; HERNÁNDEZ, H.; BERRY, S.; VAISBERG, A.; ESCAMILLA, J.; CAMPOS, M.; BELLOMO, S.; AZABACHE, V. & HALSEY, N.A. - Immunologic parameters 2 years after high-titre measles immunization in peruvian children. *J.infect.Dis.*, 168: 1097-1104, 1993.

- LEW, A.M.- The effect of epitope density and antibody affinity on the ELISA as analysed by monoclonal antibodies. *J.immunol.Meth.*, **72**: 171-176, 1984.
- LINNEMANN, C.C.; HEGG,M.E.; ROTTE, T.C.; PAHIR, J.P. & SCHIFF, G.M. - Measles IgM response during reinfection of previously vaccinated children. *J.Pediat.*,**82**: 798-801, 1973.
- LINNEMANN, C.C.; DINE, M.S.; ROSELLE, G.A. & ASKEY, P.A. - Measles immunity after revaccination: results in children vaccinated before 10 months of age. *Pediatrics*, **69**: 332-335, 1982.
- LOPES, M.H. - Vacina preventiva do sarampo: estudo da influência da idade e da aplicação sobre sua eficácia. São Paulo, 1984. 93p. (Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
- LOPES, M.H.; MENDONÇA, J.S.; PANNUTI, C.S.; ALBRECHT, P.;BIANCALANA, M.L.N.; MANTESE, O.C.; CORREA, J.F. & AMATO NETO, V. - Measles vaccination: influence of age on its efficacy. *Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo*, **31**:322-327, 1989.
- LUCAS, C.J.; UBELS-POSTMA, J.C.; REZEE, A. & GALAMA, J.M.D. - Activation of measles virus from silently infected human lymphocytes. *J.exp.Med.*, **148**: 940-952, 1978.
- LUTZ, E.; WARD, K.N. & GRAY, J.J. - Maturation of antibody avidity after primary human cytomegalovirus infection is delayed in immunosuppressed solid organ transplant patients. *J.med.Virol.*, **43**: 317-322, 1994.
- MACDONALD, R.A.; HOSKING, C.S. & JONES, C.L. - The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J.immunol.Meth.*, **106**: 191-194, 1988.
- MACKETT, M. & SMITH, G.L. - Vaccinia virus expression vectors. *J.gen.Virol.*, **67**: 2067-2082, 1986.
- MAKHENE, M.K. & DIAZ, P.D. - Clinical presentations and complications of suspected measles in hospitalized children. *Pediat.infect.Dis.J.*, **12**: 836-840, 1993
- MAKINO, S. - Development and characteristics of live AIK-C measles virus vaccine: a brief report. *Rev.infect.Dis.*, **5**: 504-505, 1983.
- MALDONADO, Y.A.; LAWRENCE, E.C.; DEHOITZ, R.; HARTZELL, H. & ALBRECHT, P. - Early loss of passive measles antibody in infants of mothers with vaccine-induced immunity. *Pediatrics*, **96**: 447-450, 1995.
- MARKOWITZ, L.E. & BERNIER, R.H.- Immunization of young infants with Edmonston-Zagreb measles vaccine. *Pediat.infect.Dis.J.*, **6**: 809-812, 1987.
- MARKOWITZ, L.E.; SEPULVEDA, J.; DIAZ-ORTEGA, J.L.; VALDESPINO, J.L.; ALBRECHT, P.; ZELL, E.R.; STEWART, J.; ZARATE, M.L. & BERNIER, R.H.. - Immunization of six-month-old infants with different doses of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines. *New Engl.J.Med.*, **322**: 580-587, 1990.

- MARKOWITZ, L.E. & NIEBURG, P. - The burden of acute respiratory infection due to measles in developing countries and the potential impact of measles vaccine. *Rev.infect.Dis.*, **13** (supl 6): S555-S561, 1991.
- MARKOWITZ, L.E.; ALBRECHT, P.; ORENSTEIN, W.A.; LETT, S.M.; PUGLIESE, T.J. & FARRELL, D. - Persistence of measles antibody after revaccination. *J.infect.Dis.*, **166**: 205-208, 1992.
- MARKS, J.S.; HAYDEN, G.F. & ORENSTEIN, W.A. - Methodologic issues in the evaluation of vaccine effectiveness. *Amer.J.Epidem.*, **116**: 510-523, 1982.
- MASSAD, E. BURATTINI, M.N.; MORAES, J.C.; AZEVEDO-NETO, R.S.; SILVEIRA, A.S.B.; PANNUTI, C.S.; ZANETTA, D.M.T.; CAMARGO, M.C.C.; OMOTO, T.M. SOUZA, V.A.U.F. & PASSOS, S.D. - Métodos de avaliação do impacto de estratégias de imunização contra doenças de transmissão direta. Projeto temático de equipe - FAPESP Proc. 92/0561-4.
- MATHIAS, R.G.; MEEKISON, W.G.; ARCAND, T.A. & SCHECHTER, M.T.-The role of secondary vaccine failures in measles outbreaks. *Amer.J.public Hlth*, **79**: 475-478, 1989.
- MAURACHER, C.A.; MITCHELL, L.A. & TINGLE, A.J. - Differential IgG avidity to rubella virus structural proteins. *J.med.Virol.*, **36**: 202-208, 1992.
- MCGRAW, T.T. - Reimmunization following early immunization with measles vaccine: a prospective study. *Pediatrics*, **77**: 45-48, 1986.
- MEURMAN, O.; WARIS, M & HEDMAN, K. - Immunoglobulin G antibody avidity in patients with respiratory syncytial virus infection. *J.clin.Microbiol.*, **30**: 1479-1484, 1992.
- MILOVANOVIC, M.V.; ENDERS, J.F. & MITUS, A.- Cultivation of measles virus in human amnion cells and in developing chick embryo. *Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.)*, **95**: 120-127, 1957.
- MINISTRY OF HEALTH OF KENYA AND THE WORLD HEALTH ORGANIZATION - Measles immunity in the first year after birth and the optimum age for vaccination in Kenyan children. *Bull.Wld.Hlth.Org.*, **55**: 21-31, 1977.
- MOND, J.; KIM, Y.T. & SISKIND, G.W. - Studies on the control of antibody synthesis. V. Effect of nospecific modification of the magnitude of the immune response on the affinity of the antibody synthesized. *J.Immunol.*, **112**: 1255-1263, 1974.
- MORAIS, J.C.; LÉON, M.E.; SOUZA, V.A.U.F.; PANNUTI, C.S.; TRAVISANELLO, C.; HALSEY, N.S. & QUADROS, C.A. - Intradermal administration of measles vaccines. *Bull.Pan Amer.Hlth.Org.*, **28**: 250-254, 1994.
- MOREIN, B.; SUNDQUIST, B.; HÖGLUND, S.; DALSGAARD, K. & OSTERHAUS, A. - Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, **308**: 457-460, 1984.
- MORLEY, D. - Severe measles: some unanswered questions. *Rev.infect.Dis.*, **5**: 460-462, 1983.

- MURPHY, M.D.; BRUNELL, P.A.; LIEVENS, A.W. & SHEHAB, Z.M. - Effect of early immunization on antibody response to reimmunization with measles vaccine as demonstrated by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Pediatrics*, **74**: 90-93, 1984.
- NAGY, G.; KÓSA, S.; TAKÁTSY, S. & KOLLER, M. - The use of IgM tests for analysis of causes of measles vaccine failures: experience gained in an epidemic in Hungary in 1980 and 1981. *J.med.Virol.*, **13**: 93-103, 1984.
- NIETO, A.; GAYA, A.; JANSÁ, M.; MORENO, C. & VIVES, J. - Direct measurement of antibody affinity distribution by hapten-inhibition enzyme immunoassay. *Molec.Immunol.*, **21**: 537-543, 1984.
- NKOWANE, B.M.; BART, S.W.; ORENSTEIN, W.A. & BALTIER, M. - Measles outbreak in a vaccinated school population: epidemiology, chains of transmission and the role of vaccine failures. *Amer.J.public Hlth.*, **77**: 434-438, 1987.
- NOKES, D.J.; WILLIAMS, J.R. & BUTLER, A.R. - Towards eradication of measles virus: global progress and strategy evaluation. *Vet.Microbiol.*, **44**: 333-350, 1995.
- NORRBY, E. Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition(HI) test. *Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.)*, **11**: 814-818, 1962.
- NORRBY, E.; LAGERCRANTZ, R.; GARD, S. & CARLSTRÖM, G. - Measles vaccination. I.Serologic responses to an inactivated vaccine. *Arch.ges.Virusforsch.*, **13**: 548-558, 1963.
- NORRBY, E. - Occurrence of antibodies against envelope components after immunization with formalin inactivated and live measles vaccine. *J.biol.Stand.*, **3**: 375-380, 1975
- NORRBY, E. & OXMAN, M.N. - Measles virus. In: FIELDS, B.N. & KNIPE, D.M.,ed. *Virology*. 2.ed. New York, Raven Press, 1990. V.1, p.1013-1044.
- NOSSAL, G.J.V.- The molecular and cellular basis of affinity maturation in antibody response. *Cell*, **68**: 1-2, 1992.
- OBEID, O.E. & STEWARD, M.W. - The potential of immunization with synthetic peptides to overcome the immunosuppressive effect of maternal anti-measles virus antibodies in young mice. *Immunology*, **82**: 16-21, 1994.
- OBEID, O.E.; PARTIDOS, C.D. & STEWARD, M.W. - Analysis of the antigenic profile of measles virus haemagglutinin in mice and humans using overlapping synthetic peptides. *Virus Res.*, **32**: 69-84, 1994.
- OKUNO, Y.; UEDA, S.; KURIMURA, T.; SUZUKI, N.; YAMANISHI, K.; BABA, K.; TAKAHASHI, M.; KONOBE, T.; SASADA, T.; ONISHI, K. & TAKAKU, K. - Studies on further attenuated live measles vaccine. VII. Development and evaluation of CAM-70 measles virus vaccine. *Biken's J.*, **14**: 253-258, 1971.
- OLIVEIRA, S.A.; HOMMA, A.; MAHUL D.C.; LOUREIRO, M.L.P. & CAMILLO-COURA, L. - Avaliação das condições de estocagem da vacina contra o

sarampo nas unidades sanitárias dos Municípios de Niterói e São Gonçalo, Estado do Rio de Janeiro. *Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo*, 33: 313-318, 1991.

ORENSTEIN, W. ; MARKOWITZ, L.; PREBLUB, S.R.; HINMAN, A.R.; TOMASI, A.; BART, K.J. - Appropriate age for measles vaccination in the United States. *Devel.biol.Stand.*, 65: 13-21, 1986.

ORY, F.; ANTONAYA, J.; FERNÁNDEZ, M.V. & ECHEVARRIA, J.M. - Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J.clin.Microbiol.*, 31: 1669-1671, 1993.

OSTERHAUS, A.D.M.E.; DE VRIES, P. & VAN BINNENDIJK, R.S. - Measles vaccines: Novel generations and new strategies. *J.infect.Dis.*, 170(supl 1): S42-S55, 1994.

PABST, H.F.; SPADY, D.W.; MARUSYK, R.G.; CARSON, M.M.; CHUI, L.W.L.; JOFFRES, M.R. & GRIMSRUD, K.M. - Reduced measles immunity in infants in a well-vaccinated population. *Pediat.infect.Dis.J.*, 11: 525-529, 1992

PANNUTI, C.S.; SOUZA, V.A.U.F.; TAKAOKA, N.; LEME, S.T.S.; PEREIRA, C.R.; CARVALHO, R.P.S. & AMATO NETO, V. -Interferência entre as vacinas anti-sarampo e antipoliomielite. *Bol.Ofic.sanit.panamer.*, 103: 227-232, 1987.

PANNUTI, C.S.; SOUZA, V.A.U.F.; SATO, H.K.; FINK, M.C.D.S.; RIBEIRO, M.I.; HISI, S.K.; CASTELO, A. & MENDONÇA, J.S.- Avaliação sorológica de imunização contra o sarampo com duas doses administradas aos 6 e 11 meses de idade: estudo prospectivo. *Rev.Inst.Med.trop.S. Paulo*, 32: 450-455, 1990.

PANNUTI, C.S.; MORAES, J.C.; SOUZA, V.A.U.F.; CAMARGO, M.C.C.; HIDALGO, N.T.R. & OTHERS - Measles antibody prevalence after mass immunization in São Paulo, Brazil. *Bull.Wld.Hlth.Org.*, 69: 557-560, 1991.

PARTIDOS, C.D.; STANLEY, C.M. & STEWARD, M.W. - Immune responses in mice following immunization with chimeric synthetic peptides representing B and T cell epitopes of measles virus proteins. *J.gen.Virol.*, 72: 1293-1299, 1991.

POLAND, G.A. & JACOBSON, R.M. - Failure to reach the goal of measles elimination. Apparent paradox of measles infections in immunized persons. *Arch.int.Med.*, 154: 1815-1820, 1994.

PULLEN, G.R.; FITZGERALD, M.G. & HOSKING, C.S. - Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J.Immunol.Meth.*, 86: 83-87, 1986.

RADKOWSKI, M.; LASKUS, T.; GOCH, A. & SLUSARCZYK, J. - Affinity of anti-HBs antibody after hepatitis B vaccination. *Europ.J.clin.Invest.*, 22: 307-313, 1992.

RADKOWSKI, M.; LASKUS, T.; GOCH, A. & SLUSARCZYK, J. - Affinity of anti-gp41 antibody in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Europ.J.clin.Invest.*, 23: 455-458, 1993.

- RAUH, L.W. & SCHMIDT, R. - Measles immunization with killed virus vaccine. *Am.J.Dis.Child.*, **109**: 232-237, 1965.
- REUMAN, P.D. - Measles: ready for eradication. *Ann.intern.Med.*, **90**: 978-980, 1979.
- RISI, J.B., Jr - Control of measles in Brazil. *Rev.infect.Dis.*, **5**: 583-587, 1983.
- ROTA, J.S.; WANG, Z.D.; ROTA P.A. & BELLINI, W.J. - Comparison of sequences of the H, F, and N coding genes of measles virus vaccine strains. *Virus Res.*, **31**: 317-330, 1994a.
- ROTA, P.A.; BLOOM, A.E.; VANCHIERI, J.A. & BELLINI, W.J. - Evolution of the nucleoprotein and matrix genes of wild-type strains of measles virus isolated from recent epidemics. *Virology*, **198**: 724-730, 1994b.
- SABIN, A.B.; ARECHIGA, A.F.; CASTRO, J.F.; SEVER, J.L.; MADDEN, D.L.; SHEKARCHI, I. & ALBRECHT, P. - Successful immunization of children with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine. I. Different results with undiluted human diploid cell and chick embryo fibroblast vaccines. *J.Amer.med.Ass.*, **249**: 2651-2662, 1983.
- SABIN, A.B.; ARECHIGA, A.F.; DE CASTRO, J.F.; ALBRECHT, P.; SEVER, J.L. & SHEKARCHI, I. - Successful immunization of infants with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine. II. Vaccine comparisons and evidence for multiple antibody response. *J.Amer.med.Ass.*, **251**: 2363-2371, 1984.
- SABIN, A.B. - Measles, killer of millions in developing countries: strategy for rapid elimination and continuing control. *Europ.J.Epidem.*, **7**: 1-22, 1991.
- SABIN, A.B. - My last will and testament on rapid elimination and ultimate global eradication of poliomyelitis and measles. *Pediatrics*, **90**: 162-9, 1992.
- SAMB, B.; WHITTLE, H.; AABY, P.; SECK, A.M.C.; BENNET, J.; MARKOWITZ, L.; NGOM, P.T.; ZELLER, H.; MICHAELSEN, K.F. & SIMONDON, F. - No evidence of long-term immunosuppression after high-titer Edmonston-Zagreb measles vaccination in Senegal. *J.infect.Dis.*, **171**: 506-508, 1995.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica - Sarampo: Situação atual e proposta de estratégia de controle. Relatório de reunião de técnicos da Secretaria de Estado da Saúde. 1986.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica - Sarampo. Normas e instruções. Manual de vigilância epidemiológica, 1987.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica - Measles in the State of São Paulo. Relatório para o Programa Ampliado de Imunização, OPAS, 1991.
- SCHWARZ, A.J.F. - Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *Amer.J.Dis.Child*, **103**: 386-389, 1962.

- SHASBY, D.M.; SHOPE, T.C.; DOWNS, H.; HERRMANN, K.L. & POLKOWSKI, J. - Epidemic measles in a highly vaccinated population. **New Engl.J.Med.**, **296**: 585-589, 1977.
- SHEPARD, D.S. - Economic analysis of investment priorities for measles control. **J.infect.Dis.**, **170**(supl 1): S56-S62, 1994.
- SHESHERADARAN, H.; CHEN, S. & NORRBY, E. - Monoclonal antibodies against five structural components of measles virus. **Virology**, **128**: 341-353, 1983.
- SIMON, F.; RAHIMY, C.; KRIVINE, A.; LEVINE, M.; PEPIN, J.M.; LAPIERRE, D.; DENAMUR, E.; VERNOUX, L.; DE CREPY, A.; BLOT, P.; VILMER, E. & BRUN-VEZINET, F. - Antibody avidity measurement and immune complex dissociation for serological diagnosis of vertically acquired HIV-1 infection. **J.Acq.Imm.Def.Synd.**, **6**: 201-207, 1993.
- SÖDERLUND, M.; BROWN, C.S.; COHEN, B.J. & HEDMAN, K. - Accurate serodiagnosis of B19 Parvovirus infections by measurement of IgG avidity. **J.infect.Dis.**, **171**: 710-713, 1995.
- SOERENSEN, B.; TAKEDA, A.K.; NAKANDAKARE, I.K.; CURI, L.C.; UMEKITA, L.F.; ZUCCAS, W.A.; GUIDONI, R.; MAGALHÃES, E.; BRITTO, S.S. & FEIJÓ, I.C. - Sarampo: idade ótima e número de doses recomendadas para a vacinação no Brasil. **Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo**, **27**: 55-65, 1985.
- SOUZA, S.L. & CAMARGO, M.E. - The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for american trypanosomiasis serodiagnosis. **Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo**, **8**: 255-258, 1966.
- SOUZA, V.A.U.F.; PANNUTI, C.S.; GODOY, C.V.F.; ALBRECHT, P.; LOPES, M.H. & MENDONÇA, J.S.. - Comparison of indirect immunofluorescence test for measles antibodies with hemagglutination-inhibition and plaque neutralization test. **Rev.Inst.Med.trop.S. Paulo**, **32**: 360-363, 1990.
- SOUZA, V.A.U.F.; PANNUTI, C.S.; SUMITA, L.M. & ALBRECHT, P.- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measles antibody. A comparison with hemagglutination-inhibition, immunofluorescence and plaque neutralization tests. **Rev.Inst.Med.trop.S. Paulo**, **33**: 32-36, 1991.
- STEINER, L.A. & EISEN, H.N. - Sequential changes in the relative affinity of antibodies synthesized during the immune response. **J.exp.Med.**, **126**: 1161-1183, 1967a.
- STEINER, L.A. & EISEN, H.N. - The relative affinity of antibodies synthesized in the secondary response. **J.exp.Med.**, **126**: 1185-1205, 1967b.
- STETLER, H.C.; ORENSTEIN, W.A.; BERNIER, R.H.; HERRMANN, K.L.; SIROTKIN, B.; HOPFENSBERGER, D.; SCHUH, R.; ALBRECHT, P.; LIEVENS, A.W. & BRUNELL, P.A. - Impact of revaccinating children who initially received measles vaccine before 10 months of age. **Pediatrics**, **77**: 471-476, 1986.

- STEWART, M.W. & LEW, A.M.- The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J.Immunol.Meth.*, **78**: 173-190, 1985.
- STOKES, J.,JR; WEIBEL, R.; HALENDA, R.; REILLY, C.M. & HILLEMANN, M.R. - Ender's live measles-virus vaccine with human immune globulin. 1. Clinical reactions. *Amer.J. Dis.Child.*, **103**: 366-372, 1962.
- STOKES, J.Jr.; REILLY, C.M.; BUYNACK, E.B. & HILLEMANN, M.R. - Immunologic studies of measles. *Amer.J. Hyg.*, **74**: 293-303, 1961.
- TAKAHASHI, H.; TAKESHITA, T.; MOREIN, B.; PUTNEY, S.; GERMAIN, R.N. & BERZOFKY, J.A. - Induction of CD8⁺ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature*, **344**: 873-875, 1990.
- TAMASHIRO, V.G.; PEREZ, H.H. & GRIFFIN, D.E. - Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *Pediat.infect.Dis.J.*, **6**: 451-454, 1987.
- TAMIN, A.; ROTA, P.A.; WANG, Z.; HEATH, J.L.; ANDERSON, L.J. & BELLINI, W.J. - Antigenic analysis of current wild type and vaccine strain of measles virus. *J.infect.Dis.*, **170**: 795-801, 1994.
- TAYLOR, J.; WEINBERG, R.; TARTAGLIA, J.; RICHARDSON, C.; ALKHATIB, G.; BRIEDIS, D.; APPEL, M.; NORTON, E. & PAOLETTI, E. - Nonreplicating viral vectors as potential vaccines: recombinant canarypox virus expressing measles virus fusion (F) and hemagglutinin (HA) glycoproteins. *Virology*, **187**: 321-328, 1992.
- THOMAS, H.I.J. & MORGAN-CAPNER, P. - Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Epidem.Infect.*, **101**:591-598, 1988.
- THOMAS, H.I.J. & MORGAN-CAPNER, P.- Rubella-specific IgG₁ avidity: a comparison of methods. *J.Virol.methods*, **31**: 219-228, 1991a.
- THOMAS,H.I.J. & MORGAN-CAPNER, P - The use of antibody avidity measurements for the diagnosis of rubella. *Rev.med.Virol.*, **1**: 41-50, 1991b.
- THOMAS, H.I.J.; MORGAN-CAPNER, P.; ENDERS, F.; O'SHEA, S.; CALDICOTT, D.& BEST, J.M. - Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG₁ following primary rubella. *J.virol.Meth.*, **39**: 149-155, 1992.
- TIDJANI, O.; GRUNITSKY, B.; GUÉRIN, N.; LÉVY-BRUHL, D.; LECAM, N.; XUEREFF, C. & TATAGAN, K. - Serological effects of Edmonston-Zagreb, Schwarz and AIK-C measles vaccine strains given at age 4-5 or 8-10 months. *Lancet*, **2**: 1357-1360, 1989.
- TUOKKO, H. - Detection of acute measles infections by indirect and μ -capture enzyme immunoassays for immunoglobulin M antibodies and measles immunoglobulin G antibody avidity enzyme immunoassay. *J.med.Virol.*, **45**: 306-311, 1995.

- UNDERWOOD, P.A. - Measurement of the affinity of antiviral antibodies. *Advanc.Virus Res.*, **34**: 283-309, 1988.
- VAZ DE LIMA, L.R.A.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; SOUZA, V.A.U.F.; SUMITA, L.M., PANNUTI, C.S.; ANDRADE JR, H.F. & FERREIRA, A.W.- Measles serodiagnosis: standardization and evolution of a dot-ELISA. *Rev. Inst Med. trop.S.Paulo*, **36**: 139-147, 1994.
- VOLLER, A. & BIDWELL, D.E. - Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination. *Brit.J.exp.Path.*, **57**: 243-247, 1976.
- VYDELINGUM, S.; SURYANARAYANA, K.; MARUSYK, R.G. & SALMI, A.A. - Replication of measles virus in human monocytes and T cells. *Canad.J.Microbiol.*, **41**: 620-623, 1995.
- WARD, K.N.; GRAY, J.J.; JOSLIN, M.E. & SHELDON, M.J. - Avidity of IgG antibodies to human Herpesvirus-6 distinguishes primary from recurrent infection in organ transplant recipients and excludes cross-reactivity with other herpesviruses. *J.med.Virol.*, **39**: 44-49, 1993a.
- WARD, K.N.; GRAY, J.J.; FOTHERINGHAM, M.W. & SHELDON, M.J. - IgG antibodies to Human Herpesvirus-6 in young children: changes in avidity of antibody correlate with time after infection. *J.med.Virol.*, **39**: 131-138, 1993b.
- WARD, K.N. & GRAY, J.J. - Primary human Herpesvirus-6 infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. *J.med.Virol.*, **42**: 119-123, 1994.
- WARD, K.N.; DHALIWAL, W.; ASHWORTH, K.L.; CLUTTERBUCK, E.J. & TEO, C.G. - Measurement of antibody avidity for hepatitis C virus distinguishes primary antibody responses from passively acquired antibody. *J.med.Virol.*, **43**: 367-372, 1994.
- WARREN, J. & GALLIAN, M.J. - Concentrated inactivated measles-virus vaccine. Preparation and antigenic potency. *Amer.J.Dis.Child.*, **103**: 418-422, 1962.
- WEIBEL, R.; HALENDA, R.; STOKES, J.,JR.; HILLEMANN, M.R. & BUYNACK, E.B. - Administration of Ender's live measles virus vaccine with human immune globulin. *J.Amer.med.Ass.*, **180**: 1086-1094, 1962.
- WEN, Y.M.; DUAN, S.C.; HOWARD, C.R.; FREW, A.F. & STEWARD, M.W. - The affinity of anti-HBc antibodies in acute and chronic hepatitis B infection. *Clin.exp.Immunol.*, **79**: 83-86, 1990.
- WHITTLE, H.C.; DOSSETOR, J.; ODULOJU, A.; BRYCESON, A.D.M. & GREENWOOD, B.M. - Cell-mediated immunity during natural measles infection. *J.clin.Invest.*, **62**: 678-684, 1978.
- WHITTLE, H.C.; ROWLAND, M.G.M.; MANN, G.F.; LAMB, W.H. & LEWIS, R.A. - Immunization of 4-6 months old Gambian infants with Edmonston-Zagreb measles vaccine. *Lancet*, **2**: 834-837, 1984.

- WHITTLE, H.C.; MANN, G.; ECCLES, M.; O'NEILL, K.; JUPP, L.; HANLON, P.; HANLON, L. & MARSH, V.. - Effects of dose and strain of vaccine on success of measles vaccination of infants aged 4-5 months. *Lancet*, 1: 963-966, 1988a
- WHITTLE, H.; HANLON, P.; O'NEILL, K.; HANLON, L.; MARSH, V.; JUPP, E. & AABY, P. - Trial of high-dose Edmonston-Zagreb measles vaccine in the Gambia: antibody response and side-effects. *Lancet*, 2: 811-814, 1988b.
- WILD, T.F.; BERNARD A.; SPEHNER, D. & DRILLIEN, R. - Construction of vaccinia virus recombinants expressing several measles virus and analysis of their efficacy in vaccination of mice. *J.gen.Virol.*, 73: 359-367, 1992.
- WILKINS, J. & WEHRLE, P.F.- Additional evidence against measles vaccine administration to infants less than 12 months of age: altered immune response following active/passive immunization. *J.Pediat.*, 94: 865-869, 1979.
- WOOD, D.L. & BRUNELL, P.A. - Measles control in the United States: problems of the past and challenges for the future. *Clin.microbiol.Rev.*, 8: 260-267, 1995.
- WOOLSON, R.F. - **Statistical methods for the analysis of biomedical data**. John Wiley & Sons, New York. 1987
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - EXPANDED PROGRAM ON IMMUNIZATION - Stability of freeze-dried measles vaccine. *Wkly Epidem.Rec.*, 56: 177-184, 1981.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - EXPANDED PROGRAM ON IMMUNIZATION- Research into alternative measles vaccines in the 1990's. WHO/EPI/Gen/88.11, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - EXPANDED PROGRAM ON IMMUNIZATION- Measles control in the 1990s: measles serology. WHO/EPI/Gen/90.4, 1990a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - EXPANDED PROGRAM ON IMMUNIZATION- Measles control in the 1990s: Introduction of High titre measles vaccines. WHO/EPI/Gen/90.7, 1990b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - EXPANDED PROGRAM ON IMMUNIZATION- Measles control I in the 1990s: plan of action for global measles control. WHO/EPI/Gen/92.3, 1992a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - EXPANDED PROGRAM ON IMMUNIZATION - Safety of high titer measles vaccines. *Wkly Epidem.Rec.*, 67: 357-364, 1992b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - EXPANDED PROGRAM ON IMMUNIZATION. Booster dose policy. EPI/GAG/92/WP.10, 1992c.