Fatuma Catherine Atieno Odongo

**Estudo piloto randomizado controlado e aberto para avaliação
da imunogenicidade e segurança de três esquemas de
administração da vacina influenza trivalente em receptores de
transplante renal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Lígia Camera Pierrotti

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Odongo, Fatuma Catherine Atieno

Estudo piloto randomizado controlado e aberto
para avaliação da imunogenicidade e segurança de três
esquemas de administração da vacina influenza
trivalente em receptores de transplante renal /

Fatuma Catherine Atieno Odongo. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Lígia Camera Pierrotti.

Descritores: 1.Vacinas contra influenza
2.Receptor de transplante renal 3.Imunogenicidade
da vacina 4.Esquema alternativo de vacinação 5.Dose
dobrada 6.Dose de reforço

USP/FM/DBD-430/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus. Ele que a minha vida preservou e me concedeu saúde plena. Ele que colocou anjos no meu caminho, para que a cada dificuldade que enfrentasse, estes se levantassem para me ajudar, sem esperar nada em troca.

Ao meu pai, James William Odongo Nyam, que a todos os filhos, garantiu uma boa educação. Foi rígido, mas agora entendo o porquê. Tenho muito orgulho de você!

À minha mãe, Grace Nekesa Khisa. Queria muito que estivesse aqui, mas tenho fé de que tenha me acompanhado durante os anos.

Ao meu maior presente, um pedaço de mim, Asifa Odongo Woidaleski. Pequena, você me fez experimentar o mais profundo amor incondicional e a valorizar mais a vida. Você que dizia: “mamãe vai trabalhar” e ficava sozinha assistindo a vídeos infantis. Em breve teremos muito tempo para brincar.

Aos meus irmãos: Kizito Nyam, Mildred Akinyi Odongo (em memória), Joseph Ondiek Odongo, Erick Odhiambo Odongo e Norine Achieng Odongo. A sobrinha/irmã adotada por nós: Rachel Amondi Odongo. Obrigada!

A todos os receptores de transplante de órgãos!

Que a ciência sempre proporcione descobertas que tragam melhorias, qualidade de vida e longevidade!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos pacientes que se esforçaram para participar deste estudo. Sem vocês, não seria possível!

Agradeço profundamente à minha orientadora, Profa. Dra. Lígia Camera Pierrotti, pela paciência, motivação e confiança. O seu zelo pela qualidade me fez aprender e refletir muito mais. Admiro a sua integridade e competência.

Agradeço à enfermeira Fabiana Agena pela imensa ajuda nas fases iniciais do estudo.

Agradeço às equipes do: Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP, Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais do HCFMUSP, setor de Ensaio Clínicos do Instituto Butantan, Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, Departamento e Divisão de Moléstias Infeciosas e Parasitárias, em especial a Luiza da Biblioteca da Divisão de Moléstias Infeciosas e Parasitárias.

Agradeço ao Jorge Luiz Woidaleski por ter me apoiado e ajudado imensamente permitindo que eu tivesse mais tempo nessa reta final de correção da tese.

Aos amigos pelo apoio e motivação durante o percurso da vida: Adriana Yineth Montero Cruz, Alessandra Aissawa, Edson Reis, Euler Sandeville, Francisco Costa da Silva Junior, Francy Mayerly Sanchez Cruz, Janeita Reid, Lescia Pereira Jatobá, Matthias Freiburger, Rosario Quiroga Ferrufino.

À equipe do centro de pesquisas clínicas do Dr. Esper Kallas, pois foi com vocês que aprendi e obtive a melhor experiência com ensaios clínicos. No CPC, aprendi o verdadeiro significado de humildade e trabalho em equipe!

Aos professores e bancas de qualificação e de defesa da minha tese, restará gratidão profunda em toda minha carreira acadêmica e assistencial.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso e Valéria Vilhena. 3ª edição, São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de tabelas e quadros	
Lista de figuras e gráficos	
Lista de apêndices	
Resumo	
Abstract	

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	RELEVÂNCIA DO TEMA ESCOLHIDO	2
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	O AGENTE ETIOLÓGICO	5
2.2	EPIDEMIOLOGIA DA INFLUENZA	7
2.3	PATOGENIA DA INFLUENZA	9
2.4	RESPOSTA IMUNE	11
2.5	FATORES DE VIRULÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA	13
2.6	COMPLICAÇÕES DA INFLUENZA	14
2.7	FATORES DE RISCO PARA COMPLICAÇÕES EM IMUNODEPRIMIDOS	15
2.7.1	<i>Pneumonia viral</i>	15
2.7.2	<i>Pneumonia bacteriana</i>	16
2.7.3	<i>Internação hospitalar e óbito</i>	17
2.7.4	<i>Rejeição do enxerto</i>	19
2.8	DIAGNÓSTICO	20
2.9	TRATAMENTO	22
2.10	PREVENÇÃO	24
2.10.1	<i>Medidas gerais</i>	24
2.10.2	<i>Quimioprofilaxia</i>	25
2.10.3	<i>Vacinação</i>	27
2.11	TIPOS DE VACINAS	28
2.11.1	<i>Vacinas inativadas</i>	29
2.11.2	<i>Vacinas atenuadas</i>	30
2.12	AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DAS VACINAS DE INFLUENZA	31
2.12.1	<i>Imunogenicidade celular</i>	31
2.12.2	<i>Imunogenicidade humoral</i>	32
2.13	PADRONIZAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE IMUNOGENICIDADE	34
2.14	RELEVÂNCIA DOS CORRELATOS IMUNOLÓGICOS DE PROTEÇÃO	36
2.15	IMUNOGENICIDADE EM IMUNODEPRIMIDOS	38
2.15.1	<i>Dose padrão da vacina</i>	39
2.15.2	<i>Alta dose da vacina</i>	52
2.15.3	<i>Dose de reforço</i>	60
2.15.4	<i>Administração intradérmica da vacina</i>	68
2.16	EFICÁCIA E EFETIVIDADE VACINAL	72
2.16.1	<i>População geral</i>	72
2.16.2	<i>Imunodeprimidos</i>	75
3	OBJETIVOS	77
3.1	PRIMÁRIO	78
3.2	SECUNDÁRIO	78
3.3	EXPLORATÓRIOS	78
4	MÉTODOS	79

4.1	DESENHO	80
4.2	TAMANHO AMOSTRAL.....	80
4.3	POPULAÇÃO.....	80
4.3.1	<i>Transplantados renais</i>	81
4.3.2	<i>Adultos sadios</i>	82
4.4	RANDOMIZAÇÃO	84
4.5	VACINAÇÃO.....	85
4.6	DELINEAMENTO DO ESTUDO	85
4.6.1	<i>Visita de vacinação –Dia 0</i>	87
4.6.2	<i>Contato de segurança – Dia 4 após cada vacinação</i>	87
4.6.3	<i>1ª Visita de avaliação de segurança e imunogenicidade da vacina – Dia 21 + 7</i>	88
4.6.4	<i>2ª Visita de avaliação de segurança e imunogenicidade da vacina – Dia 42 + 7</i>	89
4.6.5	<i>Contato de vigilância de quadro respiratório agudo</i>	89
4.6.6	<i>Vigilância de rejeição do enxerto</i>	91
4.6.7	<i>Avaliação laboratorial de imunogenicidade</i>	91
4.7	COLETA E ENTRADA DE DADOS	94
4.7.1	<i>Variáveis preditoras</i>	95
4.7.2	<i>Variáveis de desfecho</i>	95
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	96
4.9	ÉTICA EM PESQUISA.....	99
5	RESULTADOS.....	100
5.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	101
5.1.1	<i>Características demográficas</i>	104
5.1.2	<i>Características clínico-laboratoriais</i>	107
5.2	IMUNOGENICIDADE HUMORAL	111
5.2.1	<i>Soroconversão</i>	111
5.2.2	<i>Soroproteção</i>	114
5.2.3	<i>Médias geométricas dos títulos de anticorpos</i>	117
5.3	FATORES PREDITIVOS DE RESPOSTA VACINAL	121
5.3.1	<i>Cepa vacinal A/H1N1</i>	122
5.3.2	<i>Cepa vacinal A/H3N2</i>	126
5.3.3	<i>Cepa vacinal B</i>	130
5.4	SEGURANÇA DA VACINA	134
5.4.1	<i>Avaliação após a primeira vacinação</i>	134
5.4.2	<i>Avaliação após a segunda vacinação</i>	137
5.4.3	<i>Vigilância até o término do estudo</i>	137
5.5	DESFECHOS CLÍNICOS	138
5.5.1	<i>Influenza</i>	138
5.5.2	<i>Rejeição do enxerto</i>	140
6	DISCUSSÃO	141
7	CONCLUSÕES	167
8	REFERÊNCIAS	169
9	APÊNDICES.....	181

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC – *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos)

A/H1N1pdm09 – Influenza A/H1N1 pandêmico do ano 2009

AJ – Artrite juvenil

ANOVA – *Analysis of Variance* (análise de variância)

AR – Artrite reumatóide

AS – Adultos saudáveis

ATG – Antithymocyte globulin (imunoglobulina antitimócito)

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de controle e prevenção de doenças)

CRIE-HCFMUSP – Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CPMP-EMA – *Committee for Proprietary Medicinal Products of the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (Comitê Europeu de Produtos Medicinais da Agência Europeia para avaliação de Produtos Medicinais)

CRFs – *Case Report Forms* (formulário de registro de dados fonte)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (ácido deoxirribonucleico)

DP – Dose padrão

DD – Dose dobrada

DRC – Doença renal crônica

DR – Dose de reforço

DQ – Dose quadruplicada

ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

EMA – *European Medicines Agency* (Agência Europeia de Medicamentos)

EPI – Equipamento de Proteção Individual

EUA – Estados Unidos Da América

GISRS – *Global Influenza Surveillance and Response System* (rede global de vigilância da influenza)

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCMED – Sistema eletrônico de laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HA – Hemaglutinina

HD – Hemodiálise

HI – *Haemagglutination Inhibition* (Inibição de hemaglutinação)

HLA – *Human Leukocyte Antigen* (antígeno leucocitário humano)

ID – Intradérmica

IM – Intramuscular

IFN-1 – Interferon tipo 1

IFN- γ – *Interferon Gamma*

LAIV – *Live Attenuated Influenza Vaccine* (vacina atenuada)

LTT – *Lymphocyte Transformation Test* (teste de transformação linfocitária)

M1 – Proteínas de matriz 1

M2 – Proteínas de matriz 2

MDCK – *Madin-Darby Canine Kidney* (células de rim canino linhagem Mardin-Darby)

MGT – Média Geométrica de Títulos

mITT – *Modified intention to treat* (intenção de tratar modificada)

Micront-ELISA – *Microneutralization Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ensaio de microneutralização)

NA – Neuraminidase

NK – *Natural Killer* (exterminadora natural)

NOS2 – *Nitric Oxide Synthase* (óxido nítrico sintase)

NP – Nucleoproteína

NS – Valor de p não significativo

NS1 – *Non structural protein 1* (proteína não estrutural 1)

NS2 – *Non structural protein 2* (proteína não estrutural 2)

OR – *Odds Ratio* (Razão de chances)

ORa – *Odds Ratio* ajustada (Razão de chances ajustada)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – polimerase ácida

PAMPS – *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (padrões associados a patógenos)

PB1 – Polimerases básica 1

PB2 – Polimerases básica 2

PP – Por Protocolo

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (solução tampão de fosfato salina)

PVHIV – Pessoas vivendo com HIV/aids

RDE – *Receptor Destroying Enzyme* (enzima destruidora de receptores)

RMG – Razão das médias geométricas de títulos

RP – Razão de Prevalência

RR – Risco relativo

RTR – Receptor de Transplante Renal

RIG-1 – *Retinoic Acid Inducible Gene 1* (gene induzido pelo ácido retinóico)

RNA – *Ribonucleic Acid* (ácido ribonucleico)

RT-PCR – *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia de polimerização em tempo real)

SG – Síndrome Gripal

SRAG – Síndrome Respiratória Aguda Grave

SRH – *Single Radial Haemolysis* (hemólise radial simples)

STR-HCFMUSP – Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

TCLE – Termos de Consentimento livre e Esclarecido

TCTH – Transplante de Células Troncos Hematopoiéticas

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TLR-7 – *Toll-Like Receptor 7* (receptor do tipo Toll 7)

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral)

TOS – Transplante de Órgãos Sólidos

TR – Transplantados renais

Tx – Transplante

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VIT – Vacina Influenza Trivalente

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 -	Critérios de imunogenicidade adequada por faixa etária conforme os critérios da EMA em 1997 _____	36
Tabela 2 -	Estudos de corte prospectivo avaliando resposta à dose padrão da vacina em transplantados renais _____	48
Tabela 3 -	Ensaios clínicos randomizados e controlados avaliando resposta à alta dose da vacina em imunodeprimidos _____	58
Tabela 4 -	Estudos avaliando resposta à dose de reforço da vacina em imunodeprimidos _____	65
Tabela 5 -	Estudos avaliando resposta à vacinação intradérmica vacina em imunodeprimidos _____	70
Tabela 6 -	Resumo dos grupos de tratamento com as alocações das doses da vacina _____	85
Tabela 7 -	Distribuição das características demográficas nos três grupos de transplantados renais e adultos saudáveis no D0 (análise mITT) _	105
Tabela 8 -	Distribuição das características demográficas nos três grupos de transplantados renais no D0 (análise PP) _____	106
Tabela 9 -	Distribuição das características clínico-laboratoriais nos três grupos de transplantados renais no D0 nas análises mITT e PP _____	108
Tabela 10 -	Taxas de soroconversão com seus respectivos IC95% para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação no D21/D42 em relação à pré-vacinação no D0 nas análises mITT e PP _____	112
Tabela 11 -	Taxas de soroproteção com seus respectivos IC95% para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação no D21/D42 em relação à pré-vacinação no D0 nas análises mITT e PP _____	115
Tabela 12 -	Médias geométricas com suas razões e seus respectivos IC95% para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação no D21/D42 em relação à pré-vacinação no D0 nas análises mITT e PP _____	118

Tabela 13 - Análises bivariada e multivariada de fatores associadas à soroconversão para a cepa vacinal A/H1N1 entre transplantados renais da população PP com seus respectivos IC95% e ajuste para a dose da vacina e idade _____	123
Tabela 14 - Análises bivariada e multivariada de fatores associadas à soroconversão para a cepa vacinal A/H3N2 entre transplantados renais da população PP com seus respectivos IC95% e ajuste para a dose da vacina e idade _____	127
Tabela 15 - Análises bivariada e multivariada de fatores associadas à soroconversão para a cepa vacinal B entre transplantados renais com ajuste para as variáveis dose da vacina e idade (população PP) _____	131
Tabela 16 - Ocorrência de eventos adversos e reações adversas solicitadas e não solicitadas nos três primeiros dias após a vacinação entre os transplantados renais (população mITT) _____	134
Tabela 17 - Frequência de reações adversas solicitadas nos três primeiros dias após a primeira vacinação entre os transplantados renais por grupo de vacinação nas análises mITT e PP _____	136
Tabela 18 - Distribuição de sintomáticos respiratórios nos três grupos transplantados renais durante as 26 semanas de vigilância de influenza _____	138
Tabela 19 - Distribuição do número de casos de rejeição aguda e crônica nos três grupos de transplantados renais diagnosticados durante 26 semanas de seguimento _____	140
Quadro 1 - Características de casos confirmados de influenza _____	139

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 -	Estrutura do vírus Influenza _____	6
Figura 2 -	Replicação do vírus Influenza _____	13
Figura 3 -	Esquema do delineamento do estudo a partir da triagem até fim do estudo _____	86
Figura 4 -	Fluxograma de seguimento dos participantes _____	103
Gráfico 1 -	Taxas de soroconversão para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação (mITT) _____	113
Gráfico 2 -	Taxas de soroconversão para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação (PP) _____	113
Gráfico 3 -	Taxas de soroproteção para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pré- e pós-vacinação (mITT) _____	116
Gráfico 4 -	Taxas de soroproteção para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pré- e pós-vacinação (PP) _____	116
Gráfico 5 -	MGT na avaliação pré- e pós-vacinação para cada cepa vacinal e grupo de vacinação (mITT) _____	119
Gráfico 6 -	RMG na avaliação pós-vacinação para cada cepa vacinal e grupo de vacinação (mITT) _____	119
Gráfico 7 -	MGT na avaliação pré- e pós-vacinação para cada cepa vacinal e grupo de vacinação (PP) _____	120
Gráfico 8 -	RMG na avaliação pós-vacinação para cada cepa vacinal e grupo de vacinação (PP) _____	120

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A -	Termo de consentimento livre e esclarecido dos receptores de transplante renal _____	182
APÊNDICE B -	Termo de consentimento livre e esclarecido dos voluntários sadios _____	191
APÊNDICE C -	Foto dos cartões com o grupo de randomização e a dose da vacina _____	200
APÊNDICE D -	Classificação da intensidade dos Eventos Adversos solicitados _____	201
APÊNDICE E -	Classificação da relação causal dos Eventos Adversos solicitados _____	202
APÊNDICE F -	Aprovação do protocolo estudo _____	203
APÊNDICE G -	Eventos adversos -e reações adversas em até 3 dias após vacinação no grupo da dose padrão da vacina na população mITT _____	205
APÊNDICE H -	Eventos adversos e reações adversas em até 3 dias após vacinação no grupo da dose dobrada da vacina na população mITT _____	206
APÊNDICE I -	Eventos adversos e reações adversas em até 3 dias após vacinação no grupo da dose de reforço da vacina na população mITT _____	207
APÊNDICE J -	Ocorrência de eventos adversos sérios por grupo de vacinação mostrando o início, a duração e o desfecho _____	208

RESUMO

Odongo, FCA. *Estudo piloto aberto randomizado paralelo para avaliação da imunogenicidade e segurança de três esquemas de administração da vacina influenza trivalente em receptores de transplante renal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Receptores de transplante de órgãos apresentam altas taxas de complicações associadas à influenza e a imunogenicidade vacinal é menor nestes indivíduos. Avaliamos a imunogenicidade e segurança de uma dose dobrada (DD-VIT) e uma dose de reforço (DR-VIT) da vacina influenza trivalente fragmentada e inativada, comparadas à dose padrão (DP-VIT) em receptores de transplante renal (RTR). Foram recrutados e randomizados 176 RTR para os grupos de vacinação (59 DP-VIT, 59 DD-VIT e 58 DR-VIT) e incluímos 15 adultos saudáveis como controles da DP-VIT. Foram vacinados 172 RTR (57 DP-VIT, 58 DD-VIT e 57 DR-VIT) e 14 adultos saudáveis. Conclusão de esquema de vacinação e todas as coletas de sangue conforme o protocolo foi confirmado para 120 RTR (44 DP-VIT, 44 DD-VIT e 32 DR-VIT) e 13 adultos saudáveis. As taxas de soroconversão foram abaixo das recomendações da Agência Europeia de Medicamentos em todos os grupos sugerindo baixa antigenicidade da vacina. O grupo de RTR que recebeu DR-VIT apresentou as maiores taxas de soroconversão e razão das médias geométricas de títulos de anticorpos do que os outros grupos, incluindo o grupo controle de adultos saudáveis. Entre os RTR, a DR-VIT induziu significativamente maiores taxas de soroconversão e razão das médias geométricas de títulos de anticorpos para as cepas de Influenza A do que a DP-VIT tanto na análise por intenção de tratar (A/H1N1 - 34,5% versus 8,5%, $p=0,002$ e 2,6 versus 1,4; A/H3N2 - 37,9% versus 18,6%, $p=0,051$ e 3,0 versus 1,8, $p=0,046$) como na análise por protocolo (A/H1N1 - 37,5% versus 9,1%, $p=0,024$ e 2,4 versus 1,3, $p=0,013$; A/H3N2 - 37,9% versus 18,6%, $p=0,051$ e 3,1 versus 1,7, $p=0,132$). As taxas de soroproteção foram adequadas em todos os grupos, mas o grupo de RTR que recebeu a DP-VIT apresentou as menores taxas em relação aos adultos saudáveis que receberam a mesma dose da vacina e os outros grupos de RTR. Entre os RTR, as taxas de

soroproteção foram maiores para as três cepas vacinais após DR-VIT do que DP-VIT, com significância estatística para A/H3N2 (96,9% versus 70,5% $p=0,003$). Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa dos desfechos avaliados para a cepa B. A DD-VIT promoveu maiores taxas de soroconversão e razão das médias geométricas de títulos para as cepas de Influenza A, e maiores taxas de soroproteção para todas as três cepas vacinais, em relação à DP-VIT, embora sem significância estatística. Na análise multivariada por protocolo, a DR-VIT obteve uma associação independente com a soroconversão para A/H3N2 (RP=2,99; IC95%=1,42-6,26; $p=0,03$). Não foi observada maior incidência de eventos adversos ou rejeição aguda do enxerto renal com a DD-VIT ou DR-VIT. Em conclusão, DR-VIT foi superior a DD-VIT em nosso estudo. Ambas as estratégias de vacinação foram seguras e necessitam de estudos multicêntricos visando comparação direta de sua imunogenicidade e eficácia em indivíduos imunodeprimidos.

Palavras-chave: Vacinas contra influenza; Receptor de transplante renal; Imunogenicidade da vacina; Esquema alternativo de vacinação; Dose dobrada; Dose de reforço.

ABSTRACT

Odongo, FCA. *A randomised controlled open-label parallel group pilot study evaluating the immunogenicity and safety of three regimens of the trivalent inactivated influenza vaccine in kidney transplant recipients* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Solid organ transplant recipients present high burdens of influenza-associated complications and vaccine immunogenicity is lower in these individuals. We evaluated the immunogenicity and safety of a double-dose (DD-TIV) and a booster dose (BD-TIV) of the trivalent inactivated split-virus influenza vaccine compared to the standard dose (SD-TIV) in kidney transplant recipients (KTR). We enrolled and randomized 176 KTR to each vaccination group (59 SD-TIV, 59 DD-TIV and 58 BD-TIV) and we enrolled 15 healthy controls as SD-TIV control group. Vaccination was confirmed for 172 KTR (57 SD-TIV, 58 DD-TIV and 57 BD-TIV) and 14 healthy adults. Conclusion of vaccination schedule and provision of blood samples according to the study protocol was confirmed for 120 KTR (44 SD-TIV, 44 DD-TIV and 32 BD-TIV) and 13 healthy adults. Seroconversion rates were below the European Medicines Agency in all treatment groups suggesting low vaccine antigenicity. The KTR group that received BD-TIV presented the highest seroconversion rates than the rest, including the healthy control group. Among KTR, BD-TIV induced significantly higher seroconversion and mean geometric ratios for Influenza A antigens compared to SD-TIV both in the modified intention to treat (A/H1N1 - 34.5% versus 8.5%, $p=0.002$ and 2.6 versus 1.4; A/H3N2 - 37.9% versus 18.6%, $p=0.051$ and 3.0 versus 1.8, $p=0.046$) and per protocol analyses (A/H1N1 - 37.5% versus 9.1%, $p=0.024$ and 2.4 versus 1.3, $p=0.013$; A/H3N2 - 37.9% versus 18.6%, $p=0.051$ and 3.1 versus 1.7, $p=0.132$). Seroprotection rates were adequate in all groups, with the KTR group that received SD-TIV presenting the lowest rates compared to the healthy control group that received the same vaccine dose and the other KTR groups. Among the KTR treatment groups, seroprotection rates were higher after BD-TIV than SD-TIV for the three vaccine antigens, with statistical significance for A/H3N2 (96.9% versus 70.5%

p=0.003). No statistically significant differences were observed for the Influenza B antigen. DD-TIV resulted in higher seroconversion and mean geometric ratios for Influenza A antigens, as well as higher seroprotection rates for all three vaccine antigens, compared to SD-TIV, albeit without statistical significance. In the per protocol multivariate analysis, BD-TIV was independently associated with seroconversion to A/H3N2 (RP=2.99; IC95%=1.42-6.26; p=0.03). We did not observe a higher incidence of adverse events or acute graft rejection with DD-TIV or BD-TIV. In conclusion, BD-TIV was superior to DD-TIV in our study. Both vaccination strategies require head-to-head multicentre comparisons of their immunogenicity and efficacy in immunosuppressed individuals.

Key words: Influenza vaccines; Kidney transplant recipient; Vaccine immunogenicity; Alternative vaccination regimen; Double-dose vaccination; Booster-dose vaccination.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do tema escolhido

A influenza é uma doença respiratória aguda de significativa importância epidemiológica e é considerada um problema de saúde pública mundial pela alta transmissibilidade, pelas constantes epidemias anuais e também pelo potencial risco de pandemias.

Embora geralmente autolimitada, a influenza apresenta elevadas taxas de complicações como internação hospitalar e óbito na população de risco. Na pandemia mais recente de influenza em 2009 demonstrou-se maior impacto da doença em imunodeprimidos do que na população geral. Por este motivo, recomenda-se a vacinação anual como principal estratégia de prevenção da influenza em todos os indivíduos, mas principalmente nos indivíduos com maior risco às complicações como os imunodeprimidos submetidos a transplante de órgãos e imunossupressão medicamentosa. Recomenda-se atualmente vacinação com a dose padrão da vacina influenza trivalente inativada contendo 15 mcg de antígeno para cada uma das três cepas de vírus vacinal (Influenza A/H1N1pdm09, A/H3N2 e B).

No entanto, estudos de imunogenicidade relatam menor resposta vacinal na população de risco do que na população geral, com as menores taxas de soroconversão e soroproteção entre imunodeprimidos, particularmente os receptores de transplante de órgãos sólidos e de células troncos hematopoiéticos. Dentre os imunodeprimidos, alguns estudos relatam pior imunogenicidade vacinal em transplantados renais do que nos outros receptores de transplante de órgãos sólidos, pessoas vivendo com HIV e portadores de doenças reumatológicas.

Estudos sobre esquemas alternativos de vacinação para aumentar a imunogenicidade das vacinas de influenza em imunodeprimidos têm sido realizados com maior frequência a partir da última pandemia de influenza em 2009. Surgiram na literatura estudos avaliando como estratégias de aumento da imunogenicidade a administração de dose de reforço de duas a cinco semanas após a primeira dose da vacina, dose dobrada contendo 30 mcg de antígeno para cada cepa de vírus vacinal ou dose quadruplicada contendo 60

mcg de antígeno para cada cepa de vírus vacinal em imunodeprimidos. No entanto, tais estudos possuem desenhos heterogêneos e pequenos tamanhos amostrais com baixo poder estatístico, comprometendo assim a interpretação dos resultados. Ao mesmo tempo, estudos sobre eficácia/efetividade da vacina de influenza entre imunodeprimidos, independentemente da dose utilizada, são ainda mais escassos do que os estudos de imunogenicidade.

Devido à heterogeneidade dos resultados da imunogenicidade e eficácia/efetividade das vacinas de influenza entre imunodeprimidos, estudos adicionais são necessários para esclarecer estes dados. Portanto, os principais objetivos desta tese foram comparar a imunogenicidade humoral e segurança da dose dobrada e da dose de reforço da vacina influenza trivalente inativada em receptores de transplante renal em relação à dose padrão da vacina. Assim como em estudos prévios, a nossa hipótese é que o aumento da carga antigênica da vacina aumentaria a imunogenicidade humoral nessa população.

O capítulo a seguir apresenta a contextualização do tema, com resumos de dados da literatura sobre a influenza com principal foco na vacinação que é a estratégia primária de prevenção em todos indivíduos a partir dos seis meses de idade. No que tange às vacinas de influenza, o foco desta tese está na imunogenicidade, correlatos imunológicos de proteção e eficácia/efetividade de diferentes esquemas de vacinação em imunodeprimidos, particularmente os resultados de estudos que confrontam a imunogenicidade e eficácia/efetividade de esquemas alternativos de vacinação com a dose padrão da vacina.

Após a revisão da literatura, os capítulos subsequentes seguem a estruturação tradicional iniciando com os objetivos do estudo, a metodologia empregada, os resultados, a discussão dos resultados em relação à literatura e finalizando com as principais conclusões da tese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O agente etiológico

A influenza é uma infecção respiratória aguda causada pelos *Myxovirus influenzae* da família *Orthomyxoviridae*. O vírus da influenza foi inicialmente isolado de porcos em 1931, seguido de isolamento de seres humanos em 1933. São conhecidos três espécies de vírus Influenza que infectam seres humanos – A, B e C(1,2). Do ponto de vista epidemiológico, Influenza A e B são responsáveis pelas epidemias sazonais no mundo; já a ocorrência de doença pelo Influenza C é raríssimo e, portanto, este vírus não é epidemiologicamente significativo(2–4).

Os vírus Influenza apresentam-se como partículas envelopadas de formato esférico ou filamentoso com diâmetro de 80 a 120 nanômetros. O envelope externo dos vírus Influenza A e B contém duas camadas lipídicas e duas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) que são mutáveis e sofrem variação genética. O vírus Influenza C possui apenas uma glicoproteína que é estável do ponto de vista antigênica(1). Todos possuem genoma segmentado de ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid* - RNA) de fita simples senso negativo. O RNA é envolto por uma nucleoproteína (NP) formando o nucleocapsídeo proteico, um antígeno estável que diferencia as espécies de vírus Influenza A, B e C. Os RNAs dos vírus Influenza A e B possuem oito segmentos que codificam 10 proteínas, enquanto o Influenza C possui sete segmentos(1,5).

O RNA dos vírus Influenza A codifica as glicoproteínas HA e NA, a NP, as proteínas de matriz M1 e M2, as proteínas não estruturais NS1 e NS2, as RNA polimerases ácida (PA) e RNA polimerases básicas PB1 e PB2(6). A estrutura dos vírus Influenza A e B está representada na Figura 1(7).

Figura 1 - Estrutura do vírus Influenza

FONTE: WHO - Manual for the virological surveillance of influenza

Os vírus Influenza A e B constantemente sofrem mutações genéticas pontuais e graduais durante a replicação gerando cepas virais com características antigênicas semelhantes aos subtipos originais (*antigenic drift*)(1,3,8). Os vírus Influenza A possuem a capacidade de infectar humanos, suínos, equínos, aves e mamíferos marinhos, e podem sofrer recombinação de segmentos de RNA de vírus diferentes, gerando novos subtipos de vírus com recombinações de HA e NA desconhecidas ao sistema imunológico (*antigenic shift*). Por este motivo, os vírus Influenza A têm a capacidade de provocar epidemias mundiais(1,8–10). Até o momento, foram descritos 18 subtipos de HA e 11 subtipos de NA do Influenza A e apenas duas linhagens do Influenza B diferenciadas pela glicoproteína HA em B/Yamagata e B/Vitória(3).

2.2 Epidemiologia da influenza

Os vírus Influenza são de circulação global com fácil transmissão através da inalação de gotículas e aerossóis expelidas por indivíduos infectados ao tossir, espirrar ou falar. A transmissão também pode ocorrer de forma indireta através de contato das mãos com superfícies e objetos contaminados e posterior contaminação das mucosas oral ou nasal(4,7).

A doença ocorre em todas as faixas etárias, mas as taxas de ataque são maiores em crianças do que em adultos uma vez que as crianças não costumam ter anticorpos de exposições prévias aos vírus ou vacina. Durante as epidemias sazonais de influenza, a taxa de ataque global varia de 5 a 10% em adultos e de 20 a 30% em crianças(8). O aumento na circulação de vírus Influenza é proporcionalmente relacionado ao aumento de doença respiratória aguda, visitas aos serviços de urgências, internação hospitalar e óbitos(7). Em países de clima temperado, o pico da influenza sazonal ocorre principalmente no outono e inverno, enquanto nos países tropicais a influenza pode ocorrer o ano todo(4,7). No Brasil, a influenza ocorre o ano todo, com pico no outono e inverno no sul e sudeste do país(11).

Anualmente, no mundo, estima-se a ocorrência de um bilhão de casos de influenza nas epidemias sazonais, sendo três a cinco milhões de casos graves e 290.000 a 650.000 de casos fatais(4,10). Indivíduos de maior risco de complicações relacionadas à influenza são gestantes, crianças com até 59 meses de idade, idosos, portadores de doenças crônicas como cardiopatias, pneumopatias, nefropatias, doenças metabólicas, hepatopatias, doenças hematológicas e doenças neurológicas com impacto no neurodesenvolvimento, portadores de condições imunossupressoras como pessoas vivendo com HIV/Aids, indivíduos sob quimioterapia ou em uso de corticoesteróides e portadores de neoplasia(12,13).

Além das epidemias anuais, há risco de pandemias caracterizadas por epidemias mundiais de Influenza A em decorrência de disseminação rápida de novo subtipo previamente desconhecido ao sistema imunológico(1,10,14). Durante as pandemias, pela capacidade de transmissão interhumana e de

evasão imunológica do subtipos novos de Influenza A, uma proporção significativa da população mundial é infectada uma vez que anticorpos previamente adquiridos não costumam exercer proteção cruzada com os vírus pandêmicos. Até o momento, ocorreram 4 pandemias: 1918 – A/H1N1 aviário; 1957 – A/H2N2, um recombinante de vírus aviário e H1N1 previamente circulante; 1968 – A/H3N2, um recombinante do vírus A/H2N2 e A/H3 aviário; e, mais recentemente, em 2009 – A/H1N1 pandêmico (A/H1N1pdm09) distinto do subtipo anterior e de origem suína. Os vírus A/H3N2 e A/H1N1pdm09 das pandemias de 1968 e 2009, respectivamente, adaptaram-se aos humanos e circulam até hoje(7,14). As pandemias em geral costumam levar a aumento significativo da mortalidade por influenza na população geral(15). Na pandemia de 1918, por exemplo, estima-se entre 20 e 40 milhões de óbitos no mundo, particularmente por hemorragia alveolar e pneumonia bacteriana secundária(1,16).

Embora raramente descritos, subtipos aviários de alta patogenicidade como A/H7N9, A/H5N1 e A/H9N2 podem ser transmitidos a humanos através de contato com aves infectados ou ambientes contaminados. Casos de infecção em humanos pelo A/H5N1 e A/H7N9 foram reportados na China em 1997 e 2003, respectivamente. Desde então, estes vírus têm se disseminado entre aves domesticados na Europa e na África, com milhares de epidemias entre as aves e centenas de casos entre os seres humanos(14,15).

Portanto, a influenza é considerada um problema de saúde pública mundial pelas constantes epidemias anuais e pelo potencial risco de pandemias por Influenza A de origem animal(10). Por estes motivos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) fundou a rede global de vigilância da influenza (*Global Influenza Surveillance and Response System - GISRS*) em 1952, estabelecendo desde então uma rede mundial de laboratórios de referência para vigilância antigênica e genética de cepas de Influenza. Através de relatórios regionais, a OMS mantém vigilância contínua dos subtipos circulantes de vírus aviários e suínos como parte de planejamento e preparo para novas pandemias. Baseado na avaliação de risco, a OMS comunica o plano de ação mundial para a prevenção e controle das epidemias em

humanos, além dos surtos nos animais(7,15–17). Em 11 de março de 2019, a OMS lançou a estratégia global para o controle da influenza para os anos 2019-2030 cuja meta é prevenção da influenza sazonal, controle da transmissão de vírus zoonóticos para seres humanos e preparação para a próxima pandemia através da capacitação dos programas regionais de vigilância epidemiológica da influenza(10).

Recomenda-se vacinação como a principal estratégia de prevenção da influenza para todos os indivíduos, particularmente aqueles do grupo de risco e seus cuidadores, assim como para os trabalhadores da saúde(10,13).

2.3 Patogenia da influenza

Os vírus Influenza são transmitidos de uma pessoa infectada através de gotículas expelidas ao tossir ou espirrar, sendo inaladas por pessoas em contato próximo com alcance de até um metro de distância(1,4,7). A principal porta de entrada dos vírus é a mucosa do trato respiratório superior com alguns vírus alcançando a árvore traqueobrônquica(1,6). O período de incubação é de aproximadamente um a quatro dias, com uma média de dois dias do contágio ao adoecimento(4,18). Após este período, a doença manifesta-se com início súbito de febre acima de 38 graus, mialgia ou artralgia intensas, fadiga, prostração, cefaleia, rinorreia, tosse seca e odinofagia(1,19). O espectro do quadro clínico varia de infecção assintomática, doença leve autolimitada a doença grave complicada por pneumonia viral primária, insuficiência respiratória, instabilidade hemodinâmica ou óbito(1,7).

A infecção causa destruição celular e processo inflamatório da mucosa superficial geralmente do trato respiratório superior causando nasofaringite ou laringite, e comumente há propagação da infecção ao trato respiratório inferior causando traqueobronquite, bronquiolite e até pneumonia. O edema e a inflamação resultantes de infiltração de células imunológicas provocam sintomas como tosse não produtiva, odinofagia e rinorréia. Os sintomas respiratórios manifestam-se conforme o sítio afetado, e os sintomas sistêmicos como febre, mialgia e prostração decorrentes de citocinas circulantes

particularmente interferon são os predominantes(1,6). Diarréia e vômitos podem acompanhar o quadro particularmente em crianças(19). Habitualmente, a doença é autolimitada com resolução espontânea em até sete dias, embora sintomas como a tosse e a fadiga podem se prolongar por até 14 dias(4). Evidências sugerem que o grau de destruição celular determina em grande parte a apresentação, evolução e duração da doença(1). Indivíduos com pneumopatias ou cardiopatias possuem maior risco de acometimento alveolar resultando em pneumonia intersticial pelo vírus Influenza, com risco de hemorragia alveolar, assim como risco de pneumonia bacteriana secundária(1). Conforme descrito previamente, influenza por subtipos A/H5N1 ou A/H7N9 considerados de alta patogenicidade geralmente resultam em maior morbidade e letalidade quando comparada à influenza sazonal(7,20). Estima-se letalidade de 60% para A/H5N1 e 30% para A/H7N9(14).

Para auxiliar no manejo clínico dos pacientes, a manifestação clínica da influenza é classificada em duas síndromes de acordo com a gravidade: a síndrome gripal (SG) e a síndrome respiratória aguda grave (SRAG). A SG constitui a tríade de febre de início súbito (mesmo que referida), tosse ou odinofagia, acompanhadas de cefaleia e/ou mialgia e/ou artralgia em indivíduo de qualquer idade. Em crianças com menos de 2 anos de idade, considera-se também coriza e obstrução nasal. Indivíduos com SG que não possuem fatores de risco para complicações podem receber apenas sintomáticos e acompanhamento ambulatorial, sendo a prescrição de antiviral decidida a critério médico. No entanto, a prescrição de terapia antiviral com inibidor de neuraminidase é indicada para a população de risco com SG para reduzir o risco de complicações. Para esta população, mantém-se monitoramento dos sintomas com orientação de procurar assistência médica caso ocorra piora clínica(11).

A SRAG é uma SG acrescida de sintomas ou sinais de gravidade como dispnéia, taquipnéia, oximetria de pulso com saturação de oxigênio menor que 95% em ar ambiente, piora da doença de base, hipotensão em relação à pressão arterial habitual do paciente, ou quadro de insuficiência respiratória aguda em indivíduo de qualquer idade. Todos os indivíduos que cumpram

critérios de SRAG necessitam de internação hospitalar e instituição imediata de terapia antiviral(4,11,21).

O período de transmissibilidade da influenza começa um dia antes do aparecimento dos sintomas podendo se prolongar por cinco a sete dias após a doença. Crianças podem eliminar o vírus por maior período de tempo, tornando-os infectantes durante mais tempo(18). A duração da eliminação viral também é maior nos indivíduos imunodeprimidos em relação aos imunocompetentes(22–26). Em média, o tempo de eliminação viral pode chegar a 19 dias contra 6,4 dias em imunocompetentes(25). Em um estudo avaliando pacientes TCHT sugeriu-se que o uso de corticoide em dose superior a 1mg/kg aumentaria o risco de eliminação viral prolongada, uma vez que os pacientes com uso de corticoide apresentaram uma média de 15 dias de eliminação viral comparada a 9 dias nos que não fizeram uso de corticoide(22). Devido ao maior tempo de eliminação viral em imunodeprimidos, há discussão da necessidade de prolongamento do tratamento antiviral além dos 5 dias recomendados(22,25). No entanto, esta conduta pode aumentar o risco de desenvolvimento de resistência aos antivirais e, conseqüentemente, a transmissão de vírus resistente na população(25).

2.4 Resposta imune

A imunidade inata nas mucosas das vias aéreas é a primeira barreira contra os vírus Influenza. O RNA viral é reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* - PAMPs) como o gene indutível por ácido retinóico (*Retinoic Acid Inducible Gene* – RIG-1) e o receptor do tipo Toll (*Toll-Like Receptor* - TLR). Ao reconhecer células epiteliais infectados pelo vírus, os receptores humanos induzem uma sinalização para a secreção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas. O IFN-1 é produzido por macrófagos, pneumócitos, células dendríticas, entre outras células, induzindo um estado antiviral(27).

As quimiocinas promovem o recrutamento de neutrófilos, monócitos e células NK (*Natural Killer* - NK) ao sítio da infecção(27). Os macrofágos alveolares são ativados e fagocitam células infectadas pelo vírus(28), além de produzir óxido nítrico sintase (*Nitric Oxide Synthase 2* - NOS2) e o fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha* - TNF- α)(29). Se por um lado, uma deficiência da imunidade inata pode aumentar a capacidade de replicação e disseminação do Influenza, desequilíbrio na resposta inflamatória pode induzir lesão alveolar(30).

Após a opsonização viral, as células dendríticas migram aos linfonodos para a apresentação de antígenos aos linfócitos T, ativando-os. Os linfócitos T citotóxicos promovem a eliminação de células infectadas enquanto os linfócitos T auxiliares promovem a ativação dos linfócitos B(30). Os linfócitos NK também reconhecem células opsonizadas e provocam a lise destas através de citotoxicidade dependente de anticorpos (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* - ADCC)(31). A imunidade adaptativa é eficiente na eliminação do vírus através da produção de anticorpos específicos e da atividade citotóxica dos linfócitos T, além de criar células de memória para prevenção de reinfecção(32). Portanto, embora seja um processo mais lento, a ativação da imunidade adaptativa é fundamental para a resolução da influenza e o clareamento viral(30). A detecção de anticorpos de baixa afinidade em adultos imunocompetentes com complicação de pneumonia grave na pandemia de influenza de 2009 mostrou que imunidade celular deficiente aumenta susceptibilidade à influenza(33).

Os anticorpos direcionados contra a glicoproteína HA são neuralizantes e possuem a capacidade de prevenir reinfecção. Baixos títulos de anticorpos inibidores de hemaglutinina não previnem a doença, mas atenuam a gravidade da influenza. Os anticorpos contra a neuraminidase reduzem a carga de vírions liberadas de uma célula infectada, reduzindo infecção de novas células e possivelmente a intensidade da doença. A durabilidade dos anticorpos após a infecção é por muitos anos, mas a capacidade de proteção é impactada pela mudança antigênica dos vírus e evasão do sistema imunológico por perda de imunidade cruzada entre as cepas de vírus Influenza(1).

2.5 Fatores de virulência dos vírus influenza

A glicoproteína HA é a principal determinante de virulência cuja função é ligar o vírus ao receptor da célula hospedeira composto pelo ácido siálico, provocando a fusão das duas membranas e permitindo a liberação do RNA viral no citoplasma. Em seguida ocorre o transporte do RNA viral para o núcleo da célula hospedeira onde ocorre a transcrição. Por sua vez, a glicoproteína NA tem a função de clivagem do ácido siálico para permitir a liberação dos vírions da célula infectada(6). A Figura 2 ilustra este processo(34).

Figura 2 - Replicação do vírus Influenza
 FONTE: Laborda P et al. Molecules. 2016

Para que o vírus seja infeccioso, é necessária a clivagem da HA em duas subunidades (HA1 e HA2) e o sítio da clivagem influencia na virulência do agente. A glicoproteína HA do Influenza A sazonal é clivada por proteases produzidas por células do trato respiratório e do trato gastrointestinal, enquanto que a glicoproteína HA do A/H5N1 possui múltiplos sítios de clivagem e é susceptível a furinas encontradas nos aparelhos de Golgi que se encontram em todas as células humanas. Por isso, o vírus A/H5N1 possui alta virulência,

podendo causar infecção sistêmica, insuficiência de múltiplos órgãos e óbito(6,35).

Ao mesmo tempo, os subtipos de Influenza A apresentam tropismos distintos aos receptores siálicos. A glicoproteína HA do Influenza A sazonal reconhece e se liga aos receptores siálicos α 2-6 encontrados na superfície das células epiteliais do trato respiratório alto, causando doença leve; em contrapartida, a do vírus A/H5N1 tende a reconhecer receptores do tipo α 2-3 siálico encontrados nos pneumócitos tipo 2 nos pulmões, provocando doença grave. Apesar de altamente virulentos, a transmissibilidade do A/H5N1 entre humanos é restrita uma vez que as células infectadas são do trato respiratório inferior(6,36). Os vírus A/H1N1pdm09 isolados de casos graves e casos fatais de pneumonia em imunocompetentes apresentavam uma mutação na glicoproteína HA na qual a substituição do aminoácido D222G modificou o tropismo viral do receptor α 2-6 para α 2-3 promovendo a infecção do trato respiratório inferior(6,37,38).

A proteína NS1 do vírus influenza tem a capacidade de mascarar o reconhecimento intracelular do RNA viral pelo RIG-1 e também pela via do TLR que reconhece RNA viral no meio extracelular. Descobriu-se recentemente que o RIG-1 é necessário para induzir a secreção de interferon do tipo 1 (IFN-1), uma citocina pro-inflamatória essencial na imunidade inata contra Influenza A, e que a proteína NS1 bloqueia esta indução(39).

2.6 Complicações da influenza

Embora a influenza comumente seja uma doença autolimitada, a sua evolução e desfecho dependerão da interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e a virulência do agente conforme previamente discutido(6,30,33,40). Diversos estudos mostram que complicações pulmonares e extra-pulmonares ocorrem com maior frequência em indivíduos submetidos a transplante de órgãos sólidos (TOS) e de células troncos hematopoiéticas (TCTH) em comparação à população geral(22,24,25,41–46). O principal fator de risco para influenza grave descrito em imunodeprimidos

receptores de TOS e TCTH parece ser o período pós-transplante precoce, geralmente abaixo de 90 dias, correspondendo ao período de maior imunossupressão(22,44,45).

Tanto em indivíduos imunocompetentes como nos imunodeprimidos, as complicações pulmonares são as mais comuns e incluem a pneumonia viral primária e as pneumonias bacterianas secundárias(1). Estas duas entidades podem coexistir ou ocorrer isoladamente(24). Frequentemente, a pneumonia viral primária resulta em SRAG necessitando de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) ou resultando em óbito particularmente na população de risco(1,47,48). No Brasil, de acordo com o informe epidemiológico de influenza de 2018, dos 6.754 casos de SRAG por Influenza notificados, ocorreram 1.381 óbitos dos quais 1.055 (76,4%) apresentaram ao menos um fator de risco para complicação, com destaque para adultos com idade ≥ 60 anos (55,1%), portadores de doença cardiovascular crônica (31,6%), pneumopatia crônica (24,6%), diabetes mellitus (22,9%), obesidade (14,6%), doença neurológica crônica (10,5%), crianças < 5 anos de idade (9,3%), doença renal crônica (9,4%) e imunodeficiência (8,3%)(46).

Em crianças é comum a ocorrência de otite média(7). Outras complicações raras da influenza incluem miosite(41), bronquiolite obliterante(26,41), convulsão febril(49), síndrome de Reye(49), pericardite(49), miocardite(41,50,51) e encefalopatia/encefalite(24,52).

2.7 Fatores de risco para complicações em imunodeprimidos

2.7.1 *Pneumonia viral*

A pneumonia viral primária é uma complicação comum da influenza. O estudo por Viasus et al. na população geral descreveu uma incidência de 43,2% de pneumonia pelo Influenza A/H1N1pdm09 em 585 adultos não vacinados previamente e que estavam internados em 13 hospitais espanhóis(47). Estudos em imunodeprimidos sugerem que esta população seja mais susceptível à infecção do trato respiratório inferior pelos vírus Influenza(22,24,44).

Em estudo retrospectivo multicêntrico, Kumar et al. avaliaram a evolução de 237 receptores de TOS (154 adultos e 83 crianças, sendo 37% de transplantados de rim, 20% de fígado, 14% de pulmão e 19% de coração) com diagnóstico confirmado de influenza A/H1N1pdm09. Houve registro de 167 (70%) internações hospitalares onde um total de 73 (32%) pacientes apresentavam pneumonia viral ou bacteriana(24).

Nichols et al. descreveram um aumento do risco de pneumonia primária em pacientes TCHT no período pós-transplante precoce e nos pacientes com linfopenia(22). Em outro estudo por Ljungman et al. que avaliou 222 receptores de TCTH alogênico e 64 receptores de TCTH autólogo, a incidência de infecção do trato respiratório inferior foi de 32,5% (93 pacientes – 68 dos TCTH alogênico e 25 dos TCTH autólogo). A incidência de pneumonia viral foi maior (47,5%) em indivíduos TCTH com mais de 60 anos de idade, enquanto crianças com menos de 10 anos de idade tiveram menor incidência de pneumonia (17,8%). Na análise multivariada, os fatores de risco para infecção do trato respiratório inferior foram a idade (OR=1,03; IC95%=1,01-1,04; p=0,002) e a linfopenia (OR=2,49; IC95%=1,33-4,67; p<0,001). Entre os receptores de células alogênicas, a incompatibilidade também aumentou o risco (OR=1,8; IC95%=1,1-3,0; p=0,02). Vacinação prévia não foi fator protetor (OR=0.98; IC95%=0,52-1,83)(43).

2.7.2 *Pneumonia bacteriana*

A coinfeção bacteriana é comumente diagnosticada particularmente em indivíduos com doença grave(1,15). No estudo por Viasus et al. na população geral, descreveu-se uma incidência de pneumonia bacteriana de 7,6% em 585 adultos internados por Influenza A/H1N1pdm09(47). Entre indivíduos imunodeprimidos, a pneumonia bacteriana secundária é uma complicação mais comum com a sua incidência variando de 17 a 68% em estudos de pacientes submetidos a TOS com diagnóstico confirmado de influenza(24,41,53). No estudo retrospectivo por Gainer et al., sugere-se maior incidência de pneumonia bacteriana em transplantados de pulmão. Neste estudo, dois receptores de transplante de pulmão evoluíram a óbito por insuficiência

respiratória e ventricular esquerda com necessidade de oxigenação extracorpórea por membrana(23). O estudo por Kumar et al. não mostrou maior risco de pneumonia em transplantados de pulmão(24). Um estudo descritivo realizado no Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (STR-HCFMUSP) que avaliou os desfechos da influenza A em transplantados renais encontrou uma taxa de pneumonia bacteriana secundária de 68% (diagnóstico clínico, laboratorial e/ou radiológico)(53).

Em relação aos agentes etiológicos, há predominância de bactérias Gram positivos tanto na população geral como em indivíduos imunodeprimidos(41,47). No estudo conduzido por Viasus et al. na população geral, *Streptococcus pneumoniae* foi a bactéria mais frequentemente isolada, seguida de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae* em proporções semelhantes. Em um caso com neoplasia metastática, houve coinfeção por *Candida albicans* e *Candida glabrata*(47). No estudo conduzido por Vilchez et al. em receptores de TOS, em transplantados de pulmão, *Staphylococcus aureus* (2 pacientes) foi o agente mais isolado, seguido por *Nocardia asteroides* (1 paciente). Em transplantados de fígado, isolou-se *Staphylococcus aureus* (1 paciente) e *Streptococcus pneumoniae* (1 paciente)(41).

2.7.3 Internação hospitalar e óbito

As taxas de internação hospitalar, internação em UTI e letalidade por influenza são variáveis, mas geralmente maiores em imunodeprimidos do que as mesmas taxas na população geral(23–25,41,47,53). Óbito por influenza geralmente resulta de complicações como pneumonias ou exacerbação de doenças crônicas, em especial, as cardiopulmonares.(7,23,47,49).

Um estudo descritivo avaliando a evolução da influenza A/H1N1pdm09 mostrou uma maior taxa de internação hospitalar de 53,8% em transplantados renais comparado à taxa de 1 a 5% na população geral(42). Memoli et al. reportaram uma taxa de internação hospitalar de 100% em imunodeprimidos

comparada a 29,6% nos imunocompetentes portadores de doenças crônicas como hipertensão, diabetes melito, coronariopatia, asma, HIV controlado e doença pulmonar obstrutiva crônica ($p=0,0001$)(25). Ljungman et al. relataram uma taxa de internação hospitalar de 43,7% em receptores de TCTH com influenza A/H1N1pdm09(43).

Em relação às taxas de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) e letalidade, em estudo na população geral, as taxas descritas foram de 12,1% e 2,2%, respectivamente(47). Memoli et al. encontraram entre imunodeprimidos uma taxa de internação em UTI de 18% e registro de um óbito e nenhuma internação em UTI ou óbito entre imunocompetentes ($p=0,0019$)(25). Em estudo retrospectivo comparando os desfechos clínicos da A/H1N1pdm09 em 18 receptores de TOS e 71 pacientes não transplantados, a maioria portador de comorbidades cardíacas ou pulmonares graves, a sobrevida após 30 dias foi de 83% nos receptores TOS mesmo com uso de antiviral comparada a 97% nos pacientes não transplantados ($p=0,02$)(23). No estudo de Kumar et al., entre pacientes com pneumonia viral ou bacteriana, 16% foram internados em UTI e 4% evoluíram a óbito(24). No estudo descritivo realizado no HCFMUSP a taxa de internação hospitalar foi de 68%, semelhante a taxa de 70% encontrado no estudo de Kumar et al., e ambas as taxas de internação em UTI e óbito foram de 14%(53). Outro estudo brasileiro da evolução da influenza A/H1N1pdm09 em 19 transplantados renais realizado no Hospital do Rim e Hipertensão em São Paulo mostrou uma taxa de admissão em UTI de 26% e, destes, 10% necessitaram de ventilação mecânica e a mesma proporção evoluiu para óbito(54). No estudo de Ljungman et al., encontrou-se uma letalidade de 6,34% em receptores de TCTH com influenza A/H1N1pdm09(43).

Entre imunodeprimidos, fatores de risco para a internação em UTI e óbito descritos são início tardio de antiviral(24,45); diabetes melito(24,45); coinfeção fúngica(45); tempo pós-transplante menor que 90 dias(45); pneumonia bacteriana(22,55); neutropenia e linfopenia(43) e uso de imunoglobulina antitimócito (ATG)(24).

O tratamento precoce com o início de antiviral em até 48 horas é protetor e tem sido associado com menores taxas de complicações como internação

em UTI, uso de ventilação mecânica e óbito em imunodeprimidos e na população geral(24,47,55).

2.7.4 Rejeição do enxerto

Um dos primeiros relatos da rejeição do enxerto renal como complicação da influenza foi publicado em 1972. Os autores descrevem um surto de influenza em uma enfermaria de transplante renal, com diagnóstico confirmado em 5 pacientes. Destes, 3 pacientes apresentaram suspeita clínica de rejeição aguda do enxerto. Os sinais de rejeição do enxerto (queda no clearance de creatinina e retenção de líquidos) apareceram até três dias após o início da doença(56). A partir daí, estudos tem relatado rejeição do enxerto na vigência ou após quadro de influenza em várias modalidades de transplante (pulmão, rins, fígado e pâncreas) mesmo sem redução da imunossupressão(26,41,45).

Vilchez et al. descreveram maior incidência da rejeição aguda do enxerto em transplantados de pulmão com influenza, um achado que talvez possa ser atribuída à disfunção imunológica local(41). Cordero et al. reportaram rejeição de enxerto renal, pancreático e hepático aproximadamente um mês após o diagnóstico de influenza. Os receptores de rim e pancreas responderam a corticoterapia, mas o receptor de transplante de fígado perdeu o enxerto(45). Durante o seguimento de 22 pacientes transplantados (18 transplantados de rim, dois transplantados de pulmão, um transplantado de fígado e um transplantado de coração) com diagnóstico confirmado de influenza, Low et al. relataram rejeição aguda do enxerto em três pacientes seis meses após o quadro de influenza (dois transplantados de rim e um transplantado de pulmão). O transplantado de pulmão desenvolveu bronquiolite obliterante e evoluiu a óbito. Um dos transplantados de rim evoluiu com perda do enxerto(26).

No estudo brasileiro do Hospital do Rim e Hipertensão, disfunção aguda do enxerto foi observada em 42% dos pacientes com influenza. No entanto, tal observação foi justificada por fatores associados a gravidade da doença como a hipovolemia, a presença de necrose tubular aguda pela sepse, a

rabdomiólise ou a toxicidade dos inibidores de calcineurina decorrente da interação com os antibióticos(54).

A teoria da relação da influenza com a ocorrência de rejeição é a de que o vírus Influenza tem a capacidade de estimular a resposta imunológica celular nos órgãos transplantados(56,57). Também especula-se outros mecanismos, como a lesão renal direta pelo vírus Influenza e a deposição renal de imunocomplexos(56).

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico da influenza é geralmente baseado em suspeita clínica em crianças e adultos com síndrome gripal. A confirmação diagnóstica requer a detecção ou o isolamento do vírus Influenza, ou até a comprovação de aumento nos títulos de anticorpos por meio de sorologias(1). Baseado no Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil, as amostras respiratórias para o diagnóstico da influenza devem ser coletadas entre o terceiro e sétimo dia após o início dos sintomas. Indica-se preferencialmente coleta pela técnica de aspirado de nasofaringe ou swab combinado de nasofaringe e orofaringe. O aspirado de nasofaringe é mais preconizado por conter maior quantidade de células epiteliais infectadas com vírus e, portanto, é superior a swab de nasofaringe no que concerne ao isolamento do vírus(48).

O diagnóstico molecular por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-time Polymerase Chain Reaction* – RT-PCR) é a técnica mais disseminada na prática assistencial. RT-PCR utiliza oligonucleotídeos e sondas específicas para identificar vírus em amostras respiratórias ou tecido pulmonar. Além de técnica mais sensível no diagnóstico do subtipo de influenza, traz informações adicionais sobre a caracterização antigênica do vírus e dados de resistência(48).

Para a identificação do subtipo viral, também podem ser utilizadas as técnicas sorológicas de inibição da hemaglutinação e microneutralização. São técnicas úteis para o diagnóstico quando a chance de isolamento viral em amostras respiratórias é baixa e nos estudos epidemiológicos. O diagnóstico de

influenza por ambas as técnicas requer a avaliação de duas amostras de soro, coletadas na fase aguda (até sete dias) e na fase convalescente (de duas a três semanas) do início de sintomas. A soroconversão é demonstrada pelo aumento dos títulos de anticorpos em pelo menos quatro vezes e sugere influenza recente(4).

O princípio da inibição da hemaglutinação é que na presença de anticorpos específicos que ligam o sítio antigênico da hemaglutinina, a ligação da hemaglutinina a hemácias de galinha ou de peru é bloqueada, inibindo a hemaglutinação. Os antígenos virais para os testes de inibição de hemaglutinação são padronizados e fornecidos pela OMS e consistem em antígenos para Influenza A/H1N1 e A/H3N2 e Influenza B – linhagens Yamagata e Victoria. No teste de microneutralização viral, incuba-se o vírus com várias diluições do soro testado em microplacas. Depois, inocula-se esta mistura em quantidade padronizada de células MDCK. No dia seguinte, utiliza-se ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA) para detectar células infectadas através da detecção da nucleoproteína viral. A ausência de infecção é interpretada como microneutralização positiva e indica a presença de anticorpos específicos contra o vírus no soro testado(4).

A imunofluorescência também é uma técnica de identificação rápida e específica de antígenos virais em células infectadas provenientes de amostra respiratória ou cultura celular. Para a realização de testes de imunofluorescência, o protocolo Brasileiro estabelece o uso de painel de anticorpos monoclonais para a pesquisa e identificação dos vírus respiratórios influenza A e B, parainfluenza tipo 1,2 e 3, vírus sincicial respiratório e adenovírus para os dois testes. A sensibilidade da imunofluorescência é altamente influenciada pela qualidade da amostra, a especificidade do reagente utilizado e o nível de experiência do profissional na leitura e interpretação do teste. Para aumentar a sensibilidade do teste, mais de uma lâmina deve ser preparada para cada amostra caso seja necessário repetir a imunofluorescência(48).

O método diagnóstico considerado padrão ouro é o isolamento viral em cultura celular ou em ovos embrionados de galinha(4,48). Utiliza-se preferencialmente a cultura em células de rim canino Madin-Darby (*Madin-Darby canine kidney* - MDCK) para o isolamento dos vírus. A cultura tradicional requer em média 4 a 5 dias, mas há ensaios que utilizam técnicas imunológicas para a detecção em até 40 horas de antígenos virais na cultura celular(4). A desvantagem para diagnóstico clínico é a demora do cultivo viral que leva dias e uma vantagem deste método é a multiplicação de vírus no espécime respiratório, produzindo quantidade suficiente para investigações adicionais como caracterização antigênica ou testes de susceptibilidade a antivirais(7).

2.9 Tratamento

O objetivo da terapia antiviral é reduzir a ocorrência de complicações e deve ser instituído nas primeiras 48 horas após início de sintomas(4,11). Em indivíduos com SRAG e suspeita de influenza recomenda-se instituição do tratamento mesmo que tardio com janela de até cinco dias do início de sintomas(4,11). Estudos em imunodeprimidos e na população geral têm demonstrado redução das taxas de pneumonia primária, necessidade de ventilação mecânica, internação em UTI e óbito decorrente da administração precoce de antiviral(24,47,48,58). No estudo observacional em imunodeprimidos realizado por Kumar et al., 8% dos pacientes que iniciaram antiviral em até 48 horas do início dos sintomas foram admitidos em UTI, comparado a 22,4% dos que iniciaram o antiviral tardiamente(24).

Existem dois principais classes de medicamentos utilizados no tratamento da influenza. Os inibidores da proteína de matriz M2 e os inibidores de neuraminidase(34,59).

Os inibidores da proteína de matriz M2 são a amantadina e a rimantadina e atuam bloqueando a entrada de íons de hidrogênio na partícula viral através do canal transmembrana M2, inibindo a liberação dos segmentos de RNA viral na célula hospedeira. Os dois agentes são específicos para o tratamento de Influenza A com efetividade de 80 a 90%, mas atualmente seu uso não é

recomendado devido à disseminação de resistência viral com taxa estimada maior que 95%(4,59–61). Eventos adversos destes medicamentos são a toxicidade gastrointestinal e do sistema nervoso central, com risco de convulsão em indivíduos com antecedente de crises convulsivas(7).

Os inibidores de neuraminidase são análogos do ácido siálico e ligam o sítio enzimático da glicoproteína NA impedindo a liberação de vírions da célula hospedeira. Esta classe possui atividade contra os vírus Influenza A e B. Atualmente, há quatro medicamentos desta classe: oseltamivir (Tamiflu® - via oral), laninamivir (Inavir® - via inalatória), peramivir (Rapivab®, Rapiacta® ou Peramiflu® - via intravenosa) e zanamivir (Relenza® - via inalatória).(34,59) Oseltamivir e zanamivir são disponíveis a nível mundial e são recomendados para o tratamento de influenza no Brasil(21). Há relatos de resistência em pequena escala do A/H1N1 ao oseltamivir desde 2008, mas os vírus resistentes ao oseltamivir em 2009 foram sensíveis a zanamivir. Influenza A/H3N2 e B não apresentaram resistência aos inibidores de neuraminidase até o momento. Os eventos adversos descritos são náuseas e vômitos com oseltamivir, e náuseas, diarreia, vertigem, cefaleia e tosse com zanamivir. O zanamivir possui contraindicação absoluta em crianças abaixo de cinco anos de idade e relativa em indivíduos com pneumopatias crônicas pelo risco de broncospasmo(7).

A duração recomendada do tratamento é de cinco dias, mas pode-se prolongar o tratamento baseado em uma avaliação individual da evolução clínica assim como a eliminação viral uma vez que pacientes TOS podem eliminar vírus por mais tempo(11,53,62).

O protocolo brasileiro de tratamento da influenza do Ministério da Saúde publicado em 2017 indica tratamento para todos os indivíduos com síndrome gripal que compõem a população de risco para complicações, independentemente do histórico vacinal(11):

- Grávidas em qualquer idade gestacional, puérperas até duas semanas após o parto (incluindo as que tiveram aborto ou perda fetal)
- Adultos com idade a partir de 60 anos

- Crianças menores de 5 anos de idade
- População indígena aldeada
- Indivíduos menores de 19 anos de idade em uso prolongado de ácido acetilsalicílico pelo risco de síndrome de Reye
- Portadores de doenças crônicas: pneumopatias; todas as formas de tuberculose; doenças cardiovasculares com exceção de hipertensão arterial sistêmica; nefropatias; hepatopatias; doenças hematológicas; distúrbios metabólicos; transtornos neurológicos e do desenvolvimento que podem comprometer a função respiratória ou aumentar o risco de aspiração (disfunção cognitiva, lesão medular, epilepsia, paralisia cerebral, síndrome de Down, acidente vascular encefálico ou doenças neuromusculares); imunossupressão medicamentosa; neoplasias; HIV/aids e obesidade mórbida (índice de massa corporal maior que 40).

2.10 Prevenção

2.10.1 Medidas gerais

É fundamental para evitar a transmissão de influenza medidas gerais como a higienização frequente das mãos, principalmente antes do consumo de alimentos; a etiqueta da tosse (cobrir nariz e boca ao espirrar ou tossir); o uso de lenço descartável para higiene nasal; evitar tocar mucosas (olhos, nariz e boca); não compartilhar fômites (objetos como talheres, copos ou garrafas); manter ambientes bem ventilados; evitar locais aglomerados; evitar contato com indivíduos apresentando sinais e sintomas respiratórios; adotar hábitos saudáveis, como hidratação oral e alimentação balanceada(4,11,63).

No ambiente intrahospitalar, prevenir a influenza associada à assistência à saúde requer uma combinação das medidas gerais com precauções adicionais. No cuidado de todos os pacientes recomenda-se a implementação da precaução padrão pelos trabalhadores da saúde que consiste na higienização das mãos antes e após contato com o paciente utilizando água e sabão ou álcool gel, o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) como

avental e luvas, a utilização de óculos e máscara quando houver risco de contato com secreções e respingos, e o descarte adequado de resíduos(15,21).

Para pacientes sintomáticos respiratórios, com suspeita ou confirmação de influenza, recomenda-se precauções adicionais para gotículas. Estas medidas consistem no isolamento do paciente em quarto privativo com o uso de máscara cirúrgica pelo mesmo durante o transporte. Recomenda-se limitar procedimentos indutores de aerossóis (intubação, sucção, nebulização) uma vez que partículas menores que 5 µm podem ficar suspensas no ar por longos períodos. Caso procedimentos com potencial de gerar aerossóis sejam necessários, recomenda-se o uso de máscaras respiradores (N95, N99, PFF2 ou PFF3) durante o procedimento e ao entrar no quarto do paciente. Os trabalhadores da saúde oferecendo cuidados ao paciente devem utilizar óculos e máscara cirúrgica ao entrar no quarto privativo e substituí-los a cada contato com o paciente. A limpeza e desinfecção de superfícies é fundamental(21).

2.10.2 Quimioprofilaxia

A quimioprofilaxia é uma estratégia secundária de prevenção que não deve substituir a vacinação(49). Recomenda-se que a quimioprofilaxia não seja realizada de rotina nos pacientes TOS, sendo reservada para pacientes extremamente imunossuprimidos e com risco elevado de complicação da influenza(62). Ao mesmo tempo, não se recomenda a quimioprofilaxia indiscriminada pelo risco de promover o aparecimento de resistência viral. A quimioprofilaxia com antiviral não é recomendada se o período após a última exposição ultrapassar 48 horas(11).

A quimioprofilaxia pré-exposição consiste na administração empírica de oseltamivir ou zanamivir durante o período em que se antecipa maior chance de exposição aos vírus Influenza de indivíduos com alto risco para complicações da doença. A duração da quimioprofilaxia pré-exposição deve corresponder ao período de transmissão da influenza e não há dados sobre a segurança ou eficácia desta modalidade se instituída por mais de 6 semanas(62).

A quimioprofilaxia pós-exposição consiste na administração empírica dos mesmos antivirais citados após o contato com caso confirmado de influenza A ou B(62). Não se recomenda o uso da amantadina e rimantadina devido às altas taxas de resistência viral e à atividade restrita contra os vírus Influenza A(49,62). Recomenda-se o início precoce do antiviral, preferencialmente em até 48 horas, após o contato com caso confirmado de influenza. O antiviral deve ser mantido por pelo menos 10 dias após a exposição ao vírus Influenza(62). Neste casos, o uso de oseltamivir reduz em até 92% o risco de adoecimento(64), além de reduzir a gravidade e duração da doença se ocorrer falha da quimioprofilaxia(24,65). No Brasil, indica-se a quimioprofilaxia pós-exposição para(21):

- Pessoas com risco elevado de complicações não vacinadas ou vacinadas há menos de 15 dias
- Crianças portadores de doença crônica, com menos de 9 anos de idade e sem histórico de dose de reforço da vacina ou com menos de 15 dias após a segunda dose, expostas a caso suspeito ou confirmado de influenza
- Pessoas em uso de medicamentos imunossupressores
- Pessoas com Aids com imunodepressão avançada
- Profissionais de laboratório, não vacinados ou vacinados a menos de 15 dias, que tenham manipulado amostras clínicas de origem respiratória que contenham o vírus influenza sem uso adequado de EPI.
- Trabalhadores de saúde, não vacinados ou vacinados a menos de 15 dias, e que estiveram envolvidos na realização de procedimentos invasivos geradores de aerossóis ou na manipulação de secreções de caso suspeito ou confirmado de influenza sem o uso adequado de EPI.
- Residentes de alto risco em instituições fechadas e hospitais de longa permanência, durante surtos na instituição. Neste caso, é recomendável a quimioprofilaxia por no mínimo duas semanas e até pelo menos sete dias após a identificação do último caso.

2.10.3 Vacinação

A vacinação ou imunização ativa compreende uma medida de prevenção primária onde a vacina é utilizada para estimular a imunidade contra os vírus da influenza. A vacinação anual contra influenza sazonal existe desde a década de 40(1) e é recomendada como a principal estratégia de prevenção da doença e suas complicações(7,8,49,66).

O principal benefício da vacina é a prevenção de influenza, reduzindo desta forma, visitas ao médico em todas as faixas etárias, absenteísmo ao trabalho ou escola e perda de dias de trabalho. Em caso de doença em indivíduos com registro de vacinação prévia, há redução da incidência de complicações como a otite média em crianças e a internação hospitalar e óbitos em crianças e adultos. Em gestantes, ocorre a passagem de anticorpos ao feto durante a gestação, reduzindo em 50% o risco de influenza no recém-nascido até o quarto mês de vida(7,49).

As indicações da vacina variam de um país para outro. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC), expandiu as suas indicações de vacinação contra influenza, recomendado a vacina de influenza para todos os indivíduos acima de 6 meses de idade(49). Por sua vez, a OMS adota conduta mais conservadora e non escopo da saúde pública recomenda a vacinação particularmente na população de maior risco a complicações, seus contatos domiciliares e/ou seus cuidadores(8). No Brasil, a campanha nacional de vacinação contra influenza sazonal foi incorporada no Programa Nacional de Imunizações em 1999, com o propósito de reduzir complicações, internações e óbitos com foco na população de risco previamente citada(11,13).

Estudos em receptores TOS mostram que a vacinação é segura a partir de 30 dias pós-transplante. Portanto, há forte recomendação para vacinação anual de influenza a partir de 30 a 90 dias pós-transplante para todos os indivíduos para reduzir a vulnerabilidade à influenza e suas complicações que tendem a ser mais graves no período pós-transplante precoce(62,67,68). Um estudo recente mostrou que apesar de imunossupressão mais intensa no pós-

transplante precoce, as taxas de soroproteção em receptores de TOS vacinados antes dos seis meses pós-transplante são adequadas e se assemelham às taxas encontradas nos indivíduos vacinados tardiamente. Incusive, as taxas de soroproteção foram semelhantes entre indivíduos vacinados até três meses pós-transplante e os vacinados tardiamente. Portanto, não se justifica esperar seis meses para vacinação(67).

2.11 Tipos de vacinas

Existem dois tipos principais de vacinas contra influenza: as de vírus inativado e as de vírus vivo atenuado (*Live Attenuated Influenza Vaccines - LAIV*)(7). As vacinas inativadas são de administração intramuscular ou intradérmica enquanto as de vírus vivo atenuado são de aplicação intranasal. Ambas as vacinas podem conter apenas um subtipo (monovalente), três subtipos (trivalente) ou quatro subtipos (quadrivalente) de vírus(49).

Para as vacinas monovalentes, o subtipo viral pode ser do Influenza A ou B, sendo mais frequentemente as vacinas pandêmicas contra Influenza A, por exemplo, a vacina da influenza A/H5N1 aprovada em 2007 para uso nos EUA ou a vacina da influenza A/H1N1pdm09 aprovada para uso mundial na pandemia de 2009. As vacinas trivalentes são as mais utilizadas para a imunização sazonal e contém dois subtipos do vírus Influenza A (H1N1 e H3N2) e apenas um subtipo do vírus Influenza B (proveniente da linhagem Vitória ou Yamagata). A vacina quadrivalente contém dois subtipos de vírus Influenza A (H1N1 e H3N2) e as duas linhagens do vírus Influenza B. A vacina quadrivalente foi aprovada em 2014 na tentativa de aumentar a eficácia contra os vírus Influenza B, uma vez que é comum a co-circulação das duas linhagens(4,49).

A OMS é o órgão responsável por determinar e publicar as composições antigênicas das vacinas sazonais para utilização nos hemisférios norte e sul baseando-se nos resultados da vigilância global dos vírus Influenza circulantes. A necessidade de se manter uma vigilância constante dos vírus Influenza circulantes no mundo provém do fato que a efetividade vacinal pode ser

reduzida ou completamente anulada quando há incompatibilidade dos vírus vacinais com os circulantes. Portanto, a OMS publica anualmente a reformulação da composição dos vírus de vacinas sazonais com base nos relatórios da rede de vigilância(7).

Devido ao fenômeno de *antigenic drift*, vacinas de amplo espectro que promovam cobertura vacinal para múltiplas cepas de Influenza circulantes estão sendo estudadas. Uma delas é a vacina com polipeptídeos sintéticos análogos aos epítomos mais conservados dos vírus Influenza A e B provenientes de humanos e animais: a nucleoproteína (NP), a proteína de matriz 1 (M1) e a proteína de matriz 2 (M2). Resultados preliminares mostraram uma resposta predominantemente celular à esta vacina, mas especula-se que haverá resposta humoral dependente da dose da vacina e formulação testada. A vacina ainda está em fase de investigação(69).

2.11.1 Vacinas inativadas

As vacinas inativadas são as mais utilizadas dada a sua segurança comprovada. Os eventos adversos mais frequentes em todas as faixas etárias são as reações no local da administração(49).

O principal meio de cultivo dos vírus vacinais são ovos embrionados de galinha, embora a cultura em células mamíferas esteja se difundindo como alternativa. Especula-se que os vírus produzidos em ovos embrionados sofram mudanças genéticas adaptativas (*egg-adapted changes*) que contribuem para a incompatibilidade entre as cepas vacinais e os vírus circulantes, provocando uma resposta imune inadequada, com produção de anticorpos menos eficazes. Portanto, acredita-se que o cultivo em células mamíferas possa melhorar a imunogenicidade da vacina assim como rapidez na produção no caso de uma pandemia(9). Após o cultivo, os procedimentos e compostos virucidas para a inativação dos vírus variam de acordo com o fabricante, mas geralmente adiciona-se antibiótico à vacina para impedir contaminação bacteriana e o timerosal é utilizado como conservante(49).

Algumas vacinas inativadas contém adjuvantes na tentativa de melhorar a imunogenicidade vacinal(49). Os adjuvantes utilizados podem se MF59 ou ASO3, sendo ASO3 o mais comumente utilizado nas vacinas monovalentes A/H1N1pdm09(57,70–73). As vacinas adjuvantadas costumam ser indicadas para os idosos com a finalidade de aumentar o estímulo antigênico e, conseqüentemente, a resposta imunológica(49).

As vacinas inativadas podem ser completas (*whole virus vaccines*), fragmentadas (*split virus vaccine*) ou subunitárias (*subunit vaccine*). Nas vacinas completas, utiliza-se a partícula viral inteira e os antígenos de superfície (HA e NA) são conjugadas a um lipídeo; nas fragmentadas, o vírus é destruído por um detergente; e nas subunitárias, as glicoproteínas HA e NA são purificadas removendo-se os outros componentes virais. As vacinas completas possuem maiores taxas de reatogenicidade e imunogenicidade, seguida pelas fragmentadas, e as subunitárias são as menos reatogênicas(8).

Para a vacina trivalente, a dose antigênica para cada uma das cepas varia de acordo com a idade do indivíduo. Para as vacinas destinadas a crianças abaixo de 36 meses de idade utiliza-se a dose de 7,5 microgramas (mcg) de antígeno HA para cada cepa vacinal, ao passo que vacinas destinadas para indivíduos maiores que 36 meses de idade possuem 15 mcg de antígeno HA para cada uma das cepas vacinais. Recentemente nos EUA, foi aprovada para vacinação de indivíduos a partir de 65 anos de idade uma trivalente de alta dose contendo 60 mcg de antígeno HA para cada cepa vacinal (Fluzone High-Dose, Sanofi Pasteur)(74).

2.11.2 Vacinas atenuadas

Há dois tipos de vacinas atenuadas, a fabricada na Rússia (Leningrad-LAIV) e a fabricada nos EUA (AnnArbor-LAIV). Ambas as LAIV foram aprovadas para uso em crianças saudáveis a partir de 2 anos de idade até adultos com 49 anos de idade. A eficácia não foi demonstrada em adultos entre 50 e 64 anos de idade(49).

Os vírus utilizados para a fabricação da LAIV também são cultivados em ovos de galinha ou cultivo celular. Após o cultivo, sofrem adaptação ao frio (25 graus) que os torna termo-sensíveis de tal forma que a sua replicação em vias aéreas inferiores, onde a temperatura varia entre 38 e 39 graus, é restrita(7). Portanto, os vírus inativados replicam efetivamente na nasofaringe, mas não no trato respiratório inferior e a administração intranasal da vacina rapidamente induz uma resposta imunológica na mucosa das vias aéreas superiores. A resposta imunológica sérica é menor do que a das vacinas inativadas administradas de forma parenteral. Não há correlação nítida entre a imunogenicidade humoral e eficácia das vacinas LAIV(49).

A vacina LAIV tem se mostrado segura e os eventos adversos mais comuns são reações locais das vias aéreas superiores como rinorreia, odinofagia e congestão nasal. Febre pode ocorrer em crianças abaixo de 8 anos de idade. Em crianças menores de 2 anos de idade a vacina não é licenciada uma vez que estudos da AnnArbor-LAIV demonstraram aumento significativo de sibilância e hospitalização(49). Por se tratar de vacinas de vírus vivo atenuado, essas são contraindicadas em pacientes imunodeprimidos, como os pacientes transplantados(62).

2.12 Avaliação da imunogenicidade das vacinas de influenza

Define-se imunogenicidade como a capacidade de uma vacina de induzir uma resposta imunológica celular (produção de citocinas pelos linfócitos T) ou humoral (produção de anticorpos pelos linfócitos B)⁽⁶³⁾.

2.12.1 Imunogenicidade celular

Não há consenso de correlato de proteção da imunidade celular para a vacina de influenza. Em imunodeprimidos, ensaios *in vitro* como o teste de transformação linfocitária (*Lymphocyte Transformation Test* - LTT) que avalia a proliferação linfocitária e o imunoensaio (*Enzyme-Linked Immunospot* – ELISpot) que detecta a presença da citocina interferon gama (IFN- γ) produzida por linfócitos T têm sido utilizados de forma experimental para medir a resposta celular à vacina de influenza sazonal(75).

Um ensaio clínico comparou a correlação da imunogenicidade celular e humoral da vacina trivalente de influenza um mês após a vacinação em 65 transplantados renais e cinco adultos saudáveis. Na população dos transplantados renais, o ELISpot mostrou aumento da resposta imune celular em 85% e o LTT mostrou um aumento em 82% dos indivíduos. A resposta imune celular medida através do LTT e ELISpot foi pelo menos três vezes maior na população de adultos saudáveis comparado aos transplantados renais, com significância estatística. Nos transplantados renais, a imunofluorescência mostrou aumento dos títulos de anticorpos acima de 320 em 95% e 92% dos transplantados renais, para Influenza A e B respectivamente. Não houve diferença da imunogenicidade humoral entre os dois grupos. Na análise correlacional de Pearson, detectou-se correlação positiva entre os dois ensaios de imunogenicidade celular ($r = 0.62$, $P < 0,0001$), porém sem correlação entre a imunogenicidade celular e a humoral. Os transplantados renais com sistema imunológico preservado com melhor resposta inespecífica aos mitógenos também tiveram melhor resposta imune celular à vacina de influenza. O uso de prednisona teve correlação negativa com os resultados do ensaio LTT provavelmente pelo seu efeito inibidor sobre a interleucina 2. O tacrolimus, sendo mais potente do que a ciclosporina, teve efeito supressor maior na resposta celular no ELISpot do que a ciclosporina. Os níveis de linfócitos CD4 foram positivamente correlacionados com os resultados do LTT e ELISpot, enquanto os de linfócitos CD8 tiveram associação desprezível. Concluiu-se que o ELISpot possui uma sensibilidade maior comparado ao LTT na quantificação da imunidade celular induzida pela vacina de influenza e definiu-se como resultado adequado na imunogenicidade celular um aumento do índice de estimulação maior que três(75).

2.12.2 Imunogenicidade humoral

Para a avaliação da imunogenicidade humoral das vacinas de influenza, há três técnicas sorológicas que podem ser utilizadas: o teste de inibição da hemaglutinação (*Haemagglutination Inhibition* - HI), a hemólise radial simples (*Single Radial Haemolysis* - SRH) e os ensaios de microneutralização viral (MicroNT-ELISA).(76) Os testes de inibição da hemaglutinação (teste HI) e

SRH são padronizados e considerados equivalentes, sendo indicados na avaliação primária da imunogenicidade vacinal(76,77).

O teste HI é o mais utilizado na detecção e quantificação de anticorpos contra os vírus Influenza pela sua facilidade de realização e por ser um método padronizado. No entanto, a sua sensibilidade é menor do que a MicroNT-ELISA uma vez que a microneutralização detecta anticorpos que inibem a entrada do vírus na célula hospedeira e a replicação, enquanto o teste HI quantifica apenas anticorpos contra a glicoproteína HA. O teste HI também apresenta menor sensibilidade para detectar vírus com mutação antigênica.(77) Uma comparação das técnicas de HI e microNT-ELISA na avaliação da resposta imune humoral à vacina trivalente de influenza sazonal do ano 2006 a 2007 para o hemisfério norte mostrou uma correlação positiva entre os dois métodos para a detecção de anticorpos para as três cepas de vírus, sugerindo que MicroNT-ELISA é um método alternativo ao ensaio HI(77).

Em estudos, títulos de anticorpos inibidores de hemaglutinação de 1:32 a 1:40 são correlacionados com a proteção clínica da influenza a nível populacional. No estudo por Hobson et al. demonstrou-se que títulos de anticorpos HI de 1:18 a 1:36 oferece uma taxa de proteção de 50%(78). Um estudo observacional avaliou a associação entre os títulos de anticorpos inibidores de hemaglutinação para Influenza H3N2 após a vacinação e a ocorrência de doença por este vírus. Utilizou-se a análise da curva ROC para identificar o ponto de corte de título de anticorpos que estabeleciam proteção. Foi identificada uma redução de risco para adoecimento em duas vezes quando houve aumento de quatro vezes no título de anticorpos, confirmando a correlação entre proteção da doença e resposta imunológica quantificada pela técnica de HI(73).

Em uma meta-análise comparando o efeito da primeira vacina de influenza e múltiplas vacinas de influenza em jovens e idosos, mostrou-se que apesar da heterogeneidade da resposta sorológica entre os grupos expostos a primeira vacina ou com histórico de múltiplas vacinas prévias, uma vez atingida o corte de título acima de 1:40 a proteção conferida contra influenza foi

semelhante, e não foi dependente dos títulos altos ou baixos de anticorpos inibidores de hemaglutinação(79).

O SRH é um teste sorológico desenvolvido em 1975 por Schild para a detecção e quantificação de anticorpos inibidores de hemaglutinação. A técnica combina as vantagens da imunodifusão com a sensibilidade dos testes HI. Acrescenta-se soro humano a placas contendo gel agarose preparado com eritrócitos de galinha, vírus influenza e complementos do porquinho da Índia. Incuba-se as placas a 37 graus por 16 horas e depois faz-se a leitura. Mede-se os diâmetros das zonas de inibição de hemaglutinação e estes são proporcionais às concentrações de anticorpos contra influenza presentes no soro(80).

2.13 Padronização dos critérios de imunogenicidade

Em 1997, o Comitê Europeu de Produtos Medicinais da Agência Europeia para avaliação de Produtos Medicinais (*Committee for Proprietary Medicinal Products of the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – CPMP/EMA*), hoje conhecido como Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency – EMA*), emitiu um documento para a harmonização dos requisitos para o licenciamento de vacinas de influenza que posteriormente foram adotados em pesquisas relacionadas às vacinas de influenza no mundo. Neste documento, estipularam que ensaios clínicos para avaliar a imunogenicidade e segurança de novas vacinas de influenza contenham dois grupos de adultos da população geral. Um grupo composto por adultos jovens entre 18 e 60 anos de idade, e o outro por adultos idosos acima de 60 anos de idade, excluindo indivíduos com vacinação nos últimos 6 meses. O tamanho amostral do estudo deveria ser de no mínimo 50 participantes em cada grupo e o intervalo entre a vacinação e avaliação de resposta vacinal de três semanas. Definiram a dose antigênica das cepas vacinais, além dos procedimentos de rotulação e controle de qualidade(81).

A EMA padronizou os seguintes parâmetros sorológicos para avaliação da resposta vacinal: soroconversão, soroproteção e aumento da média

geométrica dos títulos de anticorpos. Quando utilizado o teste HI, a soroconversão corresponde a título de anticorpos inibidores de hemaglutinação negativo ($<1:10$) na avaliação pré-vacinação com positividade após a vacinação ($\geq 1:40$), ou título de anticorpos inibidores de hemaglutinação positivo na avaliação pré-vacinação positiva ($\geq 1:10$) com aumento de pelo menos quatro vezes após a vacinação. A soroproteção se refere a título de anticorpos inibidores de hemaglutinação $\geq 1:40$ após a vacinação, independentemente do título de anticorpos pré-vacinação. Recomenda-se também calcular as médias geométricas dos logaritmos dos títulos de anticorpos (MGT) antes e após a vacinação, calculando-se o aumento dos MGT na avaliação pós-vacinação em relação a pré-vacinação (razão das médias geométricas dos títulos de anticorpos - RMG). Quando utilizado o ensaio SRH descrito acima, a soroconversão corresponde a uma zona de hemólise pré-vacinação negativa ($<25 \text{ mm}^2$) com positividade após a vacinação ($\geq 25 \text{ mm}^2$), ou uma zona de hemólise pré-vacinação positiva ($\geq 25 \text{ mm}^2$) com aumento de pelo menos 50% após a vacinação. A soroproteção se refere a zona de hemólise $> 25 \text{ mm}^2$ após a vacinação, independentemente do diâmetro na pré-vacinação(81).

Os critérios de imunogenicidade adequada são distintos para cada faixa etária. Em adultos jovens, a taxa de soroconversão deve ser $\geq 40\%$ e/ou a $\text{RMG} \geq 2,5$ e/ou a taxa de soroproteção $\geq 70\%$ para cada cepa vacinal. Para os idosos, a taxa de soroconversão deve ser $\geq 30\%$ e/ou a $\text{RMG} \geq 2,0$ e/ou a taxa de soroproteção $\geq 60\%$ para cada cepa vacinal. Para o licenciamento de vacinas sazonais, pelo menos um dos critérios tem que ser alcançado para todos os vírus vacinais sob avaliação, enquanto que para vacinas pandêmicas todos os critérios têm que ser alcançados(81). A Tabela 1 mostra um resumo dos critérios de imunogenicidade adequada conforme padronizados pela EMA.

Tabela 1 - Critérios de imunogenicidade adequada por faixa etária conforme os critérios da EMA - 1997

Critério de Imunogenicidade	Idade	
	18 – 60 anos	>60 anos
Taxa de soroconversão	>40%	>30%
Taxa de soroproteção	>70%	>60%
RMG (título pós-vacinação/ título pré-vacinação)	>2,5	>2,0

2.14 Relevância dos correlatos imunológicos de proteção

Beyer et al avaliaram a relevância biológica e clínica dos parâmetros sorológicos utilizados na avaliação da imunogenicidade das vacinas de influenza. Os autores mostraram que existem limitações ao estimar a imunogenicidade vacinal uma vez que a resposta vacinal medida depende da prevalência de anticorpos em uma determinada população antes da vacinação(82).

Em indivíduos soronegativos antes da vacinação, os títulos de anticorpos após a vacinação tiveram uma distribuição normal. Nestes indivíduos, na avaliação pós-vacinal, a MGT e a taxa de soroproteção foram os parâmetros mais confiáveis para a medida de resposta vacinal. A soroconversão nestes indivíduos não trouxe informação relevante. Em indivíduos soropositivos após vacinação ou infecção prévia, a MGT e a taxa de soroproteção superestimaram a imunogenicidade vacinal. O mesmo achado vale para uma população mista. Isto ocorre uma vez que estes dois parâmetros são influenciados pelos títulos de anticorpos pré-existent antes da vacinação. Por outro lado, utilizar a taxa de soroconversão e a RMG subestimou a resposta vacinal nesta população já que maiores títulos de anticorpos na pré-vacinação resultam em menor aumento na pós-vacinação(82).

Sugeriu-se então, incluir na avaliação das médias geométricas dos títulos de anticorpos e taxas de soroproteção apenas indivíduos soronegativos embora haja risco de redução da precisão das análises estatísticas. Também

identificou-se a necessidade de tratar os títulos de anticorpos pré-vacinais como fator confundidor e corrigi-los na análise estatística com preferência para regressão logística(82).

Destacou-se a relevância da taxa de soroproteção como marcador biológico de proteção e a sua utilidade para tomada de decisões referentes a vacina de influenza dentro da saúde pública. Os autores sugeriram um algoritmo para auxiliar na decisão de inclusão ou não de vacina no âmbito de saúde pública. De acordo com este, uma vacina teria relevância imunológica e clínica para saúde pública quando a MGT e a taxa de soroproteção fossem significativas, podendo prevenir adoecimento e complicações. Por outro lado, uma vacina teria apenas relevância imunológica se a despeito de boa MGT, apresentar baixa soroproteção comprometendo a prevenção de doença(82).

A EMA recentemente publicou um artigo no qual se rediscute a relevância dos pontos de corte dos parâmetros sorológicos de resposta vacinal previamente estabelecidos para a população geral em subpopulações de crianças e portadores de comorbidades. Reconhece-se a necessidade de novas recomendações baseadas em evidências para diferentes populações. Reconhece-se também que a heterogeneidade nos desenhos e vacinas avaliadas nos ensaios clínicos, assim como a variabilidade interlaboratorial dos resultados impactam na interpretação final da eficácia vacinal. Além da quantificação dos títulos de anticorpos inibidores contra a hemaglutinina, recomenda-se futuramente determinar os títulos de anticorpos contra a neuraminidase, mas até o momento, não há padronização da dose antigênica de neuraminidase nas vacinas e nem a padronização de ensaios para a quantificação de títulos de anticorpos contra a neuraminidase. Portanto, desde 2015, propõe-se a abolição dos critérios de imunogenicidade previamente preconizados e a ampliação da população dos ensaios clínicos para incluir e avaliar os desfechos clínicos em crianças de 6 a 36 meses de idade(83).

2.15 Imunogenicidade em imunodeprimidos

Estudos de vacinas de influenza mostram imunogenicidade reduzida e mais heterogênea em imunodeprimidos do que na população geral. Estima-se uma taxa média de resposta vacinal de 50% (variando de 10% a 90%) em receptores de TOS, em comparação à taxas de aproximadamente 80-90% em adultos da população geral(84,85).

Entre os receptores de TOS, fatores como tipo de órgão transplantado, tempo pós-transplante no momento da vacinação, tipo e dose da vacina utilizada, as cepas vacinais e tempo decorrido entre a vacinação e a avaliação da resposta vacinal influenciam nas taxas encontradas na avaliação de imunogenicidade(71,86).

Em relação ao tipo de transplante, no estudo de Cordero et al que avaliou a resposta à vacina trivalente em receptores de TOS, os autores mostraram que transplante de rim e de coração reduziram a soroproteção e o transplante de pulmão não teve associação. O transplante de rim reduziu a soroproteção tanto a duas cepas vacinais (OR=0,46; IC95%=0,27-0,79; $p<0,01$) como às três cepas vacinais (OR=0,49; IC95%=0,29-0,82; $p<0,01$), enquanto que o transplante de coração reduziu proteção às três cepas (OR=0,40; IC95%=0,18-0,89; $p<0,05$)(55). Mombelli et al. não encontraram redução de soroconversão em transplantados renais em relação aos transplantados de fígado(85). O Baluch et al. relataram menor soroproteção a A/H1N1 em transplantados de pulmão do que nos outros receptores de TOS(87), já Natori et al. não encontraram impacto negativo do transplante de pulmão na soroconversão(84).

Estratégias como a administração de alta dose da vacina, dose de reforço e a administração intradérmica da vacina têm sido avaliadas na tentativa de aumento da imunogenicidade(62,88). Considera-se clinicamente significativos aumentos nas taxas de soroconversão de 20 a 30% em relação às taxas conferidas pela dose padrão da vacina, embora a esta opinião seja variável entre pesquisadores(12,84,85).

Uma revisão sistemática de Chong et al. avaliou as esquemas alternativos de vacinação a partir da análise seis ensaios clínicos controlados e um estudo

de coorte prospectivo com população predominantemente de adultos do sexo masculino (868 de 943 - 92%), com 422 transplantes de rim, 229 de fígado, 181 de pulmão, 89 de coração, 21 múltiplos órgãos e um de intestino. Observou-se que as altas doses e a dose de reforço da vacina promoviam melhores taxas de soroproteção, embora com variação significativa entre os estudos(71).

Uma meta-análise mais recente realizada por Lai et al. em população de imunodeprimidos receptores de TOS e portadores de neoplasias hematológicas confirma aumento de soroconversão e soroproteção com as altas doses da vacina para A/H1N1 ($p<0,05$) e A/H3N2 ($p=NS$), porém sem impacto para Influenza B. Relataram melhor imunogenicidade da dose quadruplicada em relação à dose dobrada particularmente em adultos > 18 anos de idade e em receptores de TOS do que indivíduos sob quimioterapia por neoplasias hematológicas. O número necessário para vacinar foi 7,7 e 14,3 para obter soroconversão e soroproteção, respectivamente. Manteve-se a heterogeneidade nos desenhos e características clínicas das populações estudadas(12).

Estudos de imunogenicidade da vacina de influenza trivalente em imunodeprimidos e grupo controle de adultos sadios demonstram a heterogeneidade da imunogenicidade de cada cepa vacinal independentemente da dose da vacina. Esta heterogeneidade na imunogenicidade sugere que os fatores que influenciam a resposta vacinal sejam distintos e intrínsecos de cada cepa de Influenza A e B. Em geral, as cepas de Influenza A demonstram maior homogeneidade nas respostas e fatores associados à resposta vacinal do que a cepa Influenza B. Um fator limitante dos estudos de vacinas de influenza é a grande heterogeneidade nos desenhos e análise de dados nos estudos que aumenta o risco de viés e dificulta a interpretação dos resultados(12,71,89).

2.15.1 Dose padrão da vacina

A maioria dos estudos encontrados na literatura mostram baixo desempenho da dose padrão da vacina monovalente ou trivalente em

transplantados renais, com alguns estudos demonstrando pior resposta vacinal em transplantados renais do que em outros grupos de imunodeprimidos(55,70,86,89–94).

Vacina monovalente

Um estudo canadense por Fairhead et al. em 2009/2010 avaliou a imunogenicidade da vacina monovalente de influenza A/H1N1pdm09 adjuvantada em dois cortes de 124 transplantados renais. Para a avaliação de imunogenicidade, o primeiro corte (42 pacientes) coletou sangue antes e 30 a 45 dias após a vacinação, enquanto o segundo corte (82 pacientes) coletou sangue apenas após a vacinação. No seguimento de seis meses avaliou-se a incidência de influenza e rejeição do enxerto. Por se tratar de novo subtipo viral, a taxa de soroproteção pré-vacinação foi de 7%, enquanto a taxa de soroconversão foi de 29% no primeiro corte. As taxas de soroproteção variaram de 31% a 35% nos dois cortes, com média de 34%. Os autores levantaram a hipótese de possível associação entre o grau de imunodepressão e a resposta vacinal após o achado de menor soroconversão com imunossupressão tripla (22%; OR=0,07; IC95%=0,01–0,71). O uso de tacrolimus e micofenolato foi associado a menor resposta vacinal, embora sem significância. Nenhum paciente com tempo pós-transplante abaixo de seis meses obteve soroconversão. Neste estudo, idade, disfunção renal, tipo e número de imunossupressores não afetou a soroproteção. O evento adverso mais comum foi dor no local da aplicação (36%), seguido de astenia (24%) e mialgia (21%). Identificou-se anticorpos anti-HLA em cinco pacientes, onde três desenvolveram os anticorpos após a vacinação. Três pacientes apresentavam anticorpos contra HLA do doador e os outros dois pacientes anticorpos inespecíficos, porém idênticos. Um dos pacientes com anticorpos inespecíficos evoluiu com elevação de creatinina e diagnóstico de rejeição crônica. Concluiu-se que o adjuvante vacinal ASO3 poder aumentar o risco de desenvolvimento de anticorpos contra HLA e rejeição do enxerto. Não houve eventos adversos sérios(70).

Um estudo belgo por Broeders et al. em 2009 comparou a imunogenicidade da vacina monovalente de influenza A/H1N1pdm09 adjuvantada em 53 pacientes sob hemodiálise, 111 transplantados renais e 21 adultos saudáveis. Coletou-se amostras de sangue antes e 30 dias após a vacinação. A avaliação da imunogenicidade foi pelo teste de neutralização. A taxa de soroconversão foi menor nos transplantados renais (44%) quando comparada aos pacientes sob hemodiálise (57%) e controles (90%) ($p < 0,001$). Tanto a hemodiálise ($OR = 0,14$; $IC_{95\%} = 0,03-0,72$; $p = 0,02$) como o transplante renal ($OR = 0,09$; $IC_{95\%} = 0,02-0,42$; $p < 0,01$) foram significativamente associados à baixa chance de soroconversão mesmo após ajuste para idade e sexo. A proporção de soroconversão foi semelhante entre usuários de azatioprina e micofenolato (50% e 41%, $p = 0,41$), mas o aumento nos títulos de anticorpos foi significativamente maior no subgrupo com azatioprina do que com micofenolato, RMG de 7,7 e 3,7 com valor $p = 0,03$, respectivamente. Fatores como idade, sexo, diabetes, função renal e tempo pós-transplante não tiveram associação com soroconversão. Neste estudo, não houve aumento de anticorpos antiHLA após a vacinação ou eventos adversos sérios(93).

Em estudo brasileiro por Miraglia et al. em 2010, avaliou-se a imunogenicidade da vacina monovalente de influenza A/H1N1pdm09 não adjuvantada produzida pelo Instituto Butantan em grande população de imunodeprimidos. Foram avaliados 1.152 indivíduos (319 portadores de neoplasias, 260 portadores de artrite reumatóide, 256 pessoas vivendo com HIV, 149 idosos, 85 transplantados renais e 83 portadores de artrite juvenil). Todos os grupos atingiram RMG $> 2,5$, onde a menor RMG foi de 3,2 em transplantados renais e a maior foi de 16,5 em portadores de artrite juvenil. A taxa de soroconversão foi mais baixa nos transplantados renais (31,8%) quando comparado aos portadores de artrite juvenil (78,3%), idosos (55,7%), pessoas vivendo com HIV (54,7%), portadores de artrite reumatóide (53,1%) e portadores de neoplasias (49,2%). A taxa de soroproteção também foi menor nos transplantados renais (37,8%) comparado aos portadores de artrite juvenil (85,5%), idosos (63,1%), pessoas vivendo com HIV (59%), portadores de artrite reumatóide (61,5%) e portadores de neoplasias (52%). As taxas de

soroproteção encontradas foram mais baixas do que as taxas descritas para adultos da população geral, exceto para os portadores de artrite juvenil(90).

Azevedo et al. utilizaram os dados do estudo de Miraglia et al. para a análise de fatores associados à soroconversão na subpopulação de 85 pacientes transplantados renais. Cinco pacientes foram excluídos da subanálise por apresentarem títulos de anticorpos $\geq 1:40$ antes da vacinação. A taxa de soroconversão foi baixa, ocorrendo em 27 (33,8%) de 80 pacientes. As taxas de soroconversão foram de 47,3% nos indivíduos do sexo feminino e 21,4% no masculino. Estabeleceu-se uma associação entre maior tempo de transplante e maior chance de soroconversão (124 meses vs. 77 meses, $p=0,012$). O uso de minofenolato no esquema imunossupressor foi associado com menores taxas de soroconversão (9 em pacientes em uso de micofenolato vs. 15 nos pacientes sem micofenolato, $p<0,001$). Esquemas com sirolimus favoreceram maiores taxas de soroconversão, mas o número de pacientes em uso de sirolimus foi baixo e não houve significância estatística ($OR=4,43$, $IC95\%=0,75-25$, $p=0,099$). Fatores como idade, tipo de doador, terapia de indução, valores de creatinina, leucócitos totais, linfócitos, número de imunossupressores, nível sérico de tacrolimus, e diagnóstico e tratamento de rejeição celular aguda não foram estatisticamente significativos. A vacina foi segura e não foi descrito nenhum caso de rejeição do enxerto(91).

Um estudo Australiano por Mulley et al. em 2012 também avaliou a imunogenicidade da vacina monovalente de influenza A/H1N1pdm09 não adjuvantada em 151 transplantados renais, 71 pacientes sob hemodiálise e 30 adultos saudáveis. Este estudo excluiu indivíduos com histórico de vacinação prévia com a vacina monovalente A/H1N1pdm09, portanto teve uma baixa prevalência de soroproteção basal o que reduz a influência deste fator confundidor na avaliação da resposta vacinal. Mediu-se os títulos de anticorpos antes e um mês após a vacinação. Na população analisada, as taxas de soroproteção basal foram 13% em transplantados renais, 16% em dialíticos e 10% em adultos saudáveis, sem diferença estatística. As taxas de soroproteção após a vacinação foram 44% em transplantados renais, 56% em dialíticos e 87% em adultos saudáveis, com significância estatística ($p<0,001$). As taxas de

soroconversão foram 31,8% em transplantados renais, 45,1% em dialíticos e 77% em adultos saudáveis, com significância estatística ($p < 0,001$). As MGT também foram maiores em adultos saudáveis (121,3) e dialíticos (53,1) do que em transplantados renais (26,8), com significância estatística ($p < 0,001$). Em análise de subgrupo com títulos de anticorpos $< 1:40$ antes da vacinação, também se observou pior resposta vacinal em transplantados renais e melhor resposta em adultos saudáveis. Em relação a fatores associados à soroproteção, após ajustes para idade e sexo, estar sob hemodiálise (OR=2,68; IC95% 1,31-5,52; $p=0,007$) e ser sadio (OR=5,84; IC95% 1,79-19,06; $p=0,003$) aumentaram a chance de soroproteção em relação a transplante renal. Em análise apenas de 131 transplantados renais com títulos de anticorpos $< 1:40$ antes da vacinação, cada 10 anos de aumento da idade (OR=0,70; IC95% 0,49-0,9996; $p=0,047$) e tempo pós-transplante abaixo de 6 meses (OR=0,10; IC95% 0,01-0,86; $p=0,04$) reduziram a soroproteção. Após ajustes para idade, sexo, tempo pós-transplante, uso de inibidor de calcineurina, rituximab e prednisolona, observou-se que o uso de micofenolato reduziu a soroproteção (OR ajustada=0,24; IC95% 0,07-0,79; $p=0,02$) efeito dose dependente onde dose diária acima de 2g teve maior impacto na redução da soroproteção. O declínio da taxa de filtração glomerular também reduziu a chance de soroproteção, onde indivíduos com TFG 30-60 ml/min (OR=0,67; IC95% 0,27-1,55; $p=0,34$) tiveram melhor resposta do que os com TFG < 30 ml/min (OR 0,16; IC95% 0,03-0,88; $p=0,04$)(95).

Vacina trivalente

Um estudo australiano por Smith et al. em 1994 avaliou a imunogenicidade da vacina trivalente em 38 transplantados renais e em 20 adultos saudáveis trabalhadores de saúde no hospital do estudo. Os participantes coletaram sangue antes e quatro a seis semanas após a vacinação para avaliação de imunogenicidade. O tempo de seguimento foi de dois meses. Participantes com títulos de anticorpos abaixo de 1:40 para um ou mais antígenos vacinais, foram submetidos à nova coleta de sangue antes de receberem uma dose de reforço da mesma vacina. Estes coletaram novamente

amostras de sangue quatro a seis semanas após a dose de reforço da vacina. Entre os transplantados renais, também foi avaliado o efeito do uso de azatioprina ou micofenolato no esquema de imunossupressão devido à hipótese de possível inibição da produção de anticorpos pelo micofenolato. Os títulos de anticorpos pré-vacinação eram menores nos transplantados renais para A/H1N1 e A/H3N2 do que em adultos saudáveis, com o grupo utilizando micofenolato apresentando os menores títulos, sem significância estatística. Este achado foi justificado pelo efeito supressor do micofenolato na produção de anticorpos. As taxas de soroconversão foram maiores no grupo controle com aumento dos títulos de anticorpos a 50% dos antígenos vacinais, comparado a 33% dos antígenos nos transplantados renais em uso de azatioprina, e a 10% dos antígenos nos transplantados renais em uso de micofenolato, com significância estatística. Nenhum participante em uso de micofenolato obteve resposta a todos os três antígenos vacinais e aumento dos MGT não foram significativas neste grupo. Em relação aos não repondedores, sete adultos saudáveis, nove transplantados renais em uso de azatioprina e oito transplantados renais em uso de micofenolato receberam a dose de reforço. De 46 antígenos vacinais com títulos de anticorpos < 1:40, houve aumento dos títulos > 1:40 para apenas seis antígenos (13%), sem diferença entre os grupos. Os resultados mostraram que o esquema de contendo micofenolato teve um efeito imunossupressor mais profundo na resposta humoral do que uso da azatioprina(96).

Em estudo brasileiro Salles et al. em 2005 avaliaram o efeito dos imunossupressores na resposta à vacina trivalente em 69 transplantados renais. A resposta vacinal foi avaliada um e seis meses após a vacinação. Houve aumento das taxas de soroproteção antes e após a vacina para A/H1N1 de 8,7% a 49,3% e para A/H3N2 de 8,7% a 36,3%, respectivamente ($p < 0,001$). Resposta para cepa Influenza B ocorreu em um paciente apenas. As taxas de soroconversão foram 36% para A/H1N1, 25,3% para A/H3N2 e 1,3% para Influenza B. O uso de micofenolato reduziu as taxas de soroproteção aos antígenos A/H1N1 e A/H3N2. Indivíduos com tempo de transplante menor do que 87 meses tiveram menor soroproteção, com significância estatística para A/H1N1, e menor soroconversão para A/H1N1 e A/H3N2 com significância

estatística para ambos. Sexo, idade, tipo de doador, comorbidades, uso de corticóide, tacrolimus e ciclosporina não tiveram associação com soroproteção ou soroconversão. Não houve suspeita clínica de rejeição aguda do enxerto(94).

Um estudo americano de Birdwell et al. em 2006 comparou a resposta vacinal em 53 transplantados renais e 106 adultos saudáveis antes e um mês após a vacina trivalente. Ambos os grupos apresentavam proporção semelhante de participantes referindo vacinação prévia com títulos basais de anticorpo $> 1:32$ para todos os antígenos vacinais em 45% dos participantes de cada grupo. Os transplantados renais apresentaram menor chance de soroconversão (OR=0,31; IC95%=0,16-0,62; $p=0,001$) e soroproteção (OR=0,22; IC95%=0,09-0,53; $p=0,001$) do que os adultos saudáveis. Em análise estratificada por tempo pós-transplante, indivíduos com tempo pós-transplante < 6 meses tiveram significativamente menor soroconversão para todos os antígenos vacinais comparados aos adultos saudáveis, enquanto que os com tempo pós-transplante > 6 meses tiveram significativamente menor soroconversão apenas para A/H3N2 em relação ao grupo controle. Em relação a soroproteção, indivíduos com tempo pós-transplante < 6 meses também tiveram significativamente menor soroproteção para A/H1N1 e A/H3N2 comparado aos adultos saudáveis. Em análise de subgrupo de transplantados renais com títulos de anticorpos abaixo de 1:32 na pré-vacinação, aqueles com tempo pós-transplante < 6 meses tiveram redução da chance de soroproteção variando de 54 a 85% em relação aos adultos saudáveis. Análise multivariada de fatores associados a resposta vacinal foi comprometida pelo número pequeno de transplantados renais(97).

Birdwell et al. utilizaram a mesma corte acima descrita para avaliar a manutenção dos níveis protetores de anticorpos ($\geq 1:32$) em 51 transplantados renais e 102 adultos saudáveis que apresentaram soroproteção a pelo menos um antígeno vacinal na avaliação um mês após a vacinação. A última coleta de sangue pelo estudo foi realizada seis a onze meses após a vacinação, antes da próxima vacina sazonal. A mediana do tempo de seguimento foi de 174,5 dias e 155 dias para transplantados renais e adultos saudáveis, respectivamente. A proporção de soroproteção basal foi para A/H3N2 foi significativamente menor

entre transplantados renais comparado aos adultos saudáveis (47% e 69%, $p=0,01$). Ao final do estudo, não houve diferença na proporção de soroprotetidos para os três antígenos vacinais entre os dois grupos. As taxas entre transplantados renais e adultos saudáveis foram 88,5% versus 81,6% para A/H1N1; 66,7% versus 90,4% para A/H3N2; e 74,2% versus 83,7% para Influenza B, respectivamente. Para A/H3N2, a proporção de soroprotetidos foi significativamente menor entre transplantados renais comparado aos adultos saudáveis em análise bruta ($OR=0,21$; $IC95\%=0,07-0,64$; $p=0,006$), perdendo a significância após ajustes para títulos um mês após a vacinação que já eram menores em transplantados ($OR=0,52$; $IC95\%=0,08-3,29$; $p=0,49$). O estudo mostrou a despeito da queda nos títulos induzidos pela vacinação, a grande maioria dos transplantados renais consegue manter títulos protetores para os três antígenos vacinais(98).

Dois estudos apresentados a seguir mostraram resultados conflitantes com melhor resposta vacinal em transplantados renais(68,99).

Em estudo polonês em 1999, Wyzgal et al. avaliaram a imunogenicidade da vacina trivalente em 23 pacientes transplantados renais. Treze pacientes estavam sob imunossupressão tripla e o restante com imunossupressão dupla. Os níveis protetores de anticorpos inibidores de hemaglutinação foram alcançados por 86,7 a 100% dos pacientes no primeiro mês após a vacinação, com queda para 40 a 73,4% no terceiro mês. Nenhum dos pacientes teve influenza ou disfunção do enxerto renal. Entretanto, não foi avaliado o efeito dos medicamentos imunossupressores na resposta humoral(99.)

Em estudo holandês em 2003, Scharpé et al avaliaram a imunogenicidade e segurança da vacina trivalente em 165 transplantados renais comparados com 41 voluntários saudáveis. A resposta humoral foi avaliada antes e um mês após a vacinação. As taxas de soroconversão foram semelhantes entre os transplantados e adultos saudáveis. No entanto, as taxas de soroproteção nos transplantados renais foram maiores (92,7% para A/H1N1, 78,7% para A/H3N2 e 82,9% para Influenza B) do que nos adultos saudáveis. A vacina foi segura e não houve disfunção do enxerto renal ou episódios de rejeição aguda(68).

A Tabela 2 apresenta o resumo dos estudos que avaliaram resposta vacinal à dose padrão da vacina de influenza em indivíduos imunodeprimidos, particularmente nos transplantados renais.

Tabela 2 - Estudos de corte prospectivo avaliando resposta à dose padrão da vacina em transplantados renais

Autor e país	Tipo de vacina	População	Desfechos imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Fairhead T et al., 2012 Canadá	Monovalente A/H1N1pdm09 inativada, adjuvantada ASO3 Outubro 2009 a Janeiro 2010	124 TR	Coleta de sangue: D0 e D30-45 Soroproteção basal: 7% Soroconversão: 29% Soroproteção D30-45: 34%	Imunossupressão tripla (OR=0,07; IC95%=0,01-0,71; p=0,01) Tempo pós-transplante < 6 meses (p=NS) Micofenolato (p=NS) Tacrolimus (p=NS)
Broeders NE et al., 2011 Bélgica	Monovalente A/H1N1pdm09 inativada, adjuvantada ASO3 Novembro 2009	111 TR 53 HD 21 AS	Coleta de sangue: D0 e D30 *técnica microneutralização Soroconversão D30: 90% AS X 57% HD X 44% TR (P<0,001) Usuários azatioprina x micofenolato: 50% X 41% (p=0,41) RMG D30: 38 AS X 9 HD X 5 TR (p<0,001) Usuários azatioprina x micofenolato: 7,7 X 3,7 (p=0,03)	HD (OR=0,13; IC95%=0,03-0,60; p=0,009) TR (OR=0,08; IC95%=0,02-0,37; p=0,001) Uso de micofenolato

Tabela 2 – continuação...

Autor e país	Tipo de vacina	População	Desfechos imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Miraglia JL et al., 2011 e Azevedo LS et al., 2013	Monovalente A/H1N1pdm09, inativada, não adjuvantada	319 pacientes com cancer 260 AR 256 PVHIV 85 TR 83 AJ (idade > 6 meses)	Coleta de sangue: D0 e D21 Soroconversão D21: 49,2% pacientes com câncer X 53,1% AR X 54,7% PVHIV X 31,8% TR X 78,3% AJ X 55,7% idosos	Maior tempo pós-transplante (OR=1,00; IC95%=0,95-1,01; p=0,018) Sexo feminino (OR=3,30; IC95%=1,27-8,74; p=0,016)
Brasil	Março a julho, 2010	149 idosos (> 60 anos)	Soroproteção D21: 52% pacientes com câncer X 61,5% AR X 59% PVHIV X 37,8% TR X 85,5% AJ X 63,1% idosos RMG: > 2,5 para todos os grupos, mas menor em TR	Uso do micofenolato (OR=0,16; IC95%= 0,06-0,46; p=0,001) Uso de Sirolimus (OR=4,43; IC95%=0,75-25; p=0,099) Idade > 60 anos no grupo de TR (p=NS) Título de anticorpo ≥ 1:40 reduziu RMG (p=NS)

Tabela 2 – continuação...

Autor e país	Tipo de vacina	População	Desfechos imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Mulley WR et al., 2012	Monovalente A/H1N1pdm09, não adjuvantada	151 TR 71 HD 30 AS	Coleta de sangue: D0 e D28 Soroproteção basal TR: 13%X HD:16% AS: 10%	HD (ORa=2,68; IC95%=1,31-5,52; p=0,007) AS (ORa=5,84; IC95% 1,79-19,06; p=0,003)
Austrália	2009		Soroconversão D28: 31,8% TR X 45,1 HD X 77% AS (p<0,001) Soroproteção D28: 44% TR X 56% HD X 87% AS (p<0,001) MGT D28 26.8 TR X 53.1 HD X 121,3 AS (p<0,001)	Aumento idade (ORa=0,70; IC95%=0,49-0,0996; p=0,047) Tempo pós-transplante < 6 meses (ORa=0,10; IC95% =0,01-0,86; p=0,04) Micofenolato > 2g/dia (ORa=0,24; IC95%=0,07-0,79; p=0,02) TFG < 30 ml/min (ORa=0,16; IC95%= 0,03-0,88; p=0,04)
Smith KG et al., 1998	Trivalente inativada	38 TR 20 AS	Coleta de sangue: D0 e D28-42 Soroconversão D28-42: 33% TR com azatioprina 10% TR com micofenolato 50% controles	Micofenolato 2-3g/dia
Austrália	1994			

Tabela 2 – conclusão

Autor e país	Tipo de vacina	População	Desfechos imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Birdwell KA et al., 2012	Trivalente inativada	51 TR 102 AS	Coleta de sangue: D0 e D28	TR soroconversão
EUA	Outubro a Novembro 2006		Taxas soroproteção final da estação de influenza: H3N2 – 66,7% TR X 90,4% AS (OR=0,21 0,07-0,64 p=0,006) H1N1 e Influenza B: semelhante	(OR=0,31; IC95%=0,16-0,62; p=0,001) TR soroproteção (OR=0,22; IC95%=0,09-0,53; p=0,001) Tempo pós-transplante < 6 meses
Wyzgal J et al., 2002	Trivalente inativada	23 TR	Coleta de sangue: D0, D28, D90 Taxas soroproteção D28: 86,7 – 100%	NÃO AVALIADO
Polonia	Novembro a Dezembro 1999			
Scharpe J et al., 2008	Trivalente inativada	165 TR 41 AS	Coleta de sangue: D0 e D28 Soroconversão D28: H1N1: TR - 30,3% X AS – 45% H3N2: TR – 29,9% X AS – 30% Influenza B: TR - 23,2% X AS – 27,5%	Soroproteção basal aumenta proteção pós vacinal
Holanda	Setembro a novembro 2003		Soroproteção D28: H1N1 (P<0,0001): TR – 92,7% X AS – 70,7% H3N2: TR – 78,7% X AS – 82,9% Influenza B: (P<0,0001: TR – 82,9% X AS – 48,8%	Micofenolato (p=NS)

AJ – artrite juvenil; AR - artrite reumatóide; AS - adultos saudáveis; ; HD – hemodiálise; PVHIV – pessoas vivendo com HIV/aids; NS – não significativo; TFG – Taxa de filtração glomerular; TR – transplantados renais.

2.15.2 Alta dose da vacina

A partir dos estudos avaliados, as altas doses da vacina de influenza para administração em dose única são a dose dobrada (DD) contendo 30 mcg de antígeno HA para cada cepa vacinal ou a dose quadruplicada (DQ) contendo 60 mcg de antígeno HA para cada cepa vacinal. Estudos avaliando a dose quadruplicada da vacina em imunodeprimidos são mais frequentes do que estudos avaliando a dose dobrada da vacina uma vez que desde 2014 ocorre a comercialização da vacina Fluzone de alta dose com carga antigênica de 60 mcg na América do Norte(84,85,100,101).

Dose dobrada

Um estudo suíço por Mombelli et al., publicado em 2018, avaliou a imunogenicidade e segurança da dose dobrada da vacina de influenza trivalente em receptores TOS. Os autores conduziram um ensaio clínico randomizado comparando o desempenho da dose dobrada (30 mcg de HA) e da dose padrão (15 mcg de HA) da vacina de influenza trivalente do ano 2014/2015 em 79 pacientes TOS: 63 receptores de rim e 16 receptores de fígado. A dose dobrada foi administrada em 40 pacientes (33 receptores de rim e 7 receptores de fígado) e a dose padrão em 39 pacientes (30 receptores de rim e 9 receptores de fígado). As cepas componentes da vacina foram A/Califórnia/7/2009(H1N1)pdm09, A/Texas/50/2012(H3N2) e B/Massachusetts/2/2012. Coletou-se sangue antes da vacinação, duas semanas, quatro semanas e 24 semanas após vacinação e, neste estudo, avaliou-se eventos adversos uma, duas, quatro e 24 semanas após a vacinação, com anotação em diário de eventos adversos ocorridos nos três primeiros dias. Durante as 24 semanas de seguimento, avaliou-se a incidência de influenza e rejeição aguda. As características basais foram homogêneas entre os grupos. Em relação ao desfecho primário, observou-se um aumento não significativo na probabilidade de soroconversão a pelo menos um antígeno vacinal com a dose dobrada da vacina. As taxas foram 40% e 25,64% duas semanas ($p=0,174$) e 40% e 28,21% quatro semanas ($p=0,269$) após a

vacinação, no grupo da dose dobrada e dose padrão da vacina respectivamente. As taxas de soroconversão global duas semanas após a vacinação foram baixas nos dois grupos: 21,52% para A/H1N1, 26,58% para A/H3N2 e 13,9% para Influenza B. Não houve diferença nas taxas de soroconversão a cada antígeno vacinal entre os dois grupos. Observou-se uma tendência de melhor MGT para todos os antígenos vacinais com a dose dobrada da vacina do que a dose padrão, embora sem significância. Em relação às taxas de soroproteção global, os dois grupos apresentaram aumento significativo após a vacinação: A/H1N1 - 54,43% para 84,41%; A/H3N2 - 68,35% para 96,20%; e Influenza B - 60,76% - 88,61%, com $p < 0,001$ para todos os antígenos virais. As taxas de soroproteção a pelo menos um antígeno vacinal no grupo da dose dobrada e da dose padrão da vacina foram 82,5% versus 64,1% duas semanas pós-vacinação ($p = 0,064$) e 87,5% versus 69,2% quatro semanas pós-vacinação ($p = 0,048$), respectivamente. As taxas de soroproteção seis meses após a vacinação foram de 70% para todos os antígenos vacinais em ambos os grupos. Encontrou-se associação independente entre vacinação em até dois anos pós-transplante com pior resposta vacinal ($OR = 0,31$; $IC_{95\%} = 0,10-0,89$; $p = 0,03$). Na análise univariada, não houve associação entre a dose dobrada da vacina e resposta vacinal ($OR = 1,93$; $IC_{95\%} = 0,74-5,04$; $p = 0,177$). Outros fatores como idade, sexo, ter recebido transplante de rim, uso de ATG, uso de micofenolato também não tiveram associação com a resposta vacinal. Os eventos adversos foram majoritariamente leves nos dois grupos e não houve nenhum evento adverso sério relacionada à vacina. Encontrou-se tendência de maior incidência de eventos adversos locais no grupo da dose dobrada em relação ao grupo da dose padrão da vacina, sem significância (50% versus 35,9% $p = 0,258$). Um participante que recebeu a dose dobrada da vacina teve influenza A/H3N2 confirmada seis semanas após a vacinação. Verificou-se que este participante não havia soroconvertido, mas era soroprotegido com títulos baixos de anticorpos de 1:40 nas medidas de duas, quatro e seis meses pós-vacinação(85).

Dose quadruplicada

Um estudo canadense por Natori et al., publicado em 2018, avaliou a imunogenicidade e segurança da dose quadruplicada da vacina de influenza trivalente em pacientes TOS. Os autores conduziram um ensaio clínico randomizado duplo-cego comparando o desempenho da dose quadruplicada (60 mcg de HA) e da dose padrão (15 mcg de HA) da vacina de influenza trivalente do ano 2016/2017, com medida de desfechos de imunogenicidade quatro semanas após a vacinação e tempo de seguimento de seis meses. Foram incluídos 172 participantes: 67 transplante renal, 38 transplante de fígado, 25 transplante de pulmão, 23 transplante de coração e 19 transplantes duplo. Foram randomizados 87 participantes para dose quadruplicada e 85 para dose padrão da vacina. Não houve diferença na distribuição de características demográficas e clínicas, incluindo a prevalência de vacinação no ano anterior, esquema de imunossupressão e tipo de órgão transplantado entre os dois grupos. Excluí-se 11 participantes da análise de imunogenicidade, 10 por não ter amostra de soro coletada e um por quadro de influenza antes da coleta. Em relação às taxas de soroconversão a pelo menos um antígeno vacinal, o grupo que recebeu a dose quadruplicada da vacina apresentou taxas significativamente maiores quando comparado ao grupo da dose padrão da vacina: 40,5% versus 20,8% para A/H1N1 ($p=0,007$), 57,1 versus 32,5% para A/H3N2 ($p=0,002$) e 58,3% versus 41,6% para Influenza B ($p=0,033$). As MGT e RMG para todos os três antígenos também foram significativamente maiores no grupo que recebeu a dose quadruplicada da vacina. As taxas de soroproteção antes da vacinação foram semelhantes entre os grupos, 41,7% a 76,2% para o grupo da dose quadruplicada e 55,8% a 75,3% para o grupo da dose padrão da vacina. Não houve diferença nas taxas de soroproteção após a vacinação entre os dois grupos, tendo variado de 74% a 94%. Na análise multivariada, encontrou-se associação entre doses $< 2g$ de micofenolato ($OR=2,76$; $IC95\%=1,12 - 6,76$; $p=0,027$) e dose quadruplicada da vacina ($OR=3,23$; $IC95\%=1,56 - 6,67$; $p=0,002$) e maior probabilidade de soroconversão. Não houve diferença significativa nas taxas de soroproteção entre os grupos. Outros fatores como idade ≥ 65 anos, sexo, rejeição e

vacinação prévias, uso de azatioprina, sirolimus, prednisona e inibidor de calcineurina, uso de ATG, transplante de pulmão e tempo pós-transplante não tiveram associação com a resposta vacinal. Os autores atribuíram a falta de associação entre tempo pós-transplante e transplante de pulmão com resposta vacinal ao pequeno número de participantes com estas características, apenas 14,5% com transplante de pulmão e 9,3% com tempo pós-transplante abaixo de 6 meses. Eles demonstraram que a utilização do dose alta da vacina pode estimular inclusive imunidade heteróloga uma vez que verificaram maiores taxas de indivíduos com anticorpos neutralizantes para uma cepa de Influenza B não incluída na vacina trivalente do estudo. A avaliação de segurança ocorreu durante sete dias após a vacinação, sem diferença significativa na incidência de eventos adversos locais e febre entre os grupos. No entanto, os autores relataram tendência de maior frequência de eventos adversos sistêmicos como artralgia, fadiga e queixas gastrointestinais no grupo da dose quadruplicada da vacina ($p=0,25$). Durante seis meses de seguimento, ocorreram 15 internações no grupo da dose quadruplicada e oito internações no grupo da dose padrão da vacina ($p=0,12$) e nenhuma foi relacionada à vacina. Documentou-se quatro casos de rejeição do enxerto por biópsia, três no grupo da dose quadruplicada e um no grupo da dose padrão da vacina ($p=0,62$). Diagnóstico confirmado de influenza foi realizado para um participante (1,1%) do grupo da dose quadruplicada e dois participantes (2,4%) do grupo da dose padrão da vacina ($p=0,62$). O participante do grupo da dose quadruplicada da vacina teve influenza por A/H3N2 67 dias pós-vacinação e havia apresentado soroproteção adequada na avaliação quatro semanas após a vacinação. No grupo da dose padrão da vacina, um dos participantes teve influenza por A/H3N2 oito dias após a vacinação; já o outro teve influenza por A/H1N1 87 dias pós-vacinação e este não havia títulos protetores de anticorpos na avaliação quatro semanas após a vacinação(84).

Entre outubro de 2013 e dezembro de 2016, conduziu-se um ensaio clínico exploratório de fase IV nos EUA comparando a segurança e imunogenicidade da Fluzone e a Fluzone de alta dose em pacientes TOS receptores de rim, pulmão e coração, com seguimento destes até 3 meses pós-vacinação, mas os resultados ainda não foram publicados.(102) Outro ensaio

clínico iniciado em setembro de 2012 nos EUA para comparar a Fluzone e a Fluzone de alta dose em população de imunodeprimidos com idade entre 5 e 35 anos foi concluído em setembro de 2017, mas ainda não foi publicado. A população avaliada neste estudo é composta por receptores de rim, fígado, coração, portadores de doenças reumatológicas, pessoas vivendo com HIV, transplantados de células tronco hematopoiéticas e pacientes sob diálise(103).

Dois estudos em imunodeprimidos com doenças onco-hematológicas também sugerem superioridade da dose quadruplicada da vacina de influenza. Ambos os estudos compararam as vacinas *Fluzone* de dose padrão e *Fluzone* de alta dose da Sanofi Pasteur(100,101).

No ensaio clínico duplo cego de Halasa et al. foram 15 indivíduos no grupo da dose padrão e 29 indivíduos no grupo da dose quadruplicada. Todos os participantes recrutados tinham mais de 6 meses de tempo pós-transplante. As características demográficas e clínicas foram semelhantes entre os grupos, exceto por mediana de títulos de IgG que era significativamente maior no grupo da alta dose em relação ao grupo da dose padrão da vacina, 676 mg/dl versus 469 mg/dl, respectivamente ($p=0,025$). A avaliação de imunogenicidade ocorreu quatro a 12 semanas após a vacinação. As MGT pré-vacinação foram semelhantes entre os dois grupos, já as MGT após a vacinação foram maiores no grupo que recebeu a dose alta da vacina para a cepa A/H1N1 e A/H3N2 comparado ao grupo controle, com significância estatística para A/H3N2. O grupo que recebeu a dose alta da vacina teve maior taxa de soroproteção para A/H3N2 do que o grupo da dose padrão da vacina, 81% versus 36%, respectivamente ($p=0,004$). A alta dose da vacina teve registro significativamente maior de reações locais, a maioria de intensidade leve. As frequências das reações locais foram 67% no grupo da alta dose e 31% no grupo controle ($p=0,033$). Não houve diferença na ocorrência de eventos sistêmicos e eventos adversos não solicitados. Concluiu-se que possivelmente a alta dose da vacina é superior a dose padrão, mas com necessidade de estudos adicionais uma vez que a superioridade na soroconversão e soroproteção não permaneceu após ajustes por títulos de IgG e CD19(101).

No ensaio clínico duplo cego conduzido por Jamshed et al. foram 51 indivíduos no braço da dose padrão e 54 no braço da dose alta. O desfecho principal foi a MGT medida quatro semanas após a vacinação, e as taxas de soroconversão e soroproteção foram desfechos secundários. As MGT na pré-vacinação foram semelhantes entre os dois grupos, já na avaliação pós-vacinação os títulos foram maiores no grupo da alta dose da vacina para todos os antígenos vacinais do que no grupo controle, com significância para as cepas A/H3N2 e Influenza B. As taxas de soroconversão tiveram aumentos absolutos de 26% para A/H1N1, 22% para A/H3N2 e 36% para Influenza B com a alta dose em relação à dose padrão da vacina. Não houve diferença nas taxas de soroproteção após a vacinação. As taxas de soroproteção no grupo da dose padrão e alta dose foram, 90% versus 96% para A/H1N1, 96% versus 96% para A/H3N2, e 72% versus 88% para Influenza B, respectivamente. Neste estudo não foram investigados os fatores associados à resposta vacinal. Em relação à segurança de alta dose da vacina, dor no local da administração da vacina foi a reação adversa mais comum, ocorrendo com maior frequência no grupo que recebeu a dose alta (32%) do que no grupo da dose padrão (22%), sem significância ($P = 0.36$). Eventos adversos sistêmicos solicitados também foram mais frequentes no grupo da dose alta do que no grupo controle (52% vs 44%). Referente aos eventos adversos não solicitados, as queixas de fadiga, náusea e vômitos foram semelhantes nos dois grupos e são sintomas frequentes em pacientes recebendo quimioterapia(100).

A Tabela 3 apresenta o resumo dos estudos que avaliaram resposta vacinal à alta dose da vacina em indivíduos imunodeprimidos, particularmente nos transplantados renais.

Tabela 3 - Ensaios clínicos randomizados e controlados avaliando resposta à alta dose da vacina em imunodeprimidos

Autor e país	Tipo de Vacina	População	Desfechos Imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Mombelli M et al., 2018 Suiça	Trivalente inativada 2014/2015	79 receptores TOS (63 Tx renal; 16 Tx hepático) 39 DD X 40 DP	Coleta de sangue: D0, D14, D28 e D180 Soroconversão global D14: DD 40% X DP 25,6% (p=0,174) H1N1 - DD 20,0% X DP 23,8% (p=0,74) H3N2 - DD 32,5% X DP 20,5% (p=0,23) Influenza B - DD 20,0% X DP 7,69% (p=0,11) Soroconversão global D28: DD 40% X DP 28,21 (p=0,269) Soroproteção basal: A/H1N1 - 54,43% X A/H3N2 – 68,35% X Influenza B – 60,76% Soroproteção global D14: DD 82,5% X DP 64,1% Soroproteção global D28: DD 87,5% X DP 69,2% (p=0,048)	Tempo pós-transplante < 2 anos (OR=0,31; IC95%=0,10-0,89; p=0,03). Dose dobrada da vacina (OR=1,93; IC95%=0,74-5,04; p=0,177).
Natori Y et al., 2018 Canadá	Trivalente inativada 2016/2017	172 receptores TOS: 67 Tx renal, 38 Tx de fígado, 25 Tx de pulmão, 23 Tx de coração e 19 Tx duplo. 87 DQ X 85 DP	Coleta de sangue: D0 e D28 Soroconversão global D28: H1N1 - DQ 40,5% X DP 20,8% (p=0,007) H3N2 - DQ 57,1 X DP 32,5% (p=0,002) Influenza B - DQ 58,3% X DP 41,6% (p=0,033) RMG e MGT: Maior DQ para 3 vírus Soroproteção global D28: DQ 41,7% a 76,2% X DP 55,8% a 75,3% H1N1 - DQ 83,3% X DP 83,1% (p=0,97) H3N2 - DQ 79,8 X DP 74% (p=0,39) Influenza B - DQ 94,0% X DP 90,9% (p=0,55)	Micofenolato < 2g de (OR=2,76; IC95%=1,12 – 6,76; p=0,027) Dose quadruplicada da vacina (OR=3,23; IC95%=1,56 – 6,67;p=0,002)

Tabela 3 - conclusão

Autor e país	Tipo de Vacina	População	Desfechos Imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Halasa NB et al., 2015	Trivalente inativada	44 Receptores de TCTH alogênico:	Coleta de sangue: D0, D28 e D84 Soroconversão D28 H1N1 – DQ 50% X DP 36% (p=0,39) H3N2 – DQ 42% X DP 36% (p=0,72) Influenza B – DQ 42% X DP 43% (p=0,94) RMG: Maior DQ H1N1; Maior DQ H3N2, (p<0,05)	Não investigados
EUA	2010/2011 e 2011/2012	29 DQ x 15 DP	Soroproteção D28 H1N1 – DQ 69% X DP 57% (p=0,45) H3N2 – DQ 81% X DP 36% (p=0,04) Influenza B – DQ 42% X 43% (p=0,97) Semelhantes após ajuste níveis IgG e CD19	
Jamshed S et al., 2016	Trivalente inativada	105 Portadores de neoplasias sólidos e hematológicos	Coleta de sangue: D0 e D28 Soroconversão D28 H1N1 – DQ 72% x DP 46% (p=0,014) H3N2 – DQ 80% X DP 58% (p=0,029) Influenza B – DQ 80% X DP 44% (p=0,0004) RMG: Maior DQ H3N2 e Influenza B (p<=0,005 e p=0,02)	Não investigados
EUA	2012/2013 e 2013/2014	54 DQ X 51 DP	Soroproteção D28: H1N1 – DQ 96% X DP 90% (p=0,23) H3N2 – DQ 96% X DP 96% (p=1,0) Influenza B – DQ 88% X DP 72% (p=0,17)	

DD - dose dobrada; DP - dose padrão; DQ – dose quadruplicada; TCTH – transplante de células troncos hematopoiéticos; TOS – transplante de órgão sólido.

2.15.3 Dose de reforço

A administração de uma dose de reforço da vacina de influenza, de quatro a dez semanas, após a primeira dose é recomendada pelo CDC para a vacinação de crianças sem histórico de vacinação prévia(64). Em transplantados renais, Smith et al. recorreram a dose de reforço na tentativa de imunização de indivíduos não respondedores a uma primeira dose de vacina trivalente em 1994. Houve aumento na resposta que embora não significativo demonstrou benefício referente ao aumento da chance de proteção(96). Esta estratégia tem sido cada vez mais avaliada em estudos de vacinação em adultos imunodeprimidos, embora com variação nos intervalos entre as duas doses da vacina(55,72,104–106).

Vacina monovalente

Em 2009, Quintana et al. avaliaram a resposta imunológica à dose de reforço da vacina A/H1N1pdm09 adjuvantada ASO3 em 151 pacientes com condições renais: 58 pacientes sob hemodiálise, 52 transplantados renais, 14 pacientes sob diálise peritoneal e 27 pacientes com insuficiência renal não dialítica. Todos os participantes receberam duas doses da vacina, com administração da dose de reforço 21 dias após a primeira dose da vacina. As coletas de sangue para foram realizadas antes da vacinação (D0), 21 dias após a primeira dose da vacina antes da administração da dose de reforço (D21), e novamente 21 dias após a dose de reforço da vacina (D42). O tempo de seguimento foi de seis meses (D182). Apenas 33 de 151 pacientes apresentavam títulos de anticorpos em níveis protetores antes da vacinação. No D21, a taxa de soroconversão global foi 69,8%, sendo 79,6% nos pacientes sob hemodiálise, 55,8% nos transplantados renais, 80% nos pacientes com insuficiência renal não dialítica e 55,6% nos pacientes sob diálise peritoneal ($p=0,04$). As taxas de soroproteção foram 74,1% nos pacientes sob hemodiálise, 62,8% nos transplantados renais, 85% nos pacientes com insuficiência renal não dialítica e 88,9% nos pacientes sob diálise peritoneal ($p=0,17$). No D42, avaliação de imunogenicidade após a dose de reforço da

vacina mostrou aumento nas taxas de soroconversão. A taxa global foi 77,1%, sendo 80% nos pacientes sob hemodiálise, 64,9% nos transplantados renais, 100% nos pacientes com insuficiência renal não dialítica e 71,4% nos pacientes sob diálise peritoneal ($p=0,041$). As taxas de soroproteção foram 80% nos pacientes sob hemodiálise, 67,7% nos transplantados renais, 100% nos pacientes com insuficiência renal não dialítica e 100% nos pacientes sob diálise peritoneal ($p=0,02$). Os resultados mostram a heterogeneidade da resposta nas quatro condições renais, com piora resposta vacinal no grupo dos transplantados renais, o único grupo que não atingiu os critérios da EMA para soroproteção. Na avaliação de fatores associados à resposta vacinal, idade, sexo, diabetes mellitus, proteína sérica, hemoglobina, hormônio paratireodiano e estado sorológico para HIV não tiveram associação com soroconversão nos quatro grupos. Entre transplantados renais tempo pós-transplante, proteinúria, proteínas sérica, hemoglobina e PTH não tiveram associação com soroconversão. Atribui-se a menor taxa de soroconversão nos transplantados renais ao efeito da imunossupressão tripla com micofenolato, inibidor de calcineurina e corticoesteróide uma vez que nestes indivíduos a taxa de soroconversão foi de 35,3% comparado as taxas em indivíduos com imunossupressão dupla, 83,3% em usuários de micofenolato e inibidor de mTOR, 71,4% em usuários de micofenolato e inibidor de calcineurina e 87,5% em em usuários de monoterapia com inibidor de calcineurina ou de mTOR ($p=0,02$). A vacina foi segura e não houve casos de rejeição aguda do enxerto durante seis meses de seguimento(105).

Em 2009, um estudo Sueco por Felldin et al. comparou a imunogenicidade da dose de reforço da vacina A/H1N1pdm09 adjuvantada ASO3 em 28 adultos sadios e 82 TOS (49 transplantados de rim, 17 de fígado, sete de coração, dois de pulmão e oito com transplante misto rim-coração ou pulmão-fígado). A conduta de administração da dose de reforço três semanas após a primeira dose foi definida pela Comitê de Saúde para a população de alto risco incluindo os imunodeprimidos. No estudo administrou-se a dose de reforço da vacina três a quatro semanas após a primeira. Coletou-se amostras de sangue para avaliação da imunogenicidade três a quatro semanas após a primeira e segunda vacinação. Houve aumento das taxas de soroproteção

após a dose de reforço em ambos os grupos. Após a primeira dose, a taxa de soroproteção foi de 69% nos transplantados e 96% nos controles ($p=0,006$), aumentando para 80% e 100% após a dose de reforço, respectivamente ($p=0,003$). Após a primeira dose da vacina, 100% dos controles e 77% dos transplantados apresentaram soroconversão ($p=0,005$). Após a dose de reforço, a taxa de soroconversão aumentou para 81% entre os transplantados. Entre os 13 indivíduos não respondedores, 92% (12 de 13) recebia a imunossupressão tripla comparado a 35% (24 de 69) dos respondedores. Os não respondedores eram mais velhos em relação aos respondedores, com idade média de 61 e 54 anos, respectivamente. Transplantados com TFG < 30 ml/min tiveram menor proporção de soroproteção (61% versus 87%) e soroconversão (67% versus 85%) do que os com TFG $\geq$ 30 ml/min ($p=0,16$). Ocorreu um evento adverso sério de surdez sensorineural de início súbito sete dias após a vacinação em idoso de 73 anos de idade que já apresentava disfunção auditiva. Não houve rejeição aguda durante um ano de seguimento apesar da vacina ser adjuvantada. Os autores recomendaram este esquema de imunização entre os transplantados uma vez que foi seguro, eficaz e aumentou a chance de proteção(72).

Le Corre et al. investigaram a imunogenicidade e segurança da dose de reforço da vacina A/H1N1pdm09 não adjuvantada em 121 transplantados renais em uso de imunossupressão tripla. As doses de vacina foram aplicadas no D0 e D21 e a imunogenicidade foi avaliada no D21, D42 e D182 semelhante ao estudo de Quintana et al. Além da avaliação da resposta imune humoral, avaliou-se a resposta celular T mediada em subpopulação de 29 participantes. Adicionalmente, avaliou-se anticorpos contra HLA do doador no D0 e D42. As taxas de soroproteção foram de 19%, 53%, 60% e 56% no D0, D21, D42, D182 ($p=0,013$). As taxas de soroconversão foram de 24% após a primeira dose e 32% após a dose de reforço da vacina, e as RMG correspondentes foram 3,7 e 4,6 no D21 e D42, respectivamente. Onze participantes não protegidos no D21 obtiveram títulos soroprotetores após a dose de reforço da vacina no D42. As taxas de soroproteção melhoraram com a dose de reforço da vacina, mas não atingiram as recomendações da EMA para adultos abaixo de 60 anos de idade. De fato, os resultados foram semelhantes a níveis de soroproteção observados

em indivíduos idosos sem fatores de imunossupressão. Sexo, tempo pós-transplante e nefropatia diabética não foram associados à soroproteção. Encontrou-se associação significativa de maior idade (≥ 50 anos) com menor taxa soroproteção. Em relação à resposta celular, observou-se baixa reatividade de linfócitos T que não aumentou com a dose de reforço. Não houve correlação dos achados da imunidade celular com a humoral. Não houve rejeição ou alteração dos anticorpos contra o antígeno leucocitário humano do doador (anticorpos anti-HLA). A reação adversa local mais comum foi dor. Astenia e cefaleia foram as reações sistêmicas mais reportadas. Os 15 eventos adversos sérios no seguimento não foram relacionados à vacina(106).

Vacina trivalente

O TRANSGRIPE, estudo multicêntrico conduzido por Cordero et al. em 2012, é o maior ensaio clínico randomizado avaliando a imunogenicidade e segurança da dose de reforço em relação à dose padrão da vacina trivalente não-adjuvantada. A população do estudo foi composta por 499 receptores de TOS (184 receptores de rim, 159 de fígado, 61 de coração e 20 de pulmão) recrutados em 12 hospitais Espanhóis. A dose de reforço da vacina foi administrada cinco semanas após a primeira. O tempo de seguimento foi de 12 meses com avaliações de imunogenicidade antes da vacinação, 10 semanas após a primeira dose da vacina e 12 meses após a conclusão do esquema vacinal alocado. Avaliaram como desfecho primário as taxas de soroconversão, e secundários as taxas de soroproteção e as MGT. Realizaram uma análise ITT modificada após exclusão de um centro das análises por altíssimo número de perdas de seguimento. Na avaliação das características basais, apenas observou-se maior uso de tacrolimus no grupo controle em relação ao grupo experimental, 80,3% versus 71,1% com $p=0,027$. Na análise ITT modificada, a dose de reforço da vacina apresentou associação com soroconversão para A/H1N1 que não se manteve após ajuste para confundidores como idade, sexo, tempo pós-transplante, tipo de órgão transplantado, uso de dose alta de micofenolato, uso de tacrolimus, vacinação prévia e uso de estatinas. Na análise PP, a dose de reforço teve associação

independente com soroconversão com taxas acima de 40% para todos os antígenos vacinais. O número necessário para vacinar foi de sete pacientes. No grupo controle que recebeu a dose padrão da vacina, a taxa de soroconversão foi maior que 40% apenas para o vírus Influenza B. Em relação à soroproteção, na análise ITT modificada, as taxas foram significativamente maiores no grupo da dose de reforço da vacina quando comparado ao grupo controle para todos os antígenos vacinais. As taxas foram 54% e 43,2% para A/H1N1 ; 56,9% e 45,5% para A/H3N2; e 83,4% e 71,8% para Influenza B, respectivamente. As taxas de soroproteção a pelo menos um antígeno vacinal (86,3% versus 75,6%; OR=1,92; IC95%=1,14-3,18; p=0,014) ou dois antígenos vacinais (70,6% versus 53,5%; OR=2,26; IC95%=1,49-3,45; p<0,001) também foram maiores no grupo da dose de reforço do que no grupo controle. Na análise por protocolo, a dose de reforço foi independentemente associada com soroproteção às três cepas vacinais. Apenas a dose de reforço da vacina resultou em taxas de soroconversão e soroproteção compatíveis com os critérios da EMA a pelo menos um ou dois antígenos vacinais. Não houve diferença na avaliação de todos os desfechos 12 meses após a vacinação. A incidência de influenza e eventos adversos foi semelhante nos dois grupos(55).

Um estudo por Karras et al. em imunodeprimidos TCTH não mostrou benefício da dose de reforço da vacina trivalente. Foram avaliados 65 pacientes com pelo menos 60 dias após TCTH alogênico. Um grupo de 33 pacientes recebeu uma dose padrão da vacina enquanto que o outro grupo com 32 pacientes recebeu uma dose adicional de reforço. Não houve diferença nas respostas vacinais. Neste estudo, a dose de reforço da vacina não aumentou a resposta imune celular ou humoral. No entanto, pacientes com tempo de transplante maior do que um ano tiveram melhor resposta vacinal(104).

A Tabela 4 apresenta o resumo dos estudos que avaliaram resposta vacinal à dose de reforço da vacina de influenza em indivíduos imunodeprimidos, particularmente nos transplantados renais.

Tabela 4 - Estudos avaliando resposta à dose de reforço da vacina em imunodeprimidos

Autor e país	Tipo de Vacina	População	Desfechos imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Quintana LF et al., 2013 Espanhã	Monovalente A/H1N1pdm09, inativada, adjuvantada ASO3 Novembro a dezembro 2009	151 pacientes: 58 HD 14 diálise peritoneal 52 TR 27 DRC (todos DR)	Coleta de sangue: D0, D21, D42, D182 Soroconversão global: D21 X D42 69,8% X 77,1% Soroconversão D21 X D42: HD – 79,6% X 80% Dialise peritoneal – 55,6% X 71,4% TR – 55,8 X 64,9% DRC – 80% X 100% (p<0,05) Soroproteção D21 X D42: HD – 74,1% X 80% Dialise peritoneal – 88,9% X 100% TR – 62,8 X 67,7% DRC – 85% X 100% (p<0,05)	Imunossupressão tripla (p=0,02).
Felldin M et al., 2012 Suécia	Monovalente A/H1N1pdm09, inativada, Adjuvantada ASO3 Outubro a novembro 2009	82 receptores TOS 28 adultos sadios (todos DR)	Coleta de sangue: D0, D21-28, D42-49 Soroconversão: D21: TOS 77% X AS 100% (p=0,005) D42: TOS 81% X AS 100% Soroproteção: D21: TOS 69% X AS 96% (p=0,006) D42: TOS 80% X AS 100% (p=0,003)	Imunossupressão tripla Idade maior TFG < 30 (p<0,05)

Tabela 4 - continuação...

Autor e país	Tipo de Vacina	População	Desfechos imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Le Corre N et al., 2012 França	Monovalente A/H1N1pdm09, inativada, não-adjuvantada Novembro a dezembro 2009	121 TR (todos DR)	Coleta de sangue: D0, D21, D42, D182 Soroconversão: D21: 24% - D42: 32% - D182: 30% Soroproteção: D0: 16-23% - D21: 53% - D42: 60% (p<0,0001) - D182: 56% RMG: D21: 3,7 (p<0,001) - D42: 4,6 (p<0,001) - D182: 4,0	Idade ≥50 anos menor sororoteção (p< 0,05)
Cordero E et al., 2017 Espanha	Trivalente inativada 2012	499 receptores TOS 184 rim, 159 fígado 61 coração 20 pulmão (247 DR X 252 DP)	Coleta de sangue: D0, D70, D360 Soroconversão D70 H1N1: DP 32,7% X DR 46,7% (OR=1,81; IC95%=1,009-3,24) H3N2: DP 30,2% X DR 39,1% (OR=1,49; IC95%=0,87-2,54) Influenza B: DP 63,9% X DR 75,9% (OR=1,78; IC95%=0,90-3,50) Soroproteção H1N1: DP 43,2% X 54% DR (OR=1,54; IC95%=1,05–2,27; p=0,026) H3N2: DP 45,5% X DR 56,9%	Tempo pós-transplante (OR=4,17; IC95%=1,24–14,09) Dose reforço Títulos pré-vacinação >1:40 Vacinação prévia (OR=0,47 0,24 - 0,94) Tx coração (OR=0,32; IC95%=0,11–0,93)

Tabela 4 - conclusão

Autor e país	Tipo de Vacina	População	Desfechos imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Cordero E et al., 2017	Trivalente inativada	499 receptores TOS 184 rim, 159 fígado 61 coração 20 pulmão	(OR=1,58; IC95%=1,08–2,31; p=0,020) Influenza B: DP 71,8% X DR 83,4% (OR=1,97; IC95%=1,23–3,16; p=0,004)	Tx renal (OR=0,32; IC95%= 0,16–0,62)
Espanha	2012	(247 DR X 252 DP)		
Karras NA et al., 2013	Trivalente inativada	65 TCTH alogênico:	Coleta de sangue: D0, D28. D56	Tempo pós-transplante > 1 ano (RR=15,5; IC95%=3,2–76; p<0,01 para 3 cepas)
EUA	setembro 2010 a fevereiro 2011	32 DR X 33 DP	Soroconversão: D56 H1N1 – DR 31% x DP 31% (P=0,91) H3N2 – DR 22% X DP 13% (P=0,32) Influenza B – DR 25% X DP 16% (p=0,55)	Fonte de CTH compatível (p=0,04 para H3N2)
			Soroproteção: D56 H1N1 – DR 32% X DP 32% H3N2 – DR 19% X DP 19% Influenza B – DR 23% X DP 32% (semelhante)	Alto número Ly B (p<0,05)

AS – adultos saudáveis; DP - dose padrão; DR - dose de reforço; DRC – doença renal crônica; HD – hemodiálise; TCTH – transplante de células troncos hematopoiéticas; TOS – transplante de órgão sólido; TR – transplantados renais; Tx – transplante; TFG - taxa de filtração glomerular.

2.15.4 Administração intradérmica da vacina

Em geral, os estudos avaliando a aplicação intradérmica da vacina em imunodeprimidos são escassos(87,107,108).

Um estudo francês por Morelon et al. avaliou a segurança e imunogenicidade da aplicação intradérmica da vacina trivalente inativada de 2007/2008 em 62 indivíduos transplantados renais não respondedores a vacinação prévia aplicada por via intramuscular ou subcutânea. As doses antigênicas das vacinas aplicadas via intradérmica, intramuscular ou subcutâneo foram semelhantes. Foi um estudo descritivo com 31 transplantados renais em cada braço. Os resultados mostraram maiores taxas de resposta imunológica contra todas as três cepas virais com a aplicação intradérmica do que com a aplicação intramuscular ou subcutâneo. Embora haja necessidade de mais estudos sobre essa estratégia vacinal, os autores sugeriram que a aplicação intradérmica da vacina pudesse oferecer maior imunogenicidade e proteção aos indivíduos com resposta subótima a vacina aplicada através das vias convencionais(108).

Um estudo canadense por Baluch et al. avaliou a segurança e imunogenicidade da administração intradérmica (18µg) e da administração intramuscular (15µg) da vacina de influenza sazonal do ano 2010 em 229 receptores de TOS, 114 randomizados para administração intradérmica (43 rim, 38 pulmão, 13 figado, 11 coração e 9 rim/pâncreas) e 115 para a administração intramuscular (51 rim, 36 pulmão, 13 figado, 7 coração e 8 rim/pâncreas). Na análise por intenção de tratar (ITT), a taxa de soroconversão a pelo menos um antígeno vacinal foi 48,2% e 42,6% no grupo de administração intradérmica e intramuscular, respectivamente ($p=0,47$). Na análise por protocolo (PP), foram avaliados 212 indivíduos que tinham as medidas de títulos de anticorpos na avaliação pré-vacinação e pós-vacinação, 105 do grupo de administração intradérmica e 107 do grupo de administração intramuscular. A taxa de soroconversão a pelo menos um antígeno vacinal foi 51,4% e 46,7% no grupo de administração intradérmica e intramuscular, respectivamente ($p=0,49$). Também não houve diferença estatística na soroconversão a dois ou três vírus

vacinais. Após exclusão da análise de soroconversão de indivíduos com altos títulos de anticorpo na pré-vacinação, também não foi encontrada diferenças entre os dois grupos. Os receptores de transplante de pulmão tiveram menor taxa de soroconversão em comparação aos outros transplantados (46,7% rim, 75% fígado, 41,7% pulmão e 58,8% coração, $p=0,12$). A taxa de soroproteção para as cepas A/H1N1pdm09, A/H3N2 e Influenza B foram 70,5%, 63,8% e 52,4% no grupo de administração intramuscular e 71,0%, 70,1% e 63,6% no grupo de administração intradérmica, sem significância estatística. Para as cepas A/H1N1pdm09 e Influenza B, a soroproteção foi significativamente maior nos indivíduos com mais de 6 meses de transplante, e o uso de mais de 2g de micofenolato foi associado com menor soroproteção, de maneira dose-dependente. Não foram encontrados fatores associados a soroproteção para a cepa A/H3N2. A administração intradérmica foi associada com maior ocorrência de eventos adversos locais(87).

Uma meta-análise recente do ano 2015, realizada por Pileggi et al., avaliou a segurança e imunogenicidade da administração intramuscular e intradérmica da vacina de influenza sazonal em imunodeprimidos. Não houve diferença entre a imunogenicidade induzida pela vacina intradérmica e intramuscular. A meta-análise por Marra et al. em 2013 que avaliou a segurança e imunogenicidade da administração intramuscular e intradérmica da vacina de influenza sazonal em adultos e idosos saudáveis, 21 a 28 dias após administração intradérmica ou intramuscular da vacina também não encontrou diferença na imunogenicidade. No entanto, percebeu-se uma associação entre maiores doses de vacina intradérmica e melhor imunogenicidade na população idosa ($P=0,01$). Eventos adversos locais e sistêmicos foram semelhantes 3 dias após a vacinação. A administração intradérmica foi associada com maior ocorrência de eventos adversos locais 7 dias após a vacinação(109).

A Tabela 5 apresenta o resumo dos estudos que avaliaram a resposta vacinal à administração intradérmica da vacina de influenza em imunodeprimidos, particularmente transplantados renais.

Tabela 5 - Estudos avaliando resposta à vacinação intradérmica vacina em imunodeprimidos.

Autor e país	Desenho	Tipo de Vacina	População	Desfechos Imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Morelon E et al., 2010 França	Ensaio clínico, randomizado, controlado	Trivalente inativada outubro a novembro 2007	62 TR 31 ID X 31 IM	Soroconversão: H1N1 – 35% ID X 19% IM H3N2 – 35% ID X 19% IM Influenza B – 19% ID X 19% Soroproteção: H1N1 – 71% ID X 52% IM H3N2 – 52% ID X 36% IM Influenza B – 71% ID X 61% IM RMG: H1N1 – 3,09 ID X 1,93 IM H3N2 – 3,50 ID X 2,35 IM Influenza B – 1,96 ID X 1,77 IM	Não investigados
Baluch A et al., 2013 Canadá	Ensaio clínico, randomizado, controlado	Trivalente inativada outubro a dezembro 2010	229 TOS (94 TR; 74 pulmão; 26 fígado e 18 coração) 114 ID X 115 IM	Soroconversão: ITT: 48.2% ID X 42,6% IM (p=0,47) PP: 51.4% ID X 46,7% IM (p=0,49) Soroproteção: H1N1 – 71% ID X 70,5% IM (p=0,93) H3N2 – 70,1% ID X 63,8% IM (p=0,33) Influenza B – 63,6% ID X 52,4% IM (p=0,10)	H1N1: Micofenolato ≥ 2g (p=0,019) Transplante pulmão (p=0,016) Tempo pós-transplante < 6 meses (p=0.013) Influenza B: Micofenolato ≥ 2g (p=0,042) Tempo pós-transplante < 6 meses (p=0.003)

Tabela 5 - conclusão

Autor e país	Desenho	Tipo de Vacina	População	Desfechos Imunológicos	Fatores preditivos de resposta à vacina
Pileggi C et al., 2015	Meta-análise de 6 artigos	Trivalente inativada	Imunodeprimidos 3 estudos – transplantados	Soroconversão: H1N1 – RR 1,00 0.84-1,19 H3N2 – RR 1,08 0.86-1,36	Maior dose ID na população idosa (p=0,01)
Itália		2009 a 2013	1 estudo – tumores sólidos 1 estudo – PVHIV 1 estudo - misto	Influenza B – RR 0,92 0.72-1,17 Soroproteção: H1N1 – RR 1,00 0.91-1,10 H3N2 – RR 1,00 0.90-1,12 Influenza B – RR 0,99 0.84-1,16	

ID – intradérmica; IM – intramuscular; PVHIV – pessoa vivendo com HIV; RR – risco relativo; TOS – transplante de órgão sólido.

2.16 Eficácia e efetividade vacinal

A eficácia vacinal refere-se à capacidade da vacina de prevenir doença clínica ou laboratorialmente confirmada nos vacinados em ensaios clínicos, enquanto efetividade refere-se à capacidade de prevenir doença clínica ou laboratorialmente confirmada em indivíduos vacinados em uma comunidade(49). A determinação mais acurada da eficácia/efetividade das vacinas de influenza é prejudicada pelos desenhos heterogêneos dos estudos e também pela utilização de tipos e cepas vacinais diferentes uma vez que a escolha destes varia conforme o ano e o hemisfério (país) onde estudo é conduzido(110).

Fatores biológicos como a idade e o estado imunológico do indivíduo impactam na eficácia/efetividade da vacina, assim como a compatibilidade antigênica (*match*) entre as cepas vacinais e os vírus circulantes na comunidade(49). As vacinas monovalentes parecem ter maior imunogenicidade e eficácia/efetividade do que as trivalentes(72,105,110–112). Há relatos também da influencia do subtipo viral na eficácia/efetividade vacinal e alguns relataram melhor proteção contra os vírus Influenza B e A/H1N1 do que contra A/H3N2(111,113). Atribui-se a baixa efetividade da vacina sazonal contra A/H3N2 às mutações antigênicas mais dramáticas neste subtipo no período entre a recomendação dos antígenos vacinais pela OMS até a fabricação da vacina(111,114). Conforme previamente citado, o cultivo dos vírus vacinais em ovos de galinha geralmente induz processo adaptativo em todos os subtipos virais e A/H3N2 apresenta maior probabilidade de mutação antigênica comparado ao A/H1N1 e Influenza B(114).

2.16.1 População geral

Estudos conduzidos pelo CDC mostram que em períodos de maior circulação dos vírus sazonais, a vacina oferece uma efetividade contra a doença de 50% a 60% na população geral(113). Crianças e adultos com menos de 65 anos de idade costumam desenvolver altos títulos de anticorpos

após a vacinação de influenza(49), com relatos de eficácia vacinal de até 95% em adultos jovens saudáveis^(71,72). Apesar da imunogenicidade vacinal reduzida em idosos e adultos jovens portadores de doenças crônicas, a eficácia na prevenção de complicações da influenza como internação ou pneumonia varia de 30 a 70%, e a prevenção de óbitos é de aproximadamente 80%. Portanto, recomenda-se a vacinação anual para esta população dado o benefício de redução das complicações(64,117).

Osterholm et al. conduziram uma meta-análise de estudos avaliando a eficácia e efetividade das vacinas contra Influenza na população geral publicados entre janeiro de 1967 e fevereiro de 2011. Para a avaliação da eficácia, foram 17 ensaios clínicos randomizados controlados (7 avaliando a vacina trivalente inativada, 7 avaliando a vacina de vírus atenuado e 3 avaliando ambos os tipos de vacina). Para a avaliação da efetividade, foram 14 estudos observacionais (9 avaliando a vacina de vírus sazonal e 5 avaliando a vacina de vírus pandêmico). Em todos os estudos incluídos, houve confirmação da influenza por RT-PCR ou cultura viral. A vacina trivalente inativada foi eficaz em 8 das 12 estações analisadas (67%), com eficácia de 59% (IC95%=51–67) em adultos entre 18 e 65 anos de idade. A vacina de vírus atenuado foi eficaz em 9 de 12 estações analisadas (75%), com eficácia de 83% (IC95%=69–91) em crianças entre 6 meses e 7 anos de idade. A efetividade da vacina trivalente foi variável, mas 6 de 17 análises (35%) mostraram proteção, enquanto que a efetividade da vacina monovalente A/H1N1pdm09 foi de 69% (IC95%=60-93%)(110).

Belongia et al. conduziram uma revisão sistemática com meta-análise de 56 estudos (*Test-negative design*) publicados entre janeiro de 2004 e março de 2015 avaliando a eficácia e efetividade da vacina de influenza na população geral. Todos os estudos incluídos preencheram os seguintes critérios: descreveram os critérios de definição de doença em pacientes ambulatoriais, utilizaram PCR para confirmação de influenza, avaliaram a efetividade vacinal para cada subtipo viral, citaram a eficácia vacinal para cada subtipo viral no ano do diagnóstico de influenza e fizeram a análise ajustada para a idade. A maioria (80%) dos estudos foram do hemisfério norte. O estudo mais antigo

havia sido publicado em 2007, com 52 (93%) dos estudos publicados após 2010. Os desfechos avaliados foram a comparação das eficácias combinadas da vacina sazonal contra as cepas A/H3N2, A/H1N1pdm09, A/H1N1 (não pandêmico) e Influenza B em relação à eficácia combinada da vacina monovalente contra A/H1N1pdm09. A eficácia combinada das vacinas monovalentes contra A/H1N1pdm09 foi superior à das vacinas sazonais (73%; IC95%=61–81) com as vacinas monovalentes A/H1N1pdm09 adjuvantadas tendo melhor eficácia (79%; IC95%=68–86) quando comparadas às não adjuvantadas (55%; IC95%=28–72). Não houve diferença na eficácia na análise ajustada para idade. Na análise das vacinas sazonais, a eficácia combinada foi menor para A/H3N2 com 33% (IC95%=26–39), com melhor eficácia vacinal contra vírus antígenicamente compatíveis do que contra os variantes do A/H3N2: 33% (IC95%=22–43%) e 23% (IC95%=2–40%), respectivamente. Para o restante das cepas das vacinas sazonais, a eficácia combinada foi de 67% (IC95%=29–85%) para Influenza A/H1N1 (não pandêmico), 61% (IC95%=57–65%) para Influenza A/H1N1pdm09 e 54% (IC95%=46–61) para Influenza B. Em indivíduos acima de 60 anos de idade, a eficácia vacinal combinada foi de 24% (IC95% –6–45%) para A/H3N2, 62% (IC95% 36–78%) para A/H1N1pdm09 e 63% (IC95% 33–79%) para Influenza B(111).

Em uma revisão sistemática que incluiu nove estudos brasileiros, avaliou-se a efetividade da vacina de influenza e as políticas de vacinação em países tropicais e subtropicais. Hirve et al. também encontraram muita variabilidade nos desenhos dos estudos, na população estudada e nas taxas de eficácia/efetividade da vacina em grupos de alto risco entre os países. Relataram uma efetividade vacinal contra influenza confirmada de 0% a 42% em idosos, 20 a 77% em crianças e 50 a 59% em adultos saudáveis. A efetividade vacinal foi menor nos idosos em países tropicais e subtropicais (43 – 58%) quando comparada a efetividade vacinal em idosos na Europa, nos EUA e em outros países desenvolvidos (50 – 77%). Este achado foi atribuído à baixa qualidade dos estudos nas regiões tropicais e subtropicais, onde a maioria dos estudos foi observacional. A vacinação de gestantes preveniu doença em 50% delas e em 49 a 63% de seus bebês com menos de 6 meses de idade. A oferta

gratuita da vacina de influenza foi fator que aumentou a cobertura vacinal, e consequentemente a proteção contra a influenza e suas complicações(112).

2.16.2 Imunodeprimidos

Estudos de eficácia ou efetividade da vacina de influenza em pacientes TOS são escassos, pois a maioria dos estudos de influenza nessa população avaliam como desfecho principal a resposta vacinal com pouca menção da incidência de influenza confirmada ou suspeita(89). Mesmo com menores taxas de resposta vacinal em relação à população geral, tem sido demonstrado benefício da vacina na prevenção de complicações da influenza em imunodeprimido(62,89). Em um estudo observacional que relatou um surto hospitalar de influenza em uma unidade de transplante renal, os pacientes não vacinados tiveram maior incidência de influenza (OR=37,5) e letalidade (OR=6,7) comparado aos vacinados, com significância estatística. Apenas 12% dos vacinados desenvolveram influenza durante o surto e não houve registro de gravidade, enquanto 83% dos não vacinados tiveram influenza com 50% de letalidade(44).

Uma meta-análise de Beck et al. publicada em 2011 avaliou o impacto da vacina de influenza em pacientes com imunodeficiência primária ou secundária, com recomendação de vacinação contra a influenza no Reino Unido e também pelos critérios da OMS. Foram analisados quatro desfechos em paciente imunodeprimidos vacinados em relação a pacientes imunodeprimidos não vacinados e/ou adultos imunocompetentes vacinados. Os desfechos foram: síndrome gripal (*influenza-like illness*), influenza com confirmação laboratorial, resposta imunológica à vacina e eventos adversos. Os 209 estudos incluídos para meta-análise foram heterogêneos em seus desenhos e avaliaram populações muito distintas de imunodeprimidos, incluindo pessoas vivendo com HIV, portadores de neoplasia e receptores de transplante de órgãos. A maior parte dos dados foi coletada de ensaios clínicos controlados não randomizados (137 estudos), seguido de outros estudos clínicos (43 estudos). Foram 25 estudos de resposta vacinal em transplantados renais, sendo o foco principal em todos estes a resposta vacinal e não a eficácia. Aplicou-se as análises de heterogeneidade, valorizando as análises com baixa

heterogeneidade ($I^2 < 40\%$) e descartando as de alta heterogeneidade ($I^2 > 85\%$). Utilizou-se como medida de efeito *odds ratio*(89).

Em relação ao desfecho de síndrome gripal em pacientes imunodeprimidos vacinados comparado aos imunodeprimidos não vacinados, foram analisados sete estudos com baixa heterogeneidade ($I^2 < 22\%$ $p = \text{sem significância}$) e a magnitude de efeito foi de 0,23 (IC95%=0,16 – 0,34; $p < 0,001$). Em relação ao mesmo desfecho em pacientes imunodeprimidos vacinados comparado a adultos imunocompetentes vacinados, foram analisados dois estudos com baixa heterogeneidade ($I^2 < 12,3\%$ $p = ,286$) e a magnitude de efeito foi de 0,62 (IC95%=0,22 – 1,78; $p = \text{NS}$)(89).

Em relação ao desfecho de influenza confirmada, foram avaliados apenas dois estudos e ambos avaliaram influenza em pessoas vivendo com HIV vacinados em relação a outros imunodeprimidos não vacinados. Houve moderada heterogeneidade ($I^2 = 50,4\%$; $p = \text{NS}$) e a magnitude de efeito foi de 0,15 (IC95%=0,03 – 0,63; $p = 0,01$). Embora a resposta vacinal para A/H1N1, 1/H3N2 e Influenza B tenha sido menor em imunodeprimidos quando comparado aos adultos imunocompetentes, os autores apontaram que a vacinação em pacientes imunodeprimidos confere proteção de doença clínica ou laboratorialmente confirmada e favorece políticas nacionais de recomendação da vacina nesta população. Os dados de segurança foram inadequados para meta-análise, mas resultados mostraram que a vacina foi segura e não houve progressão de doença ou evento adverso sério associada à vacina(89).

3 OBJETIVOS

3.1 Primário

- Avaliar a resposta humoral dos receptores de transplante renal à vacina influenza trivalente produzida pelo Instituto Butantan administrada em três esquemas de vacinação: a dose padrão, uma dose dobrada, e em duas doses sequenciais onde uma dose de reforço é administrada após um intervalo de 21 dias em relação à primeira dose.

3.2 Secundário

- Avaliar a segurança da vacina influenza trivalente administrada nos receptores de transplante renal em três esquemas de vacinação: a dose padrão, uma dose dobrada, e em duas doses sequenciais onde a dose de reforço é administrada após um intervalo de 21 dias em relação à primeira dose.

3.3 Exploratórios

- Avaliar os potenciais fatores associados à resposta humoral da vacina influenza trivalente nos receptores de transplante renal.
- Avaliar a incidência de influenza confirmada laboratorialmente em receptores de transplante renal sintomáticos respiratórios no período entre duas e vinte e seis semanas após a administração inicial da vacina influenza trivalente.
- Avaliar a incidência de rejeição do enxerto renal confirmada por meio de biópsia em receptores de transplante renal com deterioração da função renal entre duas e vinte e seis semanas após a administração inicial da vacina influenza trivalente.

4 MÉTODOS

4.1 Desenho

Foi realizado um estudo piloto do tipo ensaio clínico randomizado, controlado e aberto para avaliar a imunogenicidade e segurança da vacina influenza trivalente administrada em três diferentes esquemas de vacinação em receptores de transplante renal. As doses estudadas foram a dose padrão, uma dose dobrada e duas doses sequenciais, sendo a segunda dose de reforço administrada após um intervalo de 21 dias em relação à primeira dose.

Trata-se de um estudo exploratório e prospectivo para avaliar a superioridade de doses alternativas da vacina, mais especificamente a dose dobrada e a dose de reforço, em relação a dose padrão da vacina utilizada na rotina.

4.2 Tamanho amostral

O tamanho amostral dos participantes transplantados renais foi estimado de acordo com os requerimentos do guia da EMA para a avaliação de produtos medicinais que estipula a avaliação de pelo menos 50 indivíduos por grupo para estudos de imunogenicidade e segurança de vacinas de influenza. Contando com possíveis perdas de até 20%, a amostra pretendida foi de 60 para cada grupo do estudo, totalizando 180 participantes(81).

Determinou-se a inclusão de apenas 15 adultos sadios como controles da dose padrão da vacina para minimizar custos uma vez que o foco do estudo eram os três grupos de transplantados renais.

4.3 População

O nosso estudo foi composto por uma população de imunodeprimidos transplantados renais em acompanhamento no STR-HCFMUSP¹ e uma população controle de adultos sadios trabalhadores da saúde no HCFMUSP, com indicação de vacinação contra influenza sazonal no ano de 2014.

¹ O ambulatório do STR é realizado no 5º andar do Prédio dos Ambulatórios de segunda a sexta-feira.

Em relação aos transplantados renais, os participantes em potencial foram triados durante a consulta de rotina e convidados pelo médico assistente do STR-HCFMUSP a participar do estudo. Os pacientes interessados em participar do estudo eram encaminhados ao médico da pesquisa. Os adultos sadios foram abordados e convidados diretamente pelo médico da pesquisa.

Todos os interessados em participar do estudo de ambos os grupos receberam informação detalhada sobre o estudo, esclarecimento de dúvidas e revisão dos critérios de elegibilidade. Todos os participantes elegíveis e recrutados assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para firmar a voluntariedade em participar do estudo antes dos procedimentos adicionais de coleta de sangue, randomização e vacinação. Todos foram informados da possibilidade de retirar o TCLE a qualquer momento sem prejuízo ao seguimento ou tratamento dos transplantados renais. Os modelos de TCLE são apresentados nos apêndices A e B.

A seguir estão apresentados os critérios de elegibilidade para cada grupo.

4.3.1 Transplantados renais

Critérios de Inclusão

1. Transplante renal há mais de 30 dias;
2. Idade entre 18 e 60 anos;
3. Enxerto renal funcional (pacientes sem indicação de diálise no momento, independentemente da taxa de filtração glomerular);
4. Capacidade de compreensão e comprometimento com todos os procedimentos do estudo;
5. Demonstrar interesse em participar do estudo, documentada pela assinatura do TCLE.

Critérios de Exclusão

1. Transplante duplo (outro órgão além do rim);
2. Perda do enxerto (retorno a diálise);

3. Infecção pelo HIV ou doença oncológica;
4. Hipersensibilidade sistêmica conhecida a qualquer componente da vacina, ao timerosal, a neomicina, ao formaldeído, ao Triton-X-100, ao ovo ou a proteína de galinha, a qualquer medicamento ou substância que contenha os mesmos componentes desta vacina ou após a administração prévia deste produto;
5. Qualquer doença aguda e/ou febre nos últimos sete dias antecedentes a inclusão no estudo ou temperatura axilar superior a 37,8°C no dia da vacinação;
6. Ter recebido vacina com vírus vivo nos últimos 28 dias ou vacina com vírus morto nos últimos 14 dias que antecedem a sua inclusão no estudo, ou ainda ter vacinação programada para os primeiros 21 dias após sua inclusão no estudo;
7. Doença comportamental, cognitiva ou psiquiátrica que, na opinião do investigador principal ou seu representante médico, afete a capacidade do participante em potencial em entender e colaborar com as exigências do protocolo do estudo;
8. Utilização de qualquer produto sob investigação nos 42 dias que antecedem a sua inclusão no estudo ou programação para recebê-lo após sua inclusão no estudo;
9. Participação em outro ensaio clínico durante os seis meses antecedentes a sua inclusão no estudo;
10. Qualquer outra condição que, na opinião do investigador principal ou do seu representante médico, possa colocar em risco a segurança ou os direitos de um participante em potencial ou que o impeça de cumprir com este protocolo;

4.3.2 Adultos sadios

Critérios de Inclusão

1. Adultos sadios de ambos os sexos;
2. Idade entre 18 e 59 anos;

3. Capacidade de compreensão e comprometimento com todos os procedimentos do estudo;
4. Demonstrar interesse em participar do estudo, documentada pela assinatura do TCLE.

Crterios de Excluso

1. Evidncia de doena ativa neurolgica, cardaca, pulmonar, heptica ou renal conforme histria clnica, exame fsico e/ou estudos laboratoriais;
2. Doenas com comprometimento do sistema imunolgico inclusive: diabetes mellitus, neoplasias (exceto carcinoma basocelular) e doenas autoimunes;
3. Doena comportamental, cognitiva ou psiquitrica que, na opinio do investigador principal ou seu representante mdico, afete a capacidade do participante em potencial em entender e colaborar com as exigncias do protocolo do estudo;
4. Qualquer utilizao considerada abusiva de lcool ou drogas nos ltimos 12 meses anteriores a sua incluso no estudo que tenha causado problemas mdicos, profissionais ou familiares, como indicado pela histria clnica;
5. Hipersensibilidade sistmica conhecida a qualquer componente da vacina, ao timerosal, a neomicina, ao formaldedo, ao Triton-X-100, ao ovo ou a protena de galinha, a qualquer medicamento ou substncia que contenha os mesmos componentes desta vacina ou aps a administrao prvia deste produto;
6. Diagnstico de asma com histria de internaco hospitalar devido doena nos ltimos seis meses anteriores a sua incluso no estudo;
7. Qualquer doena aguda e/ou febre nos ltimos sete dias antecedentes a incluso no estudo ou temperatura axilar superior a 37,8C no dia da vacinao;
8. Uso de corticoides (excluindo via tpica ou nasal) ou outras drogas imunossupressoras durante os 42 dias anteriores a sua incluso no estudo.

4.4 Randomização

A randomização ocorreu apenas para os participantes transplantados renais. A lista de randomização foi gerada através de um programa de computador por um profissional independente, sem nenhum outro envolvimento com o estudo. Foram preparados dois conjuntos de envelopes selados e sequencialmente numerados de 1 a 180. Os envelopes continham um par de etiquetas com o grupo de vacinação e a dose da vacina a ser aplicada: etiquetas de 0,5 ml (na cor salmão) para os grupos da dose padrão e da dose de reforço e etiquetas de 1 ml (na cor verde) para o grupo da dose dobrada (APÊNDICE C). Em um dos conjuntos, os envelopes foram distribuídos na ordem da randomização pelo subinvestigador para alocação dos participantes aos três grupos de tratamento; o segundo conjunto permaneceu selado no arquivo do patrocinador para posterior conferência e controle de qualidade.

Os transplantados renais elegíveis foram randomizados de forma simples, seguindo a ordem de recrutamento, a receberem a dose padrão, uma dose dobrada ou uma dose de reforço da vacina. A razão de alocação foi de 1:1:1. Para todos os participantes, os envelopes foram abertos após a coleta de sangue e antes do encaminhamento para vacinação no Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais do HCFMUSP (CRIE-HCFMUSP). O participante então recebia uma das etiquetas com o indicativo da dose da vacina a ser administrada para apresentar à equipe do CRIE-HCFMUSP, e a outra etiqueta permanecia no envelope, para o controle da equipe de pesquisa.

O grupo controle de 15 adultos sadios não sofreu randomização uma vez que todos receberiam a dose padrão da vacina. A Tabela 6 mostra um resumo dos quatro grupos de estudo e suas respectivas doses da vacina influenza trivalente do ano 2014.

Tabela 6 - Resumo dos grupos de vacinação com as doses da vacina.

Grupo de vacinação	Participantes (n)	Dose da vacina
Transplantados renais		
Dose padrão	60	0,5 ml
Dose dobrada	60	1 ml
Dose de reforço	60	Duas doses de 0,5 ml com intervalo de 21 dias
Adultos Sadios		
Dose padrão	15	0,5 ml

4.5 Vacinação

Todos os participantes recrutados foram encaminhados ao CRIE-HCFMUSP para administração da vacina de influenza trivalente fragmentada e inativada fabricada pelo Instituto Butantan. A vacina sazonal recomendada pela OMS para o Hemisfério Sul para o ano 2014 continha 15 mcg de hemaglutinina da cepa A/California/7/2009 (H1N1) pandêmica, 15 mcg de hemaglutinina da cepa A/Texas/50/2012 (H3N2) e 15 mcg de hemaglutinina da cepa B/Massachusetts/2/2012. O conservante foi timerosal (2 mcg) e para a reconstituição da vacina foi utilizada solução fisiológica tamponada (0,5 mL). Todas as aplicações foram intramuscular no músculo deltóide conforme o grupo de vacinação e não houve cegamento da dose aplicada. O lote da vacina administrada foi único para todos os participantes (1403015).

4.6 Delineamento do estudo

Foram programadas duas a três visitas ao centro de pesquisa para vacinação, avaliação de segurança e coleta de sangue para a avaliação de imunogenicidade de acordo com o grupo do participante. A figura 3 resume o delineamento do estudo.

DELINEAMENTO DO ESTUDO

Figura 3. Esquema do delineamento do estudo a partir da triagem até fim do estudo.
 AS – adultos sadios; ATR – transplantados renais; DP – dose padrão; DD – dose dobrada; DR – dose de reforço

4.6.1 *Visita de vacinação –Dia 0*

Esta visita foi programada para todos os participantes: os três grupos de transplantados renais e os adultos saudáveis.

Os procedimentos para a visita no D0 foram:

1. Apresentação detalhada do estudo e esclarecimento de dúvidas;
2. Verificação da elegibilidade dos participantes interessados;
3. Assinatura do TCLE após aceite em participar do estudo;
4. Realização de anamnese e exame clínico;
5. Coleta das amostras de sangue:
 - Todos os transplantados renais: 15 ml de sangue para a avaliação de imunogenicidade às cepas da vacina trivalente pré-vacinação, dosagem dos níveis séricos dos imunossupressores, dosagem de testosterona, albumina, ureia, creatinina e hemograma completo.
 - Adultos saudáveis: apenas 5 ml para a avaliação de imunogenicidade às cepas da vacina trivalente pré-vacinação.
6. Entrega do cartão do participante com data da próxima visita e orientação de anotação da temperatura aferida e eventos adversos;
7. Abertura do envelope de randomização imediatamente antes da vacinação;
8. Encaminhamento para vacinação com esquema conforme o grupo de alocação.

4.6.2 *Contato de segurança – Dia 4 após cada vacinação*

Apenas para os grupos de transplantados renais, foram programados contatos telefônicos para avaliação de segurança quatro dias após cada vacinação.

Definiu-se evento adverso como qualquer ocorrência médica desfavorável (sinal, sintoma, doença nova, piora de doença pré-existente ou alteração de exame laboratorial) que ocorresse em participante que recebeu vacina e que não necessariamente tivesse relação causal com a vacina.

Neste contato, aplicou-se questionário específico do estudo com perguntas ativas sobre a ocorrência de determinados eventos adversos locais ou sistêmicos (eventos adversos solicitados) e também coletou-se queixas espontâneas dos participantes (eventos adversos não solicitados). Para o grupo da dose de reforço, esta avaliação ocorreu novamente quatro dias após a segunda vacinação.

Os eventos adversos solicitados foram presença de dor, eritema, edema, induração e/ou equimose no local da administração da vacina, calafrios, febre, cefaléia, mialgia e fadiga.

Todos os eventos adversos foram classificados quanto à sua intensidade e relação causal com a vacina. Em relação à intensidade, as categorias foram: Grau 1 (leve), Grau 2 (moderada), Grau 3 (grave) e Grau 4 (risco à vida). O Apêndice D mostra os eventos adversos solicitados e a classificação de intensidade utilizada.

Eventos adversos com relação causal certa, provável ou possível com a vacinação foram classificados como reações adversas (Apêndice E).

4.6.3 1ª Visita de avaliação de segurança e imunogenicidade da vacina – Dia 21 + 7

Esta visita foi programada para todos os participantes: os três grupos de transplantados renais e os adultos saudáveis.

Os procedimentos para a visita no D21 foram:

1. Recolhimento do cartão do participante;
2. Anamnese e exame clínico com ênfase na ocorrência de eventos adversos;
3. Coleta de 5 ml de sangue para a avaliação de imunogenicidade às cepas da vacina trivalente pós-vacinação;
4. Entrega do cartão do participante com data da próxima visita e orientação de anotação da temperatura aferida e eventos adversos para os transplantados renais do grupo da dose de reforço;

5. Encaminhamento para vacinação dos transplantados renais do grupo da dose de reforço;
6. Entrega do formulário de orientação para reconhecimento de quadro respiratório agudo para os transplantados renais dos grupos de dose padrão e dobrada;
7. Conclusão dos procedimentos do estudo do grupo de adultos saudáveis.

4.6.4 2ª Visita de avaliação de segurança e imunogenicidade da vacina – Dia 42 + 7

Esta visita foi programada apenas para os participantes: transplantados renais do grupo de duas doses sequenciais, para avaliação de segurança e imunogenicidade da vacina após dose de reforço da vacina.

Os procedimentos para a visita no D42 foram:

1. Recolhimento do cartão do participante;
2. Anamnese e exame clínico com ênfase na ocorrência de eventos adversos;
3. Coleta de 5 ml de sangue para a avaliação de imunogenicidade às cepas da vacina trivalente pós-vacinação;
4. Entrega do formulário de orientação para reconhecimento de quadro respiratório agudo

4.6.5 Contato de vigilância de quadro respiratório agudo

Este procedimento foi programado apenas para os participantes: transplantados renais.

Foram programados sete contatos telefônicos de vigilância de influenza (CI1– CI7) com o intuito de buscar ativamente casos sintomáticos respiratórios com quadro agudo suspeitos de influenza entre os participantes transplantados renais. Caso suspeito de influenza foi estabelecido como apresentação de dois ou mais sintomas como tosse, febre, congestão nasal, calafrios, calafriação, mialgia e odinofagia ao longo do seguimento. Os participantes foram informados

que, caso apresentassem os sintomas citados, deveriam procurar o pronto socorro ou o ambulatório para investigação ou entrarem em contato telefônico com médico da pesquisa.

O contato de vigilância foi iniciada duas semanas após a única vacinação para os grupos 1 e 2, ou após a primeira vacinação para o grupo da dose de reforço. A frequência deste contato foi a cada quatro semanas durante vinte e seis semanas de acompanhamento para cada participante. Estipulou-se uma tolerância de até 5 dias a mais para cada tentativa de contato telefônico.

- CI1: D21 +2 semanas(+5d)
- CI2: D21+6 semanas (+5d)
- CI3: D21+10 semanas(+5d)
- CI4: D21+14 semanas(+5d)
- CI5: D21+18 semanas(+5d)
- CI6: D21+22 semanas(+5d)
- CI7: D21+26 semanas(+5d)

Na ocorrência de quadro respiratório agudo, convocou-se o participante para avaliação médica e investigação com radiologia simples do tórax e swab nasal para pesquisa do vírus Influenza pela técnica da RT-PCR realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas, quando indicado pelo médico. O participante com suspeita clínica de influenza recebia tratamento antiviral com oseltamivir 75 mg por dia, até o resultado do exame. Caso o RT-PCR para vírus Influenza fosse negativo, suspendia-se o tratamento assim que obtenção do resultado. Caso o resultado fosse positivo, mantinha-se o tratamento por no mínimo 5 dias, com repetição do teste de RT-PCR a cada cinco dias e suspensão do mesmo após a negatificação do RT-PCR de controle. O RT-PCR de controle era realizado a partir do 5º dia de tratamento.

O material genético extraído para a realização de RT-PCR no Laboratório de Biologia Molecular foi armazenado a -70°C e posteriormente encaminhado ao Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz para a investigação futura de

outros vírus respiratórios (Influenza B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Adenovírus, Rinovírus, Vírus Sincicial Respiratório, Metapneumovírus, Coronavírus e Bocavírus) e a caracterização viral quando confirmada infecção por Influenza, além de correlação de cepas de Influenza de doença clínica com as cepas vacinais da vacina do estudo.

4.6.6 Vigilância de rejeição do enxerto

Foi avaliado o desfecho clínico de rejeição aguda ou crônica do enxerto ao longo de 26 semanas de seguimento para cada participante transplantado renal.

Rejeição aguda foi definida como deterioração aguda da função do enxerto associada às alterações histopatológicas definidas de acordo com a Classificação Internacional de Banff na biópsia, após descartadas outras complicações ou nefrotoxicidade medicamentosa. Rejeição crônica foi definida como perda tardia da função renal associada às alterações histopatológicas definidas de acordo com a Classificação Internacional de Banff na biópsia, após descartadas outras complicações ou nefrotoxicidade medicamentosa.

Durante 26 semanas de seguimento por participante, filtrou-se do prontuário eletrônico da urologia alertas de eventos de rejeição do enxerto renal em participantes do nosso estudo. Depois, avaliou-se aqueles que haviam realizado biópsia com confirmação histológica da rejeição aguda ou crônica. Suspeita clínica de rejeição do enxerto por elevação de creatinina, sem biópsia renal não foi caracterizado como rejeição já que elevação de creatinina é multifatorial nesta população, podendo ser por complicações vasculares no pós-operatório, infecções e nefrotoxicidade medicamentosa.

4.6.7 Avaliação laboratorial de imunogenicidade

Para todos os grupos, coletou-se amostras de sangue no D0 para quantificação dos títulos de anticorpos basais e, portanto, para estabelecer a

prevalência de soroproteção antes da vacinação (pré-vacinação), além de calcular as MGT basais. No D21, coletou-se amostras de sangue para quantificação de títulos de anticorpos pós-vacinação para a avaliação das taxas de soroconversão e soroproteção e dos MGT nos grupos de adultos sadios e transplantados renais randomizados para os grupos da dose padrão e dose dobrada da vacina. No D42, ou seja, 21 dias após a segunda vacinação, coletou-se novas amostras de sangue no grupo de dose de reforço da vacina no D42 para a avaliação das taxas de soroconversão e soroproteção e dos MGT.

Para a análise das amostras de soro foi empregada a reação de inibição da hemaglutinação (*Hemagglutination Inhibition test* – reação de HI) para a detecção de anticorpos contra os vírus Influenza, de acordo com metodologia preconizada. Para a retirada de inibidores inespecíficos os soros dos participantes foram submetidos à ação da enzima destruidora de receptores (*Receptor Destroying Enzyme* - RDE; *Vibrio cholera* filtrado; Sigma-Aldrich) por 18 horas a 37°C, e inativados a 56°C por 30 minutos.

Em tubos de ensaio, foi acrescentado a 1 volume (25uL) de soro do participante, uma alíquota de 3 volumes (75uL) da enzima RDE previamente diluída a 1:50. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e incubados por uma noite (18-20 horas no máximo) em banho Maria a 37°C. Após esse período, a enzima RDE foi inativada colocando a mistura soro-RDE em banho Maria a 56°C por 30 minutos. Após, adicionou-se 6 volumes (150uL) de solução fisiológica e o soro foi mantido em geladeira (entre 2 a 8°C) até a execução do teste HI.

Foram empregados os antígenos virais componentes da vacina de influenza sazonal do ano de 2014 e provenientes do Instituto Butantan (A/Califórnia/7/2009(H1N1)pdm09, A/Texas/50/2012(H3N2) e B/Massachusetts/2/2012). Para a titulação dos antígenos empregou-se a reação da hemaglutinação para determinar as 8 unidades hemaglutinantes a serem utilizadas na reação de HI.

Foram adicionados 50uL de tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline* –PBS), pH 7,2, estéril em todos os orifícios da microplaca com fundo em

U, com exceção da primeira coluna. Em seguida, preparou-se uma diluição 1:20 do antígeno viral em tubo Falcon 15mL e adicionou-se 50uL do antígeno diluído 1:20 na primeira e segunda coluna. Foram feitas diluições seriadas, em duplicatas, a partir da segunda coluna até a penúltima, e depois adicionados 50uL de suspensão de hemácias 0,5% em toda a placa. Fez-se o controle de hemácias em duplicata na última coluna, adicionando 50uL PBS pH7,2 estéril + 50uL hemácias a 0,5%. A leitura da hemaglutinação foi realizada após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente.

O último orifício apresentando aglutinação definida foi considerada como uma unidade hemaglutinante. A reação foi realizada com 8 unidades hemaglutinantes, então dividiu-se a unidade encontrada por 8 para obter a diluição do antígeno que contém 8 unidades hemaglutinantes. A diluição para 8 unidades hemaglutinantes foi corrigida diluindo a partir da solução de 1:20. Foi feita retitulação do antígeno para confirmar se a diluição realmente continha 8 unidades. A leitura da hemaglutinação foi realizada nos quatro primeiros orifícios da placa.

Todas as etapas da reação HI foram realizadas em duplicatas, analisando de forma simultânea os títulos de anticorpos na pré-vacinação e pós-vacinação de acordo com recomendação da EMA.

Utilizou-se microplacas de 96 poços fundo U. Foram adicionados 25µl de diluente PBS (solução tampão fosfato pH7,2 estéril) em todos os poços da placa, com exceção da primeira coluna. Em seguida, adicionou-se 25µl do soro tratado no primeiro, segundo e último poços (colunas 1, 2 e 8), em duplicata (linhas 1 e 2). O orifício 8 funcionou como controle do soro. Após este procedimento foram realizadas diluições ($\log_2$) seriadas do soro, utilizando-se micropipeta multicanal, (1:10 até 1:10240) passando 25µl do soro diluído para o próximo orifício até a penúltima coluna. Foram descartados 25µl do soro diluído após homogeneização da penúltima coluna. Adicionou-se 25µl do antígeno contendo 8 unidades hemaglutinantes em todos os orifícios do teste, com exceção da última coluna.

Para cada antígeno viral foi preparada uma placa contendo controles de antígeno (antígeno e PBS), de hemácia (hemácia e PBS) e dos soros (soro e PBS) em duplicata. As microplacas foram levemente agitadas e deixadas em

temperatura ambiente por 30 minutos. Após, adicionou-se a suspensão de hemácias de peru (0,5%) em todos os poços e deixou-se as microplacas à temperatura ambiente por 30 minutos. Realizou-se as leituras. Cada ensaio incluiu antissoros específicos positivos e controles de soro de animal não imunizado. O título do soro foi expresso pela diluição recíproca da mais alta diluição do soro onde a hemaglutinação foi inibida. As diluições dos títulos avaliados foram de 1:10 até 1:2560. O soro com título negativo na diluição (<1:10) foi determinado com o título 1:5.

A presença de anticorpos foi evidenciada pela sedimentação das hemácias no formato de um botão com deslocamento em forma de vela pela inclinação da placa. Isso ocorre quando há inibição da hemaglutinação, ou seja, o anticorpo presente se ligou a o antígeno viral e impediu a adsorção do vírus às hemácias. O título da inibição é proporcional ao título do anticorpo. A ausência de anticorpos foi indicada quando não havia inibição de hemaglutinação evidenciada pela sedimentação irregular das hemácias, devido à aglutinação das mesmas pelo vírus da influenza.

4.7 Coleta e entrada de dados

Para os participantes transplantados renais, além das visitas presenciais e dos contatos telefônicos, outras fontes de dados foram o prontuário eletrônico do STR-HCFMUSP e o sistema laboratorial (HCMED). Foram coletados dados demográficos, clínicos e laboratoriais.

Para os adultos saudáveis, foram coletados apenas dados sociodemográficos nas visitas presenciais, pois não houve contato telefônico ou coleta de dados clínico-laboratoriais para este grupo.

Todos os dados foram registrados em fichas padronizadas e depois digitados pelo pesquisador em fichas eletrônicas (eCRFs – *Electronic Case Report Forms*) na plataforma *OpenClinica® Enterprise* versão 3.9.1 (OpenClínica, Waltham, MA, Estados Unidos) instalada localmente em servidor do Instituto Butantan.

4.7.1 Variáveis preditoras

As variáveis demográficas aplicáveis a todos os quatro grupos foram idade, sexo, cor, vacinação prévia em 2013.

As variáveis clínico-laboratoriais aplicáveis apenas aos grupos de transplantados renais foram dose da vacina, título de anticorpo na avaliação pré-vacinação, retransplante, tipo de doador, terapia de indução, esquema de imunossupressão atual composto por uso de micofenolato, uso de inibidor de calcineurina ou uso de inibidor de mTOR, tempo entre transplante e vacinação, nível sérico de tacrolimus, testosterona, creatinina, hemoglobina, albumina e linfócitos totais.

4.7.2 Variáveis de desfecho

A resposta humoral foi avaliada através das taxas de soroconversão, taxas de soroproteção, MGT e RMG para cada cepa vacinal nos quatro grupos de tratamento. Os desfechos da imunogenicidade humoral foram avaliadas conforme as recomendações da EMA. Segundo os critérios da EMA a taxa de soroconversão foi definida como proporção de indivíduos com título de anticorpos inibidores de hemaglutinação negativos pré-vacinação e com títulos $\geq 1:40$ após a vacinação ou um aumento de pelo menos quatro vezes em relação aos títulos basais e a taxa de soroproteção foi definida como proporção de indivíduos com títulos de anticorpos inibidores de hemaglutinação $\geq 1:40$ após a vacinação. Calculou-se a RMG que é o aumento das MGT de anticorpos na pós-vacinação em relação à pré-vacinação. Considerou-se imunogenicidade adequada quando a taxa de soroconversão $\geq 40\%$ e/ou a taxa de soroproteção $\geq 70\%$ e/ou a RMG $\geq 2,5$ para cada cepa vacinal.

A segurança vacinal foi avaliada pela frequência de eventos adversos nos 3 dias após cada vacinação apenas para os participantes transplantados renais.

A eficácia vacinal foi avaliada pela incidência de influenza confirmada durante o período de vigilância apenas para os participantes transplantados renais.

A incidência de rejeição aguda do enxerto renal foi avaliada através de resultados de biópsia renal mostrando alterações histopatológicas compatíveis no período de vigilância.

4.8 Análise estatística

Os dados foram extraídos da base de dados na plataforma *OpenClinica®* para o programa Excel e analisados no programa estatístico STATA versão 13.0 (StataCorp LP, CollegeStation, Texas, USA). Adotou-se nível de significância de 5% e intervalos de confiança (IC95%).

As análises estatísticas foram feitas por mITT (*modified intention to treat*) e PP (*per protocol*). A análise mITT incluiu todos os participantes dos quatro grupos que foram randomizados e que receberam ao menos uma dose da vacina. Para os participantes incluídos na população mITT que não realizaram a coleta de sangue conforme programado, utilizou-se o último desfecho conhecido para a análise. A análise PP incluiu apenas os participantes dos quatro grupos que se submeteram a todas as coletas de sangue para os estudos de imunogenicidade dentro da janela permitida sem violação do protocolo.

A análise descritiva das variáveis sócio-demográficas foi realizada por mITT para todos os quatro grupos. Adicionalmente, realizou-se análise PP das variáveis sócio-demográficas apenas nos grupos de transplantados renais uma vez que é a população utilizada na análise de fatores de risco para a soroconversão. Todos os resultados foram apresentados em tabelas de frequências para as variáveis qualitativas e, no que tange às variáveis quantitativas, foram feitas estimativas das medidas de tendência central e de dispersão. Empregou-se o teste qui-quadrado para avaliação da homogeneidade das variáveis sócio-demográficas entre os grupos. Para identificar em quais grupos de tratamento houve diferença, utilizou-se o modelo linear generalizado com distribuição binomial (ligação logito) e as comparações múltiplas dos percentuais por Bonferroni. Para a variável idade foi empregado o

teste paramétrico de análise de variância (*Analysis of Variance* - ANOVA) por apresentar distribuição normal.

Dados clínico-laboratoriais foram coletados apenas para os três grupos de transplantados renais uma vez que esta é a população de interesse para a avaliação dos fatores de risco para a soroconversão. A análise descritiva destas variáveis clínicas foi realizada por mITT e PP e os resultados foram apresentados em tabelas de frequências para as variáveis qualitativas e, no que tange às variáveis quantitativas, foram feitas estimativas das medidas de tendência central e de dispersão. Empregou-se o teste qui-quadrado para avaliação da homogeneidade de variáveis clínicas entre os três grupos. Para identificar em quais grupos de tratamento houve diferença, utilizou-se o modelo linear generalizado com distribuição binomial (ligação logito) e as comparações múltiplas dos percentuais por Bonferroni. Já para as variáveis relativas ao nível sérico, empregou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

As análises de imunogenicidade foram realizadas por mITT e PP para todos os quatros grupos. Comparou-se as MGT, RMG, taxas de soroconversão e soroproteção entre os grupos. Calculou-se as MGT pré- e pós-vacinação e a RMG com seus respectivos intervalos com 95% de confiança (IC95%) para cada cepa vacinal e grupo de vacinação. Para comparação dessas medidas entre os quatro grupos, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Nas situações em que houve diferença com significância estatística entre os quatro grupos, prosseguiu-se ao teste de comparações múltiplas de Dunn para identificar onde estavam as diferenças.

Também foram calculadas, para cada grupo e cepa vacinal, as proporções de participantes soroprotégidos com títulos de anticorpos HI $\geq 1:40$ na avaliação pré-vacinação e as proporções de indivíduos apresentando soroconversão e soroproteção na avaliação pós-vacinação com seus respectivos IC95%. Para cada cepa vacinal, empregou-se o teste qui-quadrado para analisar diferenças entre as proporções de soroconversão e soroproteção entre os quatro grupos. Para identificar em quais grupos de tratamento houve diferença, utilizou-se o modelo linear generalizado com distribuição binomial (ligação logito) e as comparações múltiplas dos percentuais por Bonferroni.

A análise de fatores de risco para a soroconversão foi realizada apenas PP entre transplantados renais e por cepa vacinal. Inicialmente, calcularam-se as prevalências de soroconversão e seus respectivos IC95% para cada cepa vacinal e depois prosseguiu-se às análises bivariada e multivariada.

Na análise bivariada, as variáveis categóricas avaliadas foram dose da vacina, sexo, cor, título de anticorpo na avaliação pré-vacinação, retransplante, tipo de doador, terapia de indução com comparação de dose alta e a dose baixa de ATG, esquema triplo de imunossupressão com prednisona, micofenolato e tacrolimus em comparação ao restante, número de drogas no esquema de imunossupressão, uso de micofenolato, uso de inibidor de calcineurina e uso de inibidor de mTOR. As variáveis contínuas foram idade, tempo entre transplante e vacinação, níveis séricos de tacrolimus, testosterona, creatinina, hemoglobina, linfócitos e albumina. Estimou-se a associação entre as variáveis e o desfecho de soroconversão pela razão de prevalência (RP) uma vez que as prevalências de soroconversão encontradas foram elevadas ($\geq 20\%$). As variáveis que, à análise bivariada, apresentaram valor de p inferior a 0,20 foram selecionadas para análise múltipla utilizando o modelo de regressão de Poisson com variância robusta.

Todos os modelos multivariadas foram ajustadas para a dose da vacina por ser a variável de interesse e para a idade por ser fator biológico com efeito na resposta imunológica. O processo de modelagem foi iniciado com a variável que apresentava o menor valor de p à análise bivariada e, em seguida, foram acrescentadas sucessivamente as demais com valor de p inferior a 0,20, eliminando as menos significativas a cada etapa com permanência nos modelos finais das variáveis com nível p inferior a 0,05. O modelo final foi escolhido com base no melhor ajuste matemático e também na plausibilidade da associação entre as variáveis e o desfecho. Finalmente foram estimadas as RPs para cada uma das variáveis de cada modelo final, com seus respectivos IC95%.

A análise de segurança foi realizada por mITT. Empregou-se o teste qui-quadrado para testar associação entre o grupo de vacinação e os relatos de eventos adversos nos três grupos de transplantados renais.

4.9 Ética em pesquisa

O projeto de pesquisa e os seus apêndices foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) e do HCFMUSP antes do início do estudo.

O estudo foi cadastrado em 18/02/2014 sob número CAPPesq 11952 (APÊNDICE F).

O estudo também foi registrado no registro de ensaios clínicos (NCT02104869).

5 RESULTADOS

5.1 População do estudo

A triagem dos participantes foi iniciada em 28 de abril de 2014 durante a campanha nacional de vacinação contra a influenza, ocorrendo em todos os períodos de funcionamento do ambulatório do STR até o encerramento do recrutamento.

Durante o período de 28/04/2014 até 31/07/2014 foram triados 177 transplantados renais e 15 adultos saudáveis. Foram recrutados 176 transplantados renais e 15 adultos saudáveis na população ITT, equivalentes a 97,8% e 100% das amostras pretendidas, respectivamente.

Referente à randomização dos transplantados renais no D0 foram 59 participantes para o grupo da dose padrão, 59 para o grupo da dose dobrada e 58 para o grupo da dose de reforço da vacina. Não houve registro de vacinação para dois transplantados renais do grupo da dose padrão, um do grupo da dose dobrada e um do grupo da dose de reforço da vacina. Estes quatro participantes foram excluídos, restando 57 participantes para o grupo da dose padrão, 58 para o grupo da dose dobrada e 57 para o grupo da dose de reforço da vacina para a análise da população mITT (n=172).

No D21 + 7 dias, compareceram à visita 51 participantes do grupo da dose padrão (seis perdas de seguimento) com sete coletas fora da janela permitida e 53 participantes do grupo da dose dobrada da vacina (três perdas de seguimento e duas retiradas de TCLE) com nove coletas fora da janela permitida. Após as exclusões dos participantes com desvio de protocolo, restaram 44 participantes na análise da população PP em cada grupo.

Referente aos transplantados renais randomizados para o grupo da dose de reforço da vacina, entre D0 e o primeiro retorno no D21 + 7 dias, houve cinco perdas de seguimento, duas retiradas de TCLE, um óbito e uma falta à coleta. E 4 coletas fora do prazo? Portanto, 48 participantes compareceram ao primeiro retorno no D21 + 7 dias. Um participante não vacinou a critério médico por quadro respiratório agudo e encerrou a coleta nesta data, não realizando a coleta no D42 + 7 dias. Dos 47 participantes que receberam a segunda dose e

coletaram sangue, quatro participantes realizaram estes procedimentos fora da janela permitida. Entre D21 + 7 dias e o segundo retorno no D42 + 7 dias, ocorreu uma retirada de TCLE, restando 42 participantes no seguimento. Todos os 42 participantes compareceram à última coleta de sangue para avaliação da imunogenicidade. Destes, 10 participantes foram excluídos da população PP por coleta fora da janela permitida, restando 32 participantes para a análise PP.

Em relação aos 15 adultos sadios, todos foram encaminhados para vacinação com a dose padrão da vacina. Na visita de vacinação (D0) um adulto sadio não teve registro de vacinação por motivo desconhecido. Este foi excluído da análise da população mITT (n=14). Não houve perda de seguimento ou retirada de TCLE neste grupo até o término de seguimento no D21 + 7 dias. Todos coletaram sangue para a análise da imunogenicidade da vacina, mas um participante realizou a coleta fora da janela permitida e foi excluído da análise da população PP (n=13).

Em resumo, a população PP foi composta por 120 transplantados renais (44 de 59 (74,6%) do grupo da dose padrão; 44 de 59 (74,6%) do grupo da dose dobrada, e 32 de 58 (55,2%) do grupo da dose de reforço da vacina) e 13 adultos sadios (86,7%) que cumpriram todos os procedimentos do estudo.

O término do estudo foi em 31/01/2015 junto com o encerramento das 26 semanas de seguimento do último participante transplantado renal recrutado em 31/07/2014. A Figura 4 mostra o fluxograma de seguimento dos participantes.

Figura 4. Fluxograma do seguimento dos participantes do estudo.
ACM – a critério médico; mITT – intenção de tratar modificada; PP - por protocolo

5.1.1 *Características demográficas*

A distribuição das características demográficas nos três grupos de transplantados renais e adultos saudáveis no momento da inclusão do estudo estão demonstradas na tabela 7. Na análise por mITT, houve diferença significativa na distribuição do sexo entre os transplantados renais dos grupos da dose padrão e dose dobrada da vacina ($p=0,036$). Também houve diferença significativa na idade onde os adultos saudáveis com idade mediana de 33,4 anos eram mais jovens do que os transplantados renais dos grupos da dose padrão da vacina cuja idade mediana foi de 44,5 anos e da dose dobrada da vacina cuja idade mediana foi de 44,5 anos ($p=0,043$).

Não houve diferença estatisticamente significativa referente à cor e nas proporções de indivíduos com vacinação prévia. Em relação à cor, em todos os grupos, predominou a cor branca, seguida de parda, negra e amarela. Todos os adultos saudáveis referiram vacinação em 2013 enquanto que a vacinação prévia entre transplantados renais variou de 76,8% a 85,7%. No grupo de adultos saudáveis predominou o sexo feminino (85,7%). (Tabela 7)

Tabela 7 - Distribuição das características demográficas nos três grupos de transplantados renais e adultos sadios no D0 (análise mITT).

Variáveis	Transplantados (n=172)						Adultos sadios (n=14)		p*
	Dose padrão (n=57)		Dose dobrada (n=58)		Dose de reforço (n=57)		nº	%	
	nº	%	nº	%	nº	%			
Sexo									0,048
feminino	28	49,1	26	44,8	31	54,4	12	85,7	
masculino	29	50,9	32	55,2	26	45,6	2	14,3	
Idade									0,045**
mediana	44,5		44,2		41,2		33,4		
(mín - máx)	(18,5 - 58,9)		(24,2 - 60,6)		(20,9 - 59,9)		(25,1 - 49,8)		
Cor									0,099***
branca	26	45,6	35	60,3	39	68,4	8	57,1	
negra	9	15,8	3	5,2	4	7,0	2	14,3	
parda	22	38,6	19	32,8	13	22,8	2	14,3	
amarela	0	0,0	1	1,7	1	1,8	2	14,3	
Vacinação em 2013 (n=168)									0,194
não	13	23,2	8	14,3	10	17,9	0	0,0	
sim	43	76,8	48	85,7	46	82,1	14	100	

* teste qui-quadrado; ** teste ANOVA; *** cor branca *versus* não branca.

Na análise PP das características demográficas conduzida apenas entre os transplantados renais, a distribuição do sexo foi semelhante, exceto no grupo da dose dobrada onde sexo masculino foi predominante (61,4%). Os transplantados renais da população PP foram majoritariamente da cor branca com idade mediana entre 42,5 a 46. Mais de 70% referiram vacinação prévia em 2013. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Tabela 8)

Tabela 8 - Distribuição das características demográficas nos três grupos de transplantados renais no D0 (análise PP).

Variáveis	Transplantados (n=120)						p*
	Dose padrão (n=44)		Dose dobrada (n=44)		Dose de reforço (n=32)		
	nº	%	nº	%	nº	%	
Sexo							0,310
feminino	24	54,5	17	38,6	16	50,0	
masculino	20	45,5	27	61,4	16	50,0	
Idade							0,846**
mediana	45,9		46,3		42,5		
(mín - máx)	(18,5 - 58,9)		(24,2 - 59,7)		(21,5 - 59,9)		
Cor							0,224***
branca	23	52,3	27	61,4	23	71,9	
negra	4	9,1	3	6,8	3	9,4	
parda	17	38,6	13	29,5	6	18,8	
amarela	0	0,0	1	2,3	0	0,0	
Vacinação em 2013 (n=117)							0,176
não	9	20,9	3	7,1	4	12,5	
sim	34	79,1	39	92,9	28	87,5	

*teste qui-quadrado; ** teste ANOVA; *** cor branca *versus* não branca.

5.1.2 Características clínico-laboratoriais

As variáveis clínico-laboratoriais no D0 foram analisadas apenas entre os grupos de transplantados renais. A Tabela 9 mostra a distribuição das características clínicas e laboratoriais nos três grupos de transplantados renais no D0. Na análise mITT, verificou-se que os grupos não diferiram quanto ao número de transplantes prévias (maioria sem retransplante), tipo de doador (maioria doador falecido), tempo pós-transplante, e níveis séricos de creatinina, albumina, hemoglobina, linfócitos e dosagem sérica de imunossupressores no momento da randomização.

Referente à terapia imunossupressora de indução, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,015$), onde uma proporção maior de participantes do grupo da dose dobrada (15,5%) não recebeu a terapia de indução comparada ao grupo da dose padrão (1,8%) ($p=0,020$).

A maioria dos participantes estava sob imunossupressão de manutenção com o esquema triplo, composto por prednisona, micofenolato e tacrolimus. No entanto, três participantes que não recebiam prednisona pertenciam ao grupo da dose dobrada, com significância estatística ($p=0,050$). Não houve diferença na distribuição dos outros imunossupressores.

Na análise PP, a distribuição das variáveis foi semelhante, mas manteve-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,028$) na utilização da terapia de indução onde uma maior proporção de indivíduos no grupo da dose dobrada (18,2%) não recebeu a terapia comparado ao grupo da dose padrão da vacina (2,3%) ($p=0,014$).

Tabela 9 – continuação...

Variáveis	Análise mITT (n=172)				p*	Análise PP (n=120)				p*		
	Dose padrão (n=57)		Dose dobrada (n=58)			Dose padrão (n=44)		Dose dobrada (n=44)			Dose de reforço (n=32)	
	nº	%	nº	%		nº	%	nº	%		nº	%
Tempo pós transplante (meses)	21,6 (1,0 - 202,4)		27,5 (1,1 - 206,1)		13,9 (1,1 - 141,5)	0,286*	21,6 (1,0 - 202,4)		25,3 (1,1 - 206,1)		12,0 (1,1 - 131,2)	0,573**
Creatinina sérica	1,55 (0,61 - 6,19)		1,40 (0,43 - 4,13)		1,33 (0,55 - 3,63)	0,262*	1,37 (0,66 - 6,19)		1,38 (0,43 - 4,13)		1,42 (0,55 - 3,63)	0,931**
Hemoglobina	12,4 (7,1 - 16,3)		12,8 (7,8 - 16,4)		12,9 (5,5 - 18,5)	0,467*	12,4 (7,1 - 16,3)		12,7 (7,8 - 16,4)		12,8 (5,5 - 16,2)	0,865**
Linfócitos	1010 (190 - 4000)		1265 (50 - 4000)		1230 (180 - 2890)	0,368*	1015 (210 - 4000)		1205 (50 - 4000)		1235 (180 - 2530)	0,491**
Albumina sérica	4,3 (3,4 - 5,0)		4,4 (2,8 - 5,2)		4,3 (3,2 - 5,2)	0,508*	4,3 (3,4 - 5,0)		4,4 (2,8 - 5,2)		4,3 (3,5 - 5,2)	0,994**
Tacrolimus sérico												
n	45		42		51	0,866	34		31		30	0,960
média (dp)	12,7 (8,9)		11,4 (5,1)		12,0 (5,4)		12,3 (7,7)		11,6 (5,3)		11,3 (5,2)	
mediana	10,5		11,4		12,4		10,5		11,5		12,0	
(mín - máx)	(5,0 - 50,0)		(2,4 - 24,0)		(4,0 - 24,7)		(5,0 - 48,4)		(2,4 - 24,0)		(4,3 - 24,7)	
Sirolimus sérico						0,029						
n	4		4		2		4		3		1	0,414
média (dp)	12,8 (6,6)		9,3 (5,1)		18,4 (1,9)		12,8 (6,6)		8,6 (6,0)		19,7	
mediana	12,6		10,8		18,4		12,6		10,3			
(mín - máx)	(5,4 - 20,6)		(2,0 - 13,6)		(17,0 - 19,7)		(5,4 - 20,6)		(2,0 - 13,6)		19,7	

Tabela 9 – conclusão

Variáveis	Análise mITT (n=172)						Análise PP (n=120)						p*
	Dose padrão (n=57)		Dose dobrada (n=58)		Dose de reforço (n=57)		Dose padrão (n=44)		Dose dobrada (n=44)		Dose de reforço (n=32)		
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
Ciclosporina sérica	0,786												
n	4		6		2		3		4		1		0,332
média (dp)	267,5 (280,4)		276,2 (261,9)		190,5 (109,6)		346,7 (283,4)		146,5 (135,4)		268		
mediana (mín - máx)	196,5 (30,0 - 647,0)		260,5 (30,0 - 743,0)		109,5 (113,0 - 268,0)		309,0 (84,0 - 647,0)		128,5 (30,0 - 299,0)		268		
Everolimus sérico	0,574												
n	2		3		4		2		2		3		0,481
média (dp)	6,6 (3,3)		13,7 (6,3)		10,9 (12,3)		6,6 (3,3)		16,9 (4,2)		11,6 (15,0)		
mediana (mín - máx)	6,6 (4,2 - 8,9)		14,0 (7,3 - 20,0)		6,7 (1,4 - 28,8)		6,6 (4,2 - 8,9)		16,9 (13,9 - 19,9)		4,6 (1,4 - 28,8)		

5.2 Imunogenicidade humoral

Todas as análises da resposta vacinal foram realizadas por mITT e PP e os resultados apresentados por grupo de esquema de vacinação e cepa vacinal com seus respectivos IC95%, com exceção das análises de fatores de risco para soroconversão em transplantados renais que foram realizados apenas por PP.

5.2.1 Soroconversão

Na análise por mITT, todas as taxas de soroconversão no D21/D42 foram menores do que 40% nos quatro grupos. Houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de soroconversão para a A/H1N1 ($p=0,007$), onde a taxa de soroconversão à dose de reforço foi significativamente maior comparado à taxa de soroconversão à dose padrão da vacina (34,5% *versus* 8,5%; $p=0,002$). Não houve diferença significativa nas taxas de soroconversão para as cepas A/H3N2 e influenza B.

Na análise PP, as taxas globais de soroconversão para cada cepa vacinal entre transplantados foram: A/H1N1=20,0% (24/120; IC95%=13,3 - 28,3); A/H3N2= 25,0% (30/120; IC95%=17,5 - 33,7) e Influenza B=26,7% (32/120; IC95%=19,0 - 35,5).

Em relação as taxas de soroconversão por grupo de esquema de vacinação, o grupo de transplantados renais que recebeu a dose de reforço da vacina apresentou uma taxa de soroconversão para a cepa A/H3N2 de 43,8% ($p=0,052$) e foi o único grupo a alcançar taxa acima de 40% conforme preconizado pela EMA. Manteve-se a diferença estatisticamente significativa de maior taxa de soroconversão após a dose de reforço da vacina comparado à dose padrão da vacina para a A/H1N1 (37,5% *versus* 9,1%; $p=0,018$). Em ambas as análises, todas as taxas de soroconversão foram maiores no grupo que recebeu a dose de reforço da vacina do que nos outros grupos, incluindo o grupo dos adultos saudáveis (Tabela 10).

Tabela 10 - Taxas de soroconversão com seus respectivos IC95% para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação no D21/D42 em relação à pré-vacinação no D0 nas análises mITT e PP.

Cepa vacinal	Análise mITT (n=172)				<i>p</i> ***	Análise PP (n=120)				<i>P</i> ***
	Dose padrão* (n=57)	Dose dobrada* (n=58)	Dose de reforço** (n=57)	Adultos sadios* (n=14)		Dose padrão* (n=44)	Dose dobrada* (n=44)	Dose de reforço** (n=32)	Adultos sadios* (n=13)	
A/H1N1	8,5% (2,8-18,7)	20,3% (11,0-32,8)	34,5% (22,5-48,1)	20,0% (4,3-48,1)	0,007	9,1% (2,5-21,7)	18,2% (8,2-32,7)	37,5% (21,1-56,3)	23,1% (5,0-53,8)	0,024
A/H3N2	18,6% (9,7-30,9)	22,0% (12,3-34,7)	37,9% (25,5-51,6)	13,3% (1,7-40,5)	0,051	18,2% (8,2-32,7)	22,7% (11,5-37,8)	43,8% (26,4-62,3)	15,4% (1,9-45,4)	0,052
B	23,7% (13,6-36,6)	18,6% (9,7-30,9)	29,3% (18,1-42,7)	20,0% (4,3-48,1)	0,580	25,0% (13,2-40,3)	20,5% (9,8-35,3)	31,3% (16,1-50,0)	23,1% (5,0-53,8)	0,758

* D21(+7) versus D0; ** D42(+7) versus D0; *** teste qui-quadrado

Os gráficos a seguir apresentam as taxas de soroconversão por grupo de vacinação e cepa vacinal nas análise mITT e PP (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 - Taxas de soroconversão para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação (mITT)

Gráfico 2 - Taxas de soroconversão para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação (PP)

5.2.2 Soroproteção

Nas análises mITT e PP, não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de soroproteção nas avaliações pré-vacinação nos quatro grupos. Em geral, as taxas de soroproteção foram maiores que 50% nos quatro grupos, exceto para a cepa vacinal H3N2 no grupo que recebeu a dose dobrada da vacina, cuja taxa de soroproteção pré-vacina foi de 47,5% na análise mITT. As taxas de soroproteção pré-vacinais foram maiores no grupo dos adultos saudáveis do que nos grupos de transplantados renais para todas as cepas, exceto para A/H1N1, sem significância estatística.

Em ambas as análises, notou-se aumento de todas as taxas de soroproteção na avaliação pós-vacinação. Na análise mITT, todas as taxas de soroproteção para as três cepas vacinais foram maiores que 70%, exceto no grupo de transplantados renais que recebeu a dose padrão da vacina na qual a única taxa de soroproteção acima de 70% foi observada para a cepa B. Na análise PP, todos os grupos, sem exceção, apresentaram taxas de soroproteção maiores que 70% na pós-vacinação, com diferença nas proporções de soroprotetidos para A/H3N2 ($p=0,020$), onde a proporção de soroprotetidos foi significativamente maior no grupo que recebeu a dose de reforço comparado ao grupo que recebeu a dose padrão da vacina (92,3% e 70,5%, respectivamente, $p=0,003$).

Em ambas as análises, as menores taxas de soroproteção na avaliação pós-vacinação foram no grupo de transplantados renais que recebeu a dose padrão da vacina. Observou-se que a dose padrão da vacina resultou em maior proporção de soroprotetidos em adultos saudáveis comparado aos transplantados renais que receberam a mesma dose, sem significância estatística.

As proporções de soroprotetidos antes e após a vacinação são mostradas a seguir na Tabela 11.

Tabela 11 - Taxas de soroproteção com seus respectivos IC95% para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação no D21/D42 em relação à pré-vacinação no D0 nas análises mITT e PP.

Cepa vacinal	Análise mITT (n=172)					Análise PP (n=120)				
	Dose padrão * (n=57)	Dose Dobrada* (n=58)	Dose de reforço** (n=57)	Adultos sadios* (n=14)	p***	Dose padrão* (n=44)	Dose dobrada* (n=44)	Dose de reforço** (n=32)	Adultos sadios* (n=13)	p***
A/H1N1										
Pré	61,0% (47,4-73,5)	64,4% (50,9-76,4)	53,4% (39,9-66,7)	60,0% (32,3-83,7)	0,676	63,6% (47,8-77,6)	65,9% (50,1-79,5)	56,3% (37,7-73,6)	61,5% (31,6-86,1)	0,854
Pós	69,5% (56,1-80,8)	88,1% (77,1-95,1)	81,0% (68,6-90,1)	86,7% (59,5-98,3)	0,072	70,5% (54,8-83,2)	90,9% (78,3-97,5)	84,4% (67,2-94,7)	92,3% (64,0-99,8)	0,055
A/H3N2										
Pré	52,5% (39,1-65,7)	47,5% (34,3-60,9)	58,6% (44,9-71,4)	73,3% (44,9-92,2)	0,282	54,5% (38,8-69,6)	59,1% (43,2-73,7)	62,5% (43,7-78,9)	76,9% (46,2-95,0)	0,533
Pós	67,8% (54,4-79,4)	71,2% (57,9-82,2)	86,2% (74,6-93,9)	86,7% (59,5-98,3)	0,067	70,5% (54,8-83,2)	79,5% (64,7-90,2)	96,9% (83,8-99,9)	92,3% (64,0-99,8)	0,020
B										
Pré	62,7% (49,1-75,0)	74,6% (61,6-85,0)	74,1% (61,0-84,7)	80,0% (51,9-95,7)	0,360	61,4% (45,5-75,6)	75,0% (59,7-86,8)	81,3% (63,6-92,8)	84,6% (54,6-98,1)	0,165
Pós	79,7% (67,2-89,0)	89,8% (79,2-96,2)	87,9% (76,7-95,1)	93,3% (68,1-99,8)	0,308	79,5% (64,7-90,2)	88,6% (75,4-96,2)	93,8% (79,2-99,2)	100% (75,3-100)	0,124

* D21(+7) versus D0; ** D42(+7) versus D0; *** teste qui-quadrado

Os gráficos a seguir apresentam as taxas de soroproteção por grupo de vacinação e cepa vacinal nas análise mITT e PP (Gráficos 3 e 4).

Gráfico 3 - Taxas de soroproteção para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pré- e pós-vacinação (mITT)

Gráfico 4 - Taxas de soroproteção para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pré- e pós-vacinação (PP)

5.2.3 Médias geométricas dos títulos de anticorpos

Nas análises mITT e PP, não houve diferença entre as MGT na avaliação pré-vacinação nos quatro grupos.

Na análise mITT, houve diferença entre as MGT para vírus B ($p=0,044$), onde a MGT foi significativamente maior no grupo da dose de reforço do que no grupo da dose padrão da vacina ($p=0,018$) na avaliação pós-vacinação. A RMG foi significativamente diferente para as cepas A/H1N1 e A/H3N2. Para A/H1N1, as RMG foram significativamente maiores nos grupos de adultos sadios (2,2) e da dose de reforço (2,6) do que no grupo da dose padrão da vacina (1,4), ($p=0,042$ e $p=0,002$, respectivamente). Para a cepa A/H3N2, a RMG foi significativamente maior no grupo da dose de reforço do que no grupo de dose padrão da vacina (RMG=3,0 e 1,8, respectivamente, $p=0,009$).

Na análise PP, houve diferença nas MGT para A/H3N2 ($p=0,026$) na avaliação pós-vacinação, onde as MGTs dos grupos de adultos sadios (122,6) e da dose de reforço da vacina (128,8) foram significativamente maiores do que a MGT do grupo da dose padrão da vacina (54,8) ($p=0,047$ e $p=0,006$, respectivamente). Referente às RMG, manteve-se diferença para a cepa A/H1N1 ($p=0,013$), onde as RMG do grupo dos adultos sadios (2,3) e do grupo de dose de reforço da vacina (2,4) foram significativamente maiores do que a RMG do grupo da dose padrão da vacina (1,3) ($p=0,025$ e $p=0,010$, respectivamente).

Em ambas as análises, exceto para a cepa vacinal B, a RMG foi crescente entre os grupos de transplantados renais sendo maior nos grupos da dose dobrada e dose de reforço da vacina. (Tabela 12).

Tabela 12 - Médias geométricas com suas razões e seus respectivos IC95% para cada cepa vacinal e grupo de vacinação na avaliação pós-vacinação no D21/D42 em relação à pré-vacinação no D0 nas análises mITT e PP.

Cepa vacinal	Análise mITT (n=172)				<i>p</i> ***	Análise PP (n=120)				<i>p</i> ***
	Dose Padrão* (n=57)	Dose Dobrada* (n=58)	Dose de reforço** (n=57)	Adultos sadios* (n=14)		Dose padrão* (n=44)	Dose dobrada* (n=44)	Dose de reforço** (n=32)	Adultos sadios* (n=13)	
A/H1N1										
Pré	45,2 (31,5-64,7)	47,3 (33,1-67,5)	34,2 (23,5-49,7)	36,2 (16,6-79,2)	0,473	41,9 (27,7-63,5)	49,9 (33,4-74,5)	40,0 (23,2-69,1)	36,0 (15,3-84,3)	0,782
Pós	62,0 (42,5-9,3)	82,9 (62,0-110,9)	80,0 (57,2-111,9)	80,0 (46,4-137,8)	0,587	55,7 (35,6-87,0)	85,2 (61,6-117,8)	95,1 (61,3-147,7)	84,4 (47,3-150,5)	0,313
RMG	1,4 (1,2-1,7)	1,9 (1,5-2,3)	2,6 (1,9-3,4)	2,2 (1,3-3,7)	0,005	1,3 (1,1-1,5)	1,7 (1,3-2,2)	2,4 (1,6-3,4)	2,3 (1,4-4,0)	0,013
A/H3N2										
Pré	34,2 (24,8-47,0)	30,8 (20,8-45,4)	36,3 (26,3-50,1)	62,5 (31,7-122,9)	0,269	33,1 (22,4-49,0)	39,4 (25,0-62,1)	41,8 (27,4-63,6)	64,6 (31,0-134,6)	0,424
Pós	56,9 (40,6-79,7)	62,2 (42,4-91,4)	98,4 (72,0-134,5)	113,1 (66,1-193,8)	0,587	54,8 (36,7-81,8)	77,5 (50,5-119,0)	128,8 (89,8-185,0)	122,6 (70,3-213,5)	0,026
RMG	1,8 (1,4-2,3)	2,2 (1,7-2,9)	3,0 (2,1-4,2)	1,8 (1,3-2,5)	0,046	1,7 (1,3-2,1)	2,0 (1,5-2,6)	3,1 (1,9-4,9)	1,9 (1,4-2,6)	0,132
B										
Pré	60,5 (40,3-90,7)	80,0 (54,8-116,8)	66,7 (44,3-100,4)	131,3 (68,2-252,8)	0,279	54,8 (34,4-87,4)	75,1 (47,9-117,7)	78,3 (45,6-134,4)	129,3 (63,4-263,7)	0,274
Pós	113,8 (81,2-159,5)	133,7 (95,6-187,1)	162,0 (114,5-229,1)	204,9 (132,9-316,0)	0,044	109,6 (73,5-163,5)	130,4 (86,9-195,5)	186,2 (116,4-297,8)	198,0 (124,4-315,2)	0,280
RMG	2,0 (1,5-2,7)	1,8 (1,4-2,3)	2,7 (2,0-3,6)	1,6 (1,1-2,2)	0,095	2,0 (1,5-2,7)	1,7 (1,3-2,3)	2,4 (1,7-3,4)	1,5 (1,1-2,2)	0,252

* D21(+7) versus D0; ** D42(+7) versus D0; ***Kruskal-Wallis

Os gráficos a seguir apresentam as MGTs e RMGs por grupo de vacinação e cepa vacinal nas análise mITT (Gráficos 5 e 6).

Gráfico 5 - MGT na avaliação pré- e pós-vacinação para cada cepa vacinal e grupo de vacinação (mITT)

Gráfico 6 - RMG na avaliação pós-vacinação para cada cepa vacinal e grupo de vacinação (mITT)

Os gráficos a seguir apresentam as MGTs e as RMGs por grupo de vacinação e cepa vacinal nas análise PP (Gráficos 7 e 8).

Gráfico 7 - MGT na avaliação pré- e pós-vacinação para cada cepa vacinal e grupo de vacinação (PP)

Gráfico 8 - RMG na avaliação pós-vacinação para cada cepa vacinal e grupo de vacinação (PP)

5.3 Fatores preditivos de resposta vacinal

O efeito das variáveis sócio-demográficas e clínico-laboratoriais na soroconversão para cada cepa vacinal foi avaliado nos transplantados renais da população PP através de análises bivariada e multivariada.

Manteve-se no modelo final apenas variáveis com $p < 0,05$ ajustando para a dose da vacina e idade independentemente da significância estatística. A inclusão da idade baseou-se no fato de ser um fator biológico relevante no que tange a resposta imunológica e a dose da vacina é a variável de interesse do estudo. Escolheu-se o modelo final considerado mais robusto e com maior poder preditivo. A seguir apresenta-se os resultados das análises por cepa vacinal.

5.3.1 Cepas vacinais A/H1N1

Na análise bivariada, as variáveis dose da vacina, título de anticorpos na avaliação pré-vacinação, retransplante, tempo pós-transplante e creatinina sérica foram significativamente associadas a resposta vacinal e foram encaminhadas à análise multivariada. Fatores adicionais com $p < 0,20$ que foram incluídos no primeiro modelo da análise multivariada foram uso de micofenolato, hemoglobina e idade.

No primeiro modelo da análise multivariada, as variáveis título de anticorpos na avaliação pré-vacinação e retransplante apresentaram associação significativa com o desfecho de soroconversão. As demais variáveis (dose da vacina, creatinina e hemoglobina) não mostraram associação estatisticamente significativa com o desfecho avaliado. Detectou-se colinearidade entre o tempo pós-transplante e uso de micofenolato. A mediana do tempo pós-transplante foi de 12,1 meses entre usuários de micofenolato e 51,0 meses entre indivíduos sem micofenolato (Teste de Mann-Whitney $p < 0,001$). Portanto, excluiu-se o tempo pós-transplante do modelo final por ser um fator não modificável e manteve-se o uso de micofenolato por ser fator de risco modificável.

No modelo final os fatores que foram independentemente associados à soroconversão para A/H1N1 foram título de anticorpos na avaliação pré-vacinação, retransplante, uso de micofenolato e creatinina sérica.

A prevalência de soroconversão entre transplantados renais com títulos de anticorpos $< 1:40$ na pré-vacinação foi 3,76 vezes maior do que nos com títulos $\geq 1:40$. O uso de micofenolato e aumento na creatinina sérica reduziram a prevalência de soroconversão em 54% e 51%, respectivamente.

A dose da vacina e idade não apresentaram associação significativa com o desfecho de soroconversão (Tabela 13).

Tabela 13 - Análises bivariada e multivariada de fatores associadas à soroconversão para a cepa vacinal A/H1N1 entre transplantados renais da população PP com seus respectivos IC95% e ajuste para a dose da vacina e idade.

Variáveis	Total	Soroconversão (n=24)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)			Multivariada modelo final (p<0,05)		
	nº	nº	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Dose da vacina						0,014			0,094			0,105
preconizada	44	4	9,1	1			1			1		
dobrada	44	8	18,2	2,00	0,65 - 6,19		1,63	0,58 - 4,62		1,65	0,58 - 4,69	
reforço	32	12	37,5	4,13	1,46 - 11,67		2,75	0,98 - 7,69		2,69	0,96 - 7,54	
Sexo						0,242						
feminino	57	14	24,6	1								
masculino	63	10	15,9	0,65	0,31 - 1,34							
Cor						0,519						
não branca	47	8	17,0	1								
branca	73	16	21,9	1,29	0,60 - 2,78							
Título pré vacinação						0,001			0,001			0,001
≥1:40	75	7	9,3	1			1			1		
<1:40	45	17	37,8	4,05	1,81 - 9,03		3,64	1,72 - 7,72		3,76	1,76 - 8,02	
Retransplante						<0,001			0,001			<0,001
não	108	17	15,7	1			1			1		
sim	12	7	58,3	3,71	1,93 - 7,10		3,31	1,60 - 6,85		3,34	1,76 - 6,33	
Tipo de doador						0,926						
falecido	74	15	20,3	1								
vivo	46	9	19,6	0,97	0,46 - 2,03							
Terapia de indução ATG						0,229						
não	77	15	19,5	1								
até 240	16	1	6,3	0,32	0,05 - 2,28							
acima de 240	27	8	29,6	1,52	0,73 - 3,19							

Tabela 13 – continuação...

Variáveis	Total	Soroconversão (n=24)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)			Multivariada modelo final (p<0,05)		
	nº	nº	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Esquema de imunossupressão						0,614						
outros	35	8	22,9	1								
Prednisona + Tacrolimus + Micofenolato	85	16	18,8	0,82	0,39 - 1,75							
Número de drogas no esquema de imunossupressão						0,604						
1 ou 2	8	1	12,5	1								
3 ou 4	112	23	20,5	1,64	0,25 - 10,73							
Uso de micofenolato						0,114			0,099			0,020
não	22	7	31,8	1			1			1		
sim	98	17	17,3	0,55	0,26 - 1,16		0,56	0,28 - 1,11		0,46	0,24 - 0,88	
Uso de inibidor de calcineurina						0,767						
não	12	2	16,7	1								
sim	108	22	20,4	1,22	0,33 - 4,60							
Uso de inibidor de mTOR						0,691						
não	103	20	19,4	1								
sim	17	4	23,5	1,21	0,47 - 3,12							

Tabela 13 - conclusão

Variáveis	Total	Soroconversão (n=24)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)			Multivariada modelo final (p<0,05)		
	nº	nº	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Idade (anos)				1,03	0,99 - 1,07	0,157	1,01	0,97 - 1,05	0,672	1,01	0,97 - 1,05	0,578
Tempo pós-transplante (meses)				1,01	1,00 - 1,01	0,007	1,00	1,00 - 1,01	0,275			
Tacrolimus				1,00	0,94 - 1,06	0,963						
Testosterona sérica				1,00	1,00 - 1,00	0,492						
Creatinina sérica				0,39	0,22 - 0,70	0,002	0,55	0,29 - 1,04	0,065	0,49	0,27 - 0,91	0,025
Hemoglobina				1,15	0,96 - 1,38	0,119	1,05	0,85 - 1,31	0,642			
Albumina sérica				0,83	0,39 - 1,77	0,627						
Linfócitos				1,00	1,00 - 1,00	0,813						

5.3.2 Cepas vacinais A/H3N2

Na análise bivariada, as variáveis dose da vacina, título de anticorpos na avaliação pré-vacinação, tempo pós-transplante e creatinina sérica foram significativamente associadas a resposta vacinal e foram encaminhadas à análise multivariada. Fatores adicionais com $p < 0,20$ que foram incluídos no primeiro modelo da análise multivariada foram cor, retransplante, idade e albumina sérica.

No primeiro modelo da análise multivariada, as variáveis dose da vacina, título de anticorpos na avaliação pré-vacinação e tempo pós-transplante apresentaram associação significativa com o desfecho de soroconversão. Também se detectou colinearidade entre o tempo pós-transplante e uso de micofenolato para esta cepa, excluindo-se o tempo pós-transplante do modelo final e incluindo-se micofenolato por ser fator de risco modificável.

No modelo final os fatores que foram independentemente associados à soroconversão para A/H3N3 foram dose da vacina, título de anticorpos na avaliação pré-vacinação e uso de micofenolato.

A dose de reforço aumentou em 2,99 vezes a prevalência de soroconversão em relação à dose padrão da vacina. A prevalência de soroconversão entre transplantados renais com títulos de anticorpos $< 1:40$ na pré-vacinação foi 3,48 vezes maior do que nos com títulos $\geq 1:40$. O uso de micofenolato foi reduziu a prevalência de soroconversão em 52%.

A dose dobrada da vacina e idade não apresentaram associação significativa com o desfecho de soroconversão (Tabela 14).

Tabela 14 - Análises bivariada e multivariada de fatores associadas à soroconversão para a cepa vacinal A/H3N2 entre transplantados renais da população PP com seus respectivos IC95% e ajuste para a dose da vacina e idade.

Variáveis	Total	Soroconversão (n=32)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)			Multivariada modelo final (p<0,05)		
	n	n	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Dose da vacina						0,032			0,016			0,003
preconizada	44	8	18,2	1			1			1		
dobrada	44	10	22,7	1,25	0,54 - 2,88		1,12	0,49 - 2,55		1,29	0,58 - 2,83	
reforço	32	14	43,8	2,41	1,14 - 5,06		2,38	1,15 - 4,94		2,99	1,42 - 6,26	
Sexo						0,460						
feminino	57	17	29,8	1								
masculino	63	15	23,8	0,80	0,44 - 1,45							
Cor						0,152			0,558			
não branca	47	9	19,1	1			1					
branca	73	23	31,5	1,65	0,83 - 3,25		1,21	0,64 - 2,31				
Título pré vacinação						0,001			0,024			<0,001
≥1:40	70	10	14,3	1			1			1		
<1:40	50	22	44,0	3,08	1,60 - 5,94		2,13	1,11 - 4,11		3,48	1,79 - 6,75	
Retransplante						0,181			0,902			
não	108	27	25,0	1			1					
sim	12	5	41,7	1,67	0,79 - 3,52		1,04	0,52 - 2,09				
Tipo de doador						0,910						
falecido	74	20	27,0	1								
vivo	46	12	26,1	0,97	0,52 - 1,79							
Terapia de indução ATG						0,240						
não	77	20	26,0	1								
até 240	16	2	12,5	0,48	0,12 - 1,87							
acima de 240	27	10	37,0	1,43	0,77 - 2,66							

Tabela 14 – continuação...

Variáveis	Total	Soroconversão (n=32)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)			Multivariada modelo final (p<0,05)		
	n	n	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Esquema de imunossupressão						0,219						
outros	35	12	34,3	1								
Prednisona + Tacrolimus + Micofenolato	85	20	23,5	0,69	0,38 - 1,25							
Número de drogas no esquema de imunossupressão						0,913						
1 ou 2	8	2	25,0	1								
3 ou 4	112	30	26,8	1,07	0,31 - 3,72							
Uso de micofenolato						0,237						0,025
não	22	8	36,4	1						1		
sim	98	24	24,5	0,67	0,35 - 1,30					0,48	0,25 - 0,91	
Uso de inibidor de calcineurina						0,892						
não	12	3	25,0	1								
sim	108	29	26,9	1,07	0,38 - 3,02							
Uso de inibidor de mTOR						0,780						
não	103	27	26,2	1								
sim	17	5	29,4	1,12	0,50 - 2,52							

Tabela 14 – conclusão

Variáveis	Total	Soroconversão (n=32)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)			Multivariada modelo final (p<0,05)		
	n	n	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Idade (anos)				1,03	0,99 - 1,06	0,091	1,01	0,98 - 1,04	0,548	1,02	0,99 - 1,05	0,128
Tempo pós-transplante (meses)				1,01	1,00 - 1,01	<0,001	1,01	1,00 - 1,01	<0,001			
Tacrolimus				1,00	0,94 - 1,05	0,910						
Testosterona sérica				1,00	1,00 - 1,00	0,579						
Creatinina sérica				0,42	0,19 - 0,91	0,028	0,48	0,20 - 1,18	0,111			
Hemoglobina				1,06	0,90 - 1,26	0,476						
Albumina sérica				0,57	0,30 - 1,06	0,077	0,60	0,25 - 1,45	0,254			
Linfócitos				1,00	1,00 - 1,00	0,608						

5.3.3 Cepas vacinais B

Na análise bivariada, as variáveis título de anticorpos na avaliação pré-vacinação, retransplante, terapia de indução com ATG, uso de micofenolato, tempo pós-transplante e creatinina sérica foram significativamente associadas à resposta vacinal e foram encaminhadas à análise multivariada. Cor foi o único fator adicional com $p < 0,20$ que foi incluído no primeiro modelo da análise multivariada.

No primeiro modelo da análise multivariada, as variáveis título de anticorpos na avaliação pré-vacinação e retransplante apresentaram associação significativa com o desfecho de soroconversão. No modelo final, estes mesmos fatores foram independentemente associados à soroconversão para a cepa vacinal B.

A prevalência de soroconversão entre transplantados renais com títulos de anticorpos $< 1:40$ na pré-vacinação foi 2,30 vezes maior do que nos com títulos $\geq 1:40$. O retransplante aumentou a prevalência de soroconversão em 2,62 vezes.

A dose da vacina, uso de micofenolato e idade não apresentaram associação significativa com o desfecho de soroconversão (Tabela 15).

Tabela 15 - Análises bivariada e multivariada de fatores associadas à soroconversão para a cepa vacinal B entre transplantados renais com ajuste para as variáveis dose da vacina e idade (população PP).

Variáveis	Total	Soroconversão (n=30)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)		Multivariada modelo final (p<0,05)			
	nº	nº	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Dose da vacina						0,564			0,888			0,551
preconizada	44	11	25,0	1			1			1		
dobrada	44	9	20,5	0,82	0,38 - 1,78		1,12	0,55 - 2,27		0,98	0,48 - 2,02	
reforço	32	10	31,3	1,25	0,60 - 2,59		1,26	0,67 - 2,35		1,41	0,68 - 2,93	
Sexo						0,252						
feminino	57	17	29,8	1								
masculino	63	13	20,6	0,69	0,37 - 1,30							
Cor						0,055			0,411			
não branca	47	7	14,9	1			1					
branca	73	23	31,5	2,12	0,98 - 4,55		1,36	0,66 - 2,80				
Título pré vacinação						0,002			0,006			0,006
≥1:40	86	15	17,4	1			1			1		
<1:40	34	15	44,1	2,53	1,39 - 4,60		2,23	1,25 - 3,96		2,30	1,27 - 4,18	
Retransplante						<0,001			0,042			0,001
não	108	22	20,4	1			1			1		
sim	12	8	66,7	3,27	1,89 - 5,67		2,24	1,03 - 4,86		2,62	1,49 - 4,61	
Tipo de doador						0,830						
falecido	74	19	25,7	1								
vivo	46	11	23,9	0,93	0,49 - 1,78							
Terapia de indução ATG						0,049			0,322			
não	77	14	18,2	1			1					
até 240	16	7	43,8	2,41	1,16 - 5,01		4,74	2,00 - 11,21				

Tabela 15 – continuação...

Variáveis	Total	Soroconversão (n=30)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)			Multivariada modelo final (p<0,05)		
	nº	nº	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Acima de 240				1,83	0,90 - 3,75		1,66	0,84 - 3,30				
Esquema de imunossupressão						0,559						
outros	35	10	28,6	1								
Prednisona + Tacrolimus + Micofenolato	85	20	23,5	0,82	0,43 - 1,58							
Número de drogas no esquema de imunossupressão						0,445						
1 ou 2	8	1	12,5	1								
3 ou 4	112	29	25,9	2,07	0,32 - 13,41							
Uso de micofenolato						0,045			0,178			0,051
não	22	9	40,9	1			1			1		
sim	98	21	21,4	0,52	0,28 - 0,99		0,63	0,32 - 1,23		0,57	0,32 - 1,00	
Uso de inibidor de calcineurina						0,509						
não	12	2	16,7	1								
sim	108	28	25,9	1,56	0,42 - 5,77							
Uso de inibidor de mTOR						0,269						
não	103	24	23,3	1								
sim	17	6	35,3	1,51	0,73 - 3,16							

Tabela 15 – conclusão

Variáveis	Total	Soroconversão (n=30)		Bivariada (todas variáveis)			Multivariada (p<0,20)			Multivariada modelo final (p<0,05)		
	nº	nº	%	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p	RP	IC95%	p
Idade (anos)				1,01	0,98 - 1,04	0,447	1,02	0,98 - 1,05	0,327	1,01	0,99 - 1,04	0,283
Tempo pós-transplante (meses)				1,01	1,00 - 1,01	0,001	1,01	1,00 - 1,01	0,063			
Tacrolimus				0,97	0,92 - 1,03	0,309						
Testosterona sérica				1,00	1,00 - 1,00	0,286						
Creatinina sérica				0,52	0,27 - 0,98	0,043	0,61	0,35 - 1,06	0,081			
Hemoglobina				1,09	0,93 - 1,26	0,286						
Albumina sérica				0,69	0,33 - 1,42	0,310						
Linfócitos				1,00	1,00 - 1,00	0,945						

5.4 Segurança da vacina

5.4.1 Avaliação após a primeira vacinação

Após a primeira vacinação, obteve-se contato telefônico com 160 (93%) dos 172 participantes transplantados renais vacinados. Portanto, responderam ao questionário de eventos adversos solicitados e não solicitados 54 participantes do grupo da dose padrão, 54 do grupo da dose dobrada e 52 do grupo da dose de reforço da vacina.

Cinquenta e nove participantes (34,3%) relataram um total de 86 eventos adversos solicitados e não solicitados ocorridos nos três primeiros dias após a vacinação. Destes eventos adversos, 68 apresentavam relação causal com a vacinação e foram considerados reações adversas à vacina.

A distribuição de eventos adversos e reações adversas solicitadas e não solicitadas em cada o grupo de vacinação está resumida na tabela 16.

Tabela 16 - Ocorrência de eventos adversos e reações adversas solicitadas e não solicitadas nos três primeiros dias após a vacinação nos transplantados renais (população mITT)

	Dose padrão (n=57)	Dose dobrada (n=58)	Dose de reforço (n=57)	Total
Respondeu questionário (n, %)	54 (94,7%)	54 (93,1%)	52 (91,2%)	160 (93,0%)
Participantes com Eventos adversos (n)	21	18	20	59
Eventos adversos (n)	31	28	27	86
Participantes com Reações adversas (n)	16	17	17	50
Reações adversas (n)	21	24	23	68

Dentre as 68 reações adversas, 53 eram de intensidade leve (77,9%), 14 eram de intensidade moderada (20,6%) e uma era de intensidade grave (1,5%).

A única reação adversa com intensidade grave foi fadiga relatada no grupo da dose dobrada da vacina. Não houve registro de reação adversa séria com necessidade de ida ao pronto socorro ou hospitalização.

Dor no local da administração da vacina foi a reação adversa local mais frequente nos três grupos, sem diferença estatisticamente significativa. Houve único relato de edema no local da administração da vacina no grupo da dose dobrada. Em relação às reações adversas sistêmicas, não houve diferença na incidência entre os três grupos.

Além da análise de segurança da população mITT, realizou-se análise adicional da população PP que também não mostrou diferenças significativas da incidência de reações adversas solicitadas entre os grupos (Tabela 17).

O detalhamento geral da ocorrência dos eventos adversos e reações adversas solicitados e não solicitados com suas intensidades em cada grupo de vacinação está apresentado nos Apêndices G - I.

Tabela 17 - Frequencia de reações adversas solicitadas nos três primeiros dias após a primeira vacinação entre os transplantados renais por grupo de vacinação nas análises mITT e PP.

	Análise mITT (n=172)							Análise PP (n=120)						
	Dose padrão (n=57)		Dose dobrada (n=58)		Dose de reforço (n=57)		p**	Dose padrão (n=44)		Dose dobrada (n=44)		Dose de reforço (n=32)		p**
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	
Respondeu avaliação	54	94,7	54	93,1	52	91,2	0,763	43	97,7	42	95,5	29	90,6	0,368
Eventos locais														
Dor	9	15,8	11	19,0	11	19,3	0,865	7	16,3	7	16,7	7	24,1	0,654
Eritema	-	-	-	-	-	-	NP	-	-	-	-	-	-	NP
Inchaço	-	-	1	1,7	-	-	0,372	-	-	-	-	-	-	NP
Enduração	-	-	-	-	-	-	NP	-	-	-	-	-	-	NP
Equimose	-	-	-	-	-	-	NP	-	-	-	-	-	-	NP
Eventos sistêmicas														
Calafrio	2	3,5	3	5,2	2	3,5	0,873	2	4,7	4	9,5	0	0,0	0,205
Febre	-	-	2	3,4	1	1,8	0,369	1	2,3	1	2,4	1	3,4	0,951
Cefaleia	1	1,8	2	3,4	2	3,5	0,818	2	4,7	-	-	2	6,9	0,262
Fadiga	2	3,5	1	1,7	3	5,3	0,586	3	7,0	1	2,4	1	3,4	0,562
Mialgia	2	3,5	2	3,4	2	3,5	>0,999	2	4,7	1	2,4	2	6,9	0,665

NP: não foi possível calcular; ** Teste qui-quadrado; - significa ausência de evento.

5.4.2 Avaliação após a segunda vacinação

Nos três primeiros dias após a segunda vacinação, foram nove eventos adversos referidos por seis participantes (sete reações adversas e 2 eventos adversos não relacionados à vacina). Todos os eventos foram de intensidade 1 ou 2, não tendo registro de evento adverso sério neste período. Cinco participantes referiram um único evento adverso enquanto um participante referiu quatro eventos adversos. Dor no local da administração da vacina foi a queixa mais frequente relatada por três dos cinco participantes (60%) e a única reação adversa local.

Um dos participantes que referiu ter tido dor no local da administração da vacina também referiu cefaléia e fadiga nos dois primeiros dias após a vacinação e sudorese apenas no primeiro dia após a vacinação. Um dos cinco participantes (20%) referiu mialgia nos três dias após a vacinação. Um dos cinco participantes (20%) referiu disfonia caracterizada como laringite e odinofagia no terceiro dia após a vacinação.

5.4.3 Vigilância até o término do estudo

A partir do quarto dia após a primeira vacinação até a conclusão do período de vigilância de 26 semanas de seguimento para cada participante, foram registrados 39 eventos adversos sérios por hospitalização não relacionados à vacina: 14 no grupo da dose padrão, 19 no grupo da dose dobrada e 6 no grupo da dose de reforço. Destes, 17 dos 39 eventos sérios (43,6%) eram relacionados ao trato urinário, onde 12 eram pielonefrites (70,6%). O detalhamento destes eventos sérios e seus desfechos se encontram no Apêndice J.

5.5 Desfechos clínicos

5.5.1 Influenza

Durante os contatos telefônicos de vigilância de influenza, foram identificados 52 dos 176 transplantados renais (29,5%) com quadro respiratório agudo. A Tabela 18 mostra a distribuição de participantes dos três grupos de transplantados renais referindo pelo menos 2 sintomas respiratórios durante 26 semanas de vigilância de influenza.

Tabela 18 - Distribuição de sintomáticos respiratórios nos três grupos transplantados renais durante as 26 semanas de vigilância de influenza

Contato Telefônico de Vigilância de Influenza (CI)	Dose padrão	Dose dobrada	Dose de reforço	TOTAL
CI1: D21 +2 semanas (+5d)	5	5	3	13
CI2: D21+6 semanas (+5d)	5	0	0	5
CI3: D21+10 semanas (+5d)	4	1	4	9
CI4: D21+14 semanas (+5d)	5	4	2	11
CI5: D21+18 semanas (+5d)	2	1	3	6
CI6: D21+22 semanas (+5d)	3	1	3	7
CI7: D21+26 semanas (+5d)	1	0	0	1
TOTAL	25	12	15	52

Dos 52 participantes com quadro respiratório agudo, 14 (27%) foram avaliados e realizaram swab nasal para detecção de vírus Influenza. Destes 14 pacientes, seis (43%) foram submetidas à radiografia de tórax, com resultado anormal em três.

Foram confirmados três casos (21%) de Influenza A não H1N1. Verificou-se que um dos casos positivos (caso 1) já apresentava quadro respiratório um dia antes de sua inclusão no estudo, porém o quadro respiratório só foi referido posteriormente. A média do tempo entre a vacinação e o início dos sintomas para os 13 participantes cujos sintomas respiratórios iniciaram após a

vacinação foi de 72 dias ($\pm$ 52 dias) com mediana de 70 dias (9 – 146 dias). Destes, o início de sintomas respiratórios foi 9 dias pós-vacinação para caso 2 e 20 dias pós-vacinação para caso 3.

Seis dos 14 participantes (43%) receberam tratamento empírico com oseltamivir. Destes, quatro (67%) também receberam antibiótico concomitante. Os três pacientes com diagnóstico confirmado de influenza haviam sido prescritos com tratamento empírico com oseltamivir. O caso 1 recebeu prescrição de oseltamivir, mas não realizou o tratamento; a média de duração do tratamento com oseltamivir para os outros dois casos confirmados de influenza foi de 12 dias ($\pm$ 7 dias) com mediana de 12 dias (7 – 17 dias). O Quadro 1 resume as características clínico-laboratoriais dos casos confirmados de influenza.

Quadro 1. Características de casos confirmados de influenza

	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Grupo de vacinação	Dose padrão	Dose de reforço	Dose de reforço
Idade (anos)	40	56	52
Tempo de transplante (meses)	19,2	7,9	22,8
Vacinação (D0)	14/05/14	07/05/14	30/04/14
Início de sintomas em relação a D0	13/05/14 (D -1)	16/05/14 (D9)	20/05/14 (D20)
Swab nasal	24/05/14	21/05/14	21/05/14
Radiografia de tórax	23/05/14 – alterado	19/05/14 – normal	23/05/14 – normal
Início do tratamento	Não tomou	16/05/14	21/05/14
Swab nasal de controle	–	28/05/14 positivo 02/06/14 negativo	26/05/14 negativo
Término do tratamento	–	05/06/14	28/05/14
Título anticorpos HI pré-vacinação			
Influenza A H1N1	1/320	1/40	1/160
Influenza A H3N2	1/10	1/10	1/40
Influenza B	1/80	1/40	1/320
Título de anticorpos HI no D21			
Influenza A H1N1	1/320	1/40	1/160
Influenza A H3N2	1/160	1/160	1/320
Influenza B	1/320	1/160	1/640

5.5.2 Rejeição do enxerto

Foram identificados 11 casos de rejeição aguda do enxerto renal definidas por biópsia renal: cinco (5/57, 8,8%) no grupo da dose padrão, dois (2/58, 3,4%) no grupo da dose dobrada e quatro (4/57, 7,0%) no grupo da dose de reforço, sem diferença estatisticamente significativa. Houve progressão para rejeição crônica em 2 dos 4 participantes do grupo de dose de reforço durante as 26 semanas de seguimento (Tabela 19).

O tempo entre o transplante e diagnóstico de rejeição aguda do enxerto variou de 84 (2,8 meses) a 1671 dias (55,7 meses), com mediana de 278,5 dias (9,28 meses) . A média foi de 480 dias (16,0 meses) com desvio padrão de $\pm 532,73$ dias (17,76 meses).

O tempo entre a vacinação e o diagnóstico de rejeição aguda do enxerto variou de 12 a 155 dias, com mediana de 84 dias. O tempo médio foi de 84,25 dias (2,80 meses) (DP $\pm 1,73$ meses).

Tabela 19 - Distribuição do número de casos de rejeição aguda e crônica nos três grupos de transplantados renais diagnosticados durante 26 semanas de seguimento

VARIÁVEIS	Dose padrão (n=57)		Dose dobrada (n=58)		Dose de reforço (n=57)		p*
	nº	%	nº	%	nº	%	
Rejeição Aguda	5	8,8	2	3,4	4	7,0	0,493
Celular	2		0		2		
Humoral	1		2		0		
Plasmócitos	0		0		1		
Ignorado	2		0		1		
Rejeição Crônica	0	0,0	0	0,0	2	3,5	0,130

6 DISCUSSÃO

Desenho

Realizou-se um ensaio clínico piloto randomizado e controlado para avaliar a imunogenicidade e segurança de uma dose dobrada e uma dose de reforço da vacina de influenza trivalente da campanha de prevenção contra a influenza de 2014 em população de transplantados renais em acompanhamento no STR-HCFMUSP.

Nosso estudo possui um desenho complexo se comparado a outros estudos publicados na literatura, uma vez que compara quatro grupos de pacientes, sendo três grupos de transplantados renais e um grupo controle de adultos sadios trabalhadores da saúde, avalia simultaneamente dois esquemas de vacinação experimentais, e possui dois grupos de controle que receberam a dose padrão da vacina, um composto por imunodeprimidos transplantados renais e o outro por adultos sadios. Mesmo os estudos de publicação mais recentes avaliaram apenas a dose de reforço em relação à dose padrão ou a alta dose da vacina em relação à dose padrão em pacientes TOS, e sem grupo controle de indivíduos sadios(55,84,85).

População

Não foi realizado cálculo amostral para avaliação da imunogenicidade dos esquemas vacinais para o nosso estudo uma vez que a intenção era de se conduzir um ensaio clínico piloto de caráter exploratório. Foi optado por determinar o tamanho amostral de acordo com as recomendações da EMA com a inclusão de no mínimo 50 participantes por grupo de esquema vacinal, com estimativa de perda de 20%. Em relação à amostra pretendida, recrutou e randomizou-se 97,8% dos transplantados renais e 100% dos adultos sadios em três meses. Houve uma perda total de 11,9% dos transplantados renais particularmente por perda de seguimento e retirada de TCLEs. Considerou-se que o tamanho amostral de nosso estudo piloto foi adequado e representativo uma vez que a taxa de perda foi baixa e não atingiu os 20% que podem comprometer de forma mais crítica a validade dos resultados. Conforme esperado, ocorreu maior oportunidade de desvios de protocolo e perda de seguimento no grupo da dose de reforço, pois é um grupo que teve duas

intervenções e maior tempo de seguimento em relação aos outros, o que resultou no menor número de transplantados renais do grupo da dose de reforço na análise PP (55,2%) comparado aos grupos que receberam a dose padrão e dobrada da vacina (74,6% para cada grupo) e aos adultos sadios (86,7%).

Referente a homogeneidade dos grupos de transplantados renais, a única diferença das variáveis sócio-demográficas foi na distribuição do sexo na análise mITT e foi discreta. No que concerne à análise PP, todas as variáveis tiveram distribuição semelhante. Em relação às variáveis clínicas, as únicas variáveis com diferença estatística entre os grupos foi o menor uso de terapia de indução nas análises mITT e PP e o menor uso de prednisona na análise mITT no grupo de pacientes que recebeu a dose dobrada da vacina. Sabe-se que a terapia de indução tem maior impacto de imunossupressão nos primeiros seis a doze meses pós-transplante com perda de relevância após este período(84,85,87). Portanto, não se considerou a diferença apresentada como fator impactante nas análises.

O nosso grupo de adultos sadios foi significativamente mais jovem do que os transplantados renais e teve predominância de participantes do sexo feminino. Isto ocorreu uma vez que incluímos como controles trabalhadores da saúde do HCFMUSP particularmente do departamento de moléstias infecciosas e parasitárias onde a maioria dos funcionários é do sexo feminino. Outros estudos que incluíram trabalhadores de saúde como grupo controle também relataram participantes mais jovens e predominância de mulheres neste grupo, em relação aos grupos de transplantados renais ou indivíduos sob hemodiálise(93,95). Em relação ao histórico de vacinação no ano de 2013, os trabalhadores de saúde tiveram melhor adesão à vacinação provavelmente por estarem mais frequentemente no hospital durante as campanhas de vacinação com ampla disponibilidade da vacina nas áreas de circulação do hospital, por ter melhor consciência dos benefícios da vacinação, pela cobrança constante de atualização vacinal e da responsabilidade na prevenção da influenza.

Imunogenicidade

Em relação às análises de imunogenicidade, elegemos a soroconversão como o principal desfecho de imunogenicidade por ser um parâmetro mais fidedigno do efeito biológico da vacina e também por ser o critério mais dificilmente alcançado para as vacinas de influenza conforme mostrado na literatura. Em nosso estudo, as taxas globais de soroconversão em transplantados renais e adultos saudáveis foram 20,0% e 23,1% para A/H1N1; 26,7% e 15,4 % para A/H3N2; e 25% e 23,1% para influenza B, respectivamente.

As taxas de soroconversão do nosso estudo ficaram abaixo do preconizado pelo EMA, tanto no grupo de pacientes transplantados renais como no grupo de indivíduos controles saudáveis. Mesmo avaliando apenas a taxa de soroconversão nos pacientes transplantados renais, onde espera-se que a imunogenicidade à vacina seja menor pela imunossupressão, as taxas de soroconversão foram extraordinariamente menores do que as relatadas na literatura com destaque das taxas encontradas para A/H1N1 no grupo de transplantados renais que recebeu a dose padrão da vacina trivalente de 8,5% e 9,1%, nas análises por mITT e PP, respectivamente. Estas taxas foram inferiores às taxas observadas em transplantados renais após a vacina trivalente nos estudos de Salles et al., Scharpe et al. e Smith et al. que variaram de 30% a 36%(68,92,94). Inclusive, estas taxas foram mais baixas do que as relatadas no estudo Brasileiro de Miraglia et al. que avaliou a dose padrão da vacina monovalente A/H1N1pdm09 não adjuvantada também fabricada pelo Instituto Butantan com resposta de 31,8% nos transplantados renais(90). Na população de indivíduos saudáveis, a baixa taxa de soroconversão encontrada não era esperada, visto que a maioria dos estudos de imunogenicidade da vacina trivalente em adultos saudáveis têm mostrado resposta vacinal em torno de 90%(92,98,118), com exceção do estudo de Scharpe et al., que mostrou taxas de soroconversão baixas variando de 27,5% a 45% em adultos saudáveis(68).

As menores taxas de resposta vacinal em nossa população de estudo em relação à literatura pode ser justificada por cepas vacinais menos imunogênicas naquele ano de 2014. Em estudos avaliando a imunogenicidade

das vacinas de influenza sazonal trivalente fabricados pelo Instituto Butantan dos anos de 2013, 2014 e 2015 em adultos entre 18 e 59 anos de idade e idosos acima de 60 anos de idade, para a vacina do ano de 2014 semelhante à utilizada no nosso estudo, Mondini et al. encontraram taxas de soroconversão abaixo do preconizado pela EMA para todas as cepas vacinais. As taxas de soroconversão no mesmo estudo em relação às taxas de nosso grupo controle foram: A/H1N1 - 38,6% versus 23,1%; A/H3N2 - 31,6% versus 15,4% e B - 17,5% versus 23,1%, respectivamente. Portanto, a partir deste estudo, sugeriu-se que a vacina de 2014 induziu menores taxas de soroconversão para todas as cepas de vírus vacinais do que as vacinas de 2013 e 2015.

As baixas taxas de soroconversão em nossa população também podem estar relacionadas a altos títulos de anticorpos na pré-vacinação decorrentes de vacinações prévias uma vez que estudos mostram associação inversa entre títulos de anticorpos na pré-vacinação e a soroconversão e/ou o aumento de RMG na avaliação pós-vacinação (82,118,119). Em nossa população de estudo, a proporção de participantes com títulos $\geq 1:40$ antes da vacinação foi maior que 50% para todas as cepas vacinais em todos os quatro grupos, exceto para A/H3N2 no grupo que recebeu a dose dobrada da vacina cuja taxa foi de 47,5%. Inclusive, esta proporção foi maior que 50% para todas as cepas na análise PP. De acordo com a literatura, espera-se uma subestimação das taxas de soroconversão ou RMG em indivíduos cujos títulos de anticorpos na pré-vacinação já se encontravam acima de 1:40 (79,82,90). Um estudo de Maryam et al. encontrou associação entre vacinação prévia e menor aumento nos títulos de anticorpos para A/H1N1 e A/H3N2 na análise univariada(119). Nessa mesma linha, os títulos de anticorpos pré-vacinação $< 1:40$ foram independentemente associados com aumento da prevalência de soroconversão para todas as cepas vacinais nas análises bivariada e multivariada em nosso estudo. Portanto, dada a proporção elevada de indivíduos soroprotetidos na pré-vacinação e os resultados das análises múltiplas, infere-se que as altas taxas de soroproteção pré-vacinação contribuíram às baixas taxas de soroconversão. Uma hipótese levantada pelo Smith et al. do mecanismo que leva à associação inversa entre títulos de anticorpos na pré-vacinação com a soroconversão foi a possível neutralização

dos antígenos vacinais pelos anticorpos pré-existentes, reduzindo o estímulo antigênico e, conseqüentemente, a resposta humoral(96).

No estudo de Mondini et al., o impacto do título de anticorpos pré-vacinação na soroconversão não obteve significância estatística para A/H1N1 em adultos e os autores sugeriram efeito heterogêneo deste fator, uma vez que este mesmo fator teve associação independente com soroconversão às cepas A/H3N2 e B(118). Além disso, estudos mostram imunogenicidade variável de cada cepa da vacina trivalente, também resultando em eficácias/efetividades heterogêneas das vacinas de influenza(12,71,89,110,111).

Em relação à soroproteção, a taxa de soroproteção de 70% preconizada pela EMA foi alcançada para todas as cepas vacinais nos quatros grupos de vacinação na análise PP, assim como no estudo de Mondini et al.(118). Entre os transplantados renais, as menores taxas de soroproteção na avaliação pós-vacinação foram no grupo que recebeu a dose padrão da vacina, demonstrando melhor desempenho da dose dobrada e da dose de reforço conforme previamente descrito(55,85). Houve melhora significativa da imunogenicidade com a dose de reforço comparado à dose padrão da vacina para a cepa A/H3N2 (96,9% versus 70,5%, $p=0,003$).

Como esperado, a dose padrão da vacina resultou em maior proporção de soroprotegidos em adultos saudáveis do que nos transplantados renais que receberam a mesma dose, embora sem significância estatística. Este fato é justificado por fatores biológicos relacionados à imunossupressão nos transplantados renais conforme mostrado em estudos prévios(72,92). Um estudo mostrou que a imunossupressão reduz a resposta celular humoral assim como a indução de linfócitos T memória em transplantados renais após a vacinação de influenza. Em comparação a adultos saudáveis pareados para idade e cor, os transplantados renais apresentaram menores títulos de anticorpos pelas técnicas de ELISA e microneutralização. A secreção de IgG específica para influenza foi reduzida em 9,1 vezes em comparação aos adultos saudáveis, embora sem diferença de títulos de anticorpos pela técnica de inibição de hemaglutinação. Os transplantados renais também tiveram uma produção de IFN- γ aproximadamente 10 vezes menor e com muita variabilidade. Não houve

correlação entre os títulos de anticorpos e a magnitude de produção de IFN- γ específica para influenza entre transplantados renais, sugerindo efeito independente dos imunossupressores na supressão dos linfócitos B e T. Os títulos de anticorpos e IFN- γ não foram afetados pelo nível sérico de tacrolimus(120).

O nosso estudo assim como a literatura demonstram que a soroproteção é critério de eficácia vacinal mais facilmente alcançável do que a soroconversão (68,79,82,95). Descreve-se na literatura uma associação direta entre título de anticorpos na pré-vacinação com a soroproteção na avaliação pós-vacinação (68,82,118,119); nossos dados também demonstraram uma alta prevalência de soroproteção basal pre-vacinação nos indivíduos estudados. No estudo de Scharpe et al., a maior prevalência de soroproteção basal em transplantados renais decorrente da indicação de vacinação anual influenciou na melhor soroproteção nestes indivíduos comparado aos adultos sadios que não recebiam vacina rotineiramente(68). Pérez-Romero et al. também demonstraram que vacinar indivíduos com doença renal crônica conforme recomendado aumenta os títulos de anticorpos basais, favorecendo soroproteção adequada após vacinação mesmo no período pós-tranplante precoce(67).

Em nosso estudo, embora sem significância estatística, as taxas de soroproteção e as MGT para A/H3N2 e Influenza B foram maiores nos adultos sadios do que nos três grupos de transplantados renais na avaliação pré-vacinação nas análises ITT e PP. Este achado pode significar resposta mais robusta às vacinas anuais com títulos de anticorpos mais elevados e/ou maior durabilidade dos anticorpos em relação aos transplantados renais. A manutenção de níveis elevados de anticorpos por maior período de tempo significa maior duração da proteção(55,98).

Em relação às RMGs, na análise mITT, o grupo que recebeu a dose de reforço da vacina foi o único a alcançar RMG > 2,5 para todas as cepas vacinais conforme preconizado pela EMA. Na análise PP, este achado foi verdadeiro apenas para A/H3N2, mas o grupo da dose de reforço da vacina manteve as melhores RMG em relação aos outros grupos de tratamentos,

inclusive do que o grupo controle. Em ambas as análises, mITT e PP, notou-se um aumento crescente das RMG com a dose dobrada e com a dose de reforço da vacina para A/H1N1 e A/H3N2 entre transplantados renais, sugerindo melhor resposta às doses experimentais em relação à dose padrão da vacina. Novamente, os transplantados renais que receberam a dose de reforço da vacina tiveram melhor RMG do que o grupo controle, embora sem significância estatística, sugerindo superioridade deste esquema vacinal.

Em relação à avaliação dos diferentes esquemas de vacinação estudados, a dose de reforço da vacina teve melhor desempenho para soroconversão em comparação às doses dobrada e padrão da vacina para todas as cepas, tanto nas análises mITT como PP, embora essa diferença tenha sido estatisticamente significativa apenas para a resposta à cepa A/H1N1. Inclusive, as taxas de soroconversão para todos os vírus foram maiores no grupo de transplantados renais que receberam a dose de reforço da vacina do que no grupo controle de adultos saudáveis, sem significância. O benefício de aumento da soroconversão com a dose de reforço em relação à dose padrão da vacina foi demonstrada também no estudo TRANSGRIPE onde as taxas foram 53,8% após dose de reforço e 37,6% após dose padrão na análise PP(55). Estes achados sugerem superioridade da dose de reforço em relação aos outros esquemas de vacinação.

Quanto aos indivíduos que não apresentaram soroconversão ou soroproteção mesmo após a dose de reforço da vacina, são necessários estudos adicionais para melhor compreensão dos mecanismos imunobiológicos que impedem a resposta vacinal. A teoria do pecado antigênico original (*original antigenic sin*) tem sido proposto como possível mecanismo de resposta inadequada às vacinas de influenza. Nesta teoria, a primeira exposição aos antígenos de Influenza, seja por infecção natural ou imunização, resulta em resposta e memória imunológicas mais marcadas e específicas para estes antígenos, de tal forma que ocorre replicação deste mesmo padrão de resposta imune nas infecções ou imunizações subsequentes. Portanto, a resposta imune a vírus antigeneticamente distintos aos `originais` acaba sendo

menos potente e ineficaz. Talvez este efeito seja mais marcante para os subtipos de Influenza A pela maior capacidade mutagênica(1,79,82).

Fatores associados à resposta vacinal

Referente às metodologias utilizadas na avaliação dos fatores associados à resposta às vacinas de influenza trivalente, existem divergências nos desenhos e nas análises na literatura. Alguns autores avaliaram os fatores de risco para o desfecho de soroconversão, soroproteção ou ambos a pelo menos uma cepa da vacina trivalente(84,85,87,94,104), enquanto que outros avaliaram de forma minuciosa os fatores de risco para soroconversão, soroproteção ou ambas a todas as cepas componentes da vacina(55,68,97), semelhante à análise realizada no nosso estudo. Resultados de estudos prévios mostram resposta imunológica heterogênea às cepas componentes da vacina de influenza trivalente e os fatores de risco para resposta também são variáveis, tornando complexo a compreensão e interpretação das reais interações envolvidas entre os fatores de risco encontrados e a resposta vacinal (12,71,89,110,111).

No presente estudo, incluiu-se 20 variáveis potencialmente preditoras de soroconversão nas análises bivariadas para cada cepa vacinal, com exploração de fatores de risco pouco avaliados nos estudos publicados até o momento. A seguir discute-se os resultados das análises bivariada e multivariada dos fatores sócio-demográficos e clínico-laboratoriais.

Em relação aos fatores sócio-demográficos, não encontramos associação entre cor, sexo ou idade e a soroconversão nas análises bivariadas ou multivariadas para nenhuma cepa de vacinal em nosso estudo. Nenhum estudo achou associação entre cor e resposta vacinal. De fato, não esperaríamos alguma associação biologicamente plausível entre a cor e a resposta vacinal.

Em relação ao sexo, o único estudo que mostrou associação do sexo feminino com aumento de soroconversão foi o estudo brasileiro de Azevedo et al., também realizado em nosso centro sugeriu maior chance de soroconversão em mulheres comparado aos homens, mas este achado não foi confirmado em

nosso estudo e outros estudos na literatura também não encontraram a associação entre sexo e soroconversão(85,95,121).

A idade avançada é demonstrada como fator negativo para soroconversão ou soroproteção em alguns estudos embora com variação no corte da idade estudos(72,90,95,106). Azevedo et al. relataram menor soroconversão em transplantados renais acima de 60 anos de idade, embora sem significância estatística(91). O mesmo achado foi relatado no estudo de Felldin et al., onde os não respondedores eram mais velhos em relação aos respondedores, com idade média de 61 e 54 anos, respectivamente(72). No estudo de Mulley et al., uma análise estratificada de 131 transplantados renais com títulos de anticorpos $< 1:40$ antes da vacinação demonstrou que cada 10 anos de aumento na idade reduziu a soroproteção ($ORa=0,70$; $IC95\%=0,49-0,0996$; $p=0,047$) (95). Um estudo na população geral mostrou que a imunosenescência em indivíduos idosos (62-92 anos de idade) contribuiu para redução da resposta vacinal (medidas de MGT à primeira vacinação em relação aos adultos jovens (16-39 anos de idade), mas após vacinações múltiplas durante quatro anos de estudo, o efeito negativo da idade não se manteve. Indivíduos muito idosos (84-94 anos de idade) tiveram resposta vacinal semelhante aos relativamente mais jovens (60-83 anos de idade). Sugeriu-se, então, que o impacto da imunosenescência após 60 anos de idade é semelhante entre indivíduos idosos e que o histórico de vacinação ou influenza prévia também influencia na resposta vacinal(117). Assim como Fairhead et al.(70), Crespo et al.(121) e Broeders et al.(93) não encontramos a associação entre idade e soroconversão em nosso estudo.

Em relação aos fatores clínico-laboratoriais, em nosso estudo, não encontramos associação entre a soroconversão e os seguintes fatores: tipo de doador, esquema de imunossupressão, número de drogas no esquema de imunossupressão, uso de inibidor de calcineurina, uso de inibidor de mTOR, nível sérico de tacrolimus, nível sérico de testosterona, nível sérico de hemoglobina, nível sérico de albumina e linfócitos totais.

Crespo et al. também analisaram o impacto de uma lista extensa de variáveis como idade, sexo, albumina sérica, peso, TFG, proteinúria,

hemoglobina, leucócitos, ferritina, hormônio paratireoideano, nível sérico de vitamina D, tempo pós-transplante, uso de corticóide, uso de tacrolimus ou ciclosporina, uso de micofenolato, e nível sérico de tacrolimus ou ciclosporina na soroconversão à A/H1N1. Neste estudo, apenas tempo pós-transplante teve associação com a soroconversão, onde indivíduos com tempo médio de oito anos pós-transplante obtiveram soroconversão enquanto que os com quatro anos não obtiveram resposta adequada(121).

A literatura sugere que o tipo de doador não seja fator de risco importante para resposta vacinal, pois de todos os estudos revisados, apenas o estudo de Salles et al. mostrou associação independente entre enxerto proveniente de doador falecido com a soroconversão (OR=4,62; IC95%=1,36-15,69; p=0,014) e a soroproteção (OR=6,29; IC95%=1,89-20,98; p=0,003) para A/H1N1pdm09. No entanto, os autores justificaram estes achados por maior uso de micofenolato em transplantados de doadores falecidos (56,8%) comparado aos de doadores vivos (44,1%)(122).

A hemoglobina normal é um fator que corrobora melhor estado de saúde(69) e anemia é um evento frequente em pacientes transplantados em decorrência de múltiplos fatores como comorbidades, toxicidade por drogas como imunossupressoras, e infecções. Entretanto, outros autores não encontraram associação de níveis de hemoglobina com resposta vacinal (105,121), à semelhança do nosso estudo.

Níveis normais de albumina significam bom estado nutricional que é favorável à função imunológica geral(69,89). No entanto, não encontramos associação com soroconversão em nosso estudo, semelhante aos achados de Crespo et al.(121) e Quintana et al.(105). Um estudo realizado com idosos, que também são um grupo de risco para influenza complicada, mostrou redução da resposta vacinal em idosos desnutridos na análise univariada, embora sem significância estatística(123).

Em nosso estudo, não encontramos associação entre níveis de linfócitos e a soroconversão. Na literatura encontrada, estudos de resposta vacinal em receptores de TCTH são os únicos a avaliar associação entre níveis de

linfócitos com resposta humoral e celular. No estudo de Karras et al., contagem elevada de linfócitos B favoreceu a soroconversão, enquanto que a contagem de linfócitos T não teve impacto na soroconversão(103). Explica-se este achado pelo fato de que os linfócitos B são necessários para a produção anticorpos e a avaliação da resposta imune à vacina mede a resposta predominantemente humoral, portanto o impacto da resposta celular pode estar subestimado(104). O estudo de Lindemann et al, avaliou o impacto da imunossupressão na resposta imune celular e mostrou uma correlação positiva entre níveis de linfócitos CD4 com resposta celular medida no teste de transformação linfocitária (LTT) e ELISpot(75).

Em nosso estudo, não coletamos dados referentes às comorbidades nos transplantados renais. Quintana et al. relataram que diabetes mellitus e estado sorológico para HIV não tiveram associação com soroconversão(105). No estudo de Salles et al., as doenças renais primárias (glomerulonefrite, nefroesclerose, nefrite intersticial e pielonefrite crônica) também não tiveram associação com soroproteção ou soroconversão(94). No estudo de Cordero et al., presença de doença cardiovascular, hepatopatias e doença pulmonar obstrutiva crônica não afetaram a soroproteção à vacina de influenza(55).

Os seguintes fatores tiveram associação com a soroconversão em nosso estudo: dose da vacina, título de anticorpos na avaliação pré-vacinação, retransplante, uso de micofenolato, tempo pós-transplante e creatinina sérica.

A dose da vacina tem sido descrito como fator importante para resposta a soroconversão e soroproteção em vários estudos(55,71,84,85,89). Em nosso estudo, a dose de reforço no esquema de duas doses sequenciais apresentou significativamente melhor desempenho do que a dose dobrada e dose padrão da vacina. Na análise bivariada, a dose de reforço significativamente aumentou a chance de soroconversão para as cepas vacinais de Influenza A/H1N1 e A/H3N2, sem nenhuma associação com a cepa Influenza B. Na análise multivariada, a dose de reforço foi independentemente associada à soroconversão para A/H3N2 apenas onde significativamente aumentou em 2,99 vezes a prevalência de soroconversão.

Em relação aos estudos avaliando a dose de reforço da vacina em receptores de TOS, Cordero et al avaliaram os fatores de risco para soroconversão e soroproteção às três cepas de vírus vacinais. Na análise mITT, a dose de reforço da vacina apresentou associação com soroconversão para Influenza B apenas (OR=2,10; IC95%=1,01-4,40; $p<0,05$). Nesta mesma análise, houve associação da dose de reforço com soroproteção à todas as três cepas vacinais A/H1N1 (OR=1,50; IC95%=1,03-2,25; $p<0,05$), A/H3N2 (OR=1,56; IC95%=1,04-2,34; $p<0,05$) and Influenza B (OR=1,93; IC95%=1,19-3,14; $p<0,01$), mas esta não se manteve após ajuste para confundidores como idade, sexo, comorbidades, vacinação prévia, tempo pós-transplante, tipo de órgão transplantado, uso de dose alta de micofenolato, uso de tacrolimus e uso de estatinas. Manteve-se após ajustes associação com soroproteção a pelo menos uma cepa (OR=1,92; IC95%=1,14-3,18; $p<0,05$) ou duas cepas vacinais (OR=2,26; IC95%=1,49-3,45; $p<0,001$). Na análise por protocolo, a dose de reforço teve associação independente com soroconversão com taxas acima de 40% para todas as cepas vacinais(55). O estudo da dose de reforço em receptores TCTH alogênica por Karras et al. não mostrou superioridade deste esquema vacinal em relação à dose padrão da vacina na soroconversão e soroproteção tanto na avaliação humoral como de resposta celular de linfócitos T(104). Le corre et al. também não descreveram benefício da dose de reforço para resposta à vacina monovalente A/H1N1pdm09(106).

A dose dobrada da vacina não teve associação significativa com soroconversão a nenhuma cepa vacinal. A cepa Influenza B não foi afetada pela dose da vacina, restando a necessidade de investigação de fatores intrínsecas específicas dos subtipos de Influenza que provocam esta heterogeneidade de resposta vacinal.

Em relação à aplicação em dose única dobrada com alta dose antigênica da vacina em receptores de TOS, no estudo de Mombelli et al., que utilizou dose dobrada de uma vacina com componentes semelhantes aos da vacina utilizada na campanha de vacinação de influenza do ano de 2014 no Brasil, não houve associação entre a dose dobrada da vacina e a soroconversão a pelo menos uma cepa vacinal (OR=1,93; IC95%=0,74-5,04; $p=0,177$), mas

todas as taxas de soroproteção foram adequadas com esta dose da vacina, assim como em nosso estudo.(85) Já no estudo de Natori et al., a dose quadruplicada da vacina teve associação independente com a soroconversão a pelo menos uma cepa vacinal (OR=3,23; IC95%=1,56 – 6,67; p=0,002), sem diferença significativa nas taxas de soroproteção entre os grupos(84). Em estudo de alta dose da vacina em portadores de neoplasias sólidos e hematológicos, Jamshed et al. encontraram significativamente maior taxa de soroconversão para as três cepas de vírus vacinal com a dose quadruplicada do que com a dose padrão da vacina, sem diferença nas taxas de soroproteção. Em estudo de alta dose da vacina em receptores TCTH, Halasa et al. encontraram maior taxa de soroproteção para A/H3N2 com a dose quadruplicada do que com a dose padrão da vacina, 81% versus 36%, respectivamente (p=0,004)(101). Em ambos os estudos, não foram estudados fatores de risco adicionais para resposta vacinal. Não foram encontrados estudos comparando as doses dobradas com as doses quadruplicadas da vacina.

Apesar da dose antigênica final ser de 30 microgramas de hemaglutinina no esquema de administração de uma única dose dobrada da vacina ou na administração de duas doses com intervalo de 21 dias entre as mesmas, o esquema de administrar uma dose de reforço da vacina teve melhor desempenho na soroconversão. Uma explicação para este achado pode ser o mecanismo de sensibilização antigênica de linfócitos T de memória desencadeada com a primeira dose da vacina, e quando administrada a dose de reforço sequencial, espera-se uma resposta maior. Esta estratégia é a utilizada na primeira imunização da população pediátrica dos nunca vacinados(64). No entanto, autores como Mombelli e Natori consideram a administração de alta dose da vacina em única visita uma estratégia mais vantajosa do que a utilização de dose de reforço uma vez que a segunda estratégia requer duas visitas ao centro de imunização, o que aumentar o risco de perdas e esquemas incompletos(84,85).

O título de anticorpos na avaliação pré-vacinação foi independentemente associado à soroconversão para todas as três cepas de vírus vacinais. A

associação inversa entre títulos de anticorpos pré-vacinação e as taxas de soroconversão e aumento da RMG foi demonstrada por Mondini et al. em análise de dois subgrupos de adultos, estratificados de acordo com os títulos de anticorpos pré-vacinação $\geq 1:40$ ou $< 1:40$. Os adultos com títulos de anticorpos $\geq 1:40$ antes da vacinação apresentavam menores taxas de soroconversão do que os adultos com títulos de anticorpos $< 1:40$ para A/H3N2 (20,5% versus 69,2%, $p=0,002$) e Influenza B (10,0% versus 71,4%, $p=0,001$). Embora sem significância estatística, adultos com títulos de anticorpos $\geq 1:40$ antes da vacinação tiveram menor taxa de soroconversão também para A/H1N1 (33,3% versus 66,7%, $p=0,075$). As RMG para as três cepas de vírus vacinais também foram menores em adultos com títulos de anticorpos $\geq 1:40$, com significância estatística(118). No estudo de Cordero et al., títulos de anticorpos $\geq 1:40$, na pré-vacinação tiveram impacto na soroconversão, embora sem significância estatística e na soroproteção para A/H1N1 (OR=2,61; IC95%=1,54-4,4; $p<0,01$) e A/H3N2 (OR=3,01; IC95%=1,78-5,10; $p<0,01$), sem impacto na cepa vacinal B (OR=1,01; IC95%=0,38-2,68; $p=NS$)(55).

Em nosso estudo, ter tido retransplante foi independentemente associado ao aumento de soroconversão para A/H1N1 (RP=3,34; IC95%=1,76-6,33; $p<0,001$) e Influenza B (RP=2,62; IC95%=1,49-4,61; $p<0,001$). Esta associação foi inesperada uma vez que nenhum outro estudo reportou esta associação na literatura encontrada. Azevedo et al. não encontraram associação do retransplante com a soroconversão(91). Alguns estudos avaliaram a proporção de retransplante entre os grupos de estudo, mas não estudaram o impacto deste fator na resposta vacinal(55,87). Esperávamos que, se houvesse associação entre retransplante e resposta imunológica, essa associação fosse negativa, uma vez que pacientes submetidos a retransplante são mais imunossuprimidos que pacientes submetidos ao primeiro transplante renal e costumam receber ATG para terpaia de imunossupressão de indução pelo maior risco imunológico(124). Portanto, uma explicação pode ser que esta variável seja um fator de confusão. Portanto, foi pesquisada interação da variável retransplante com outras covariáveis, e conforme esperado encontrou-se uma associação com terapia de indução onde a proporção de retransplantados foi maior em indivíduos que receberam maiores doses

cumulativas de ATG categorizadas como acima de 240 mg (25,9%) do que em indivíduos que receberam doses cumulativas de até 240 mg (6,3%) e os que não receberam ATG (5,2%) (teste Qui Quadrado $p=0,007$). Não foi encontrado colinearidade entre retransplante e dose da vacina, cor, título de anticorpos na avaliação pré-vacinação, tipo de doador, esquema de imunossupressão, número de drogas no esquema de imunossupressão, uso de micofenolato e tempo pós-transplante.

Em relação à comparação entre os 161 participantes submetidos ao primeiro transplante único e os 15 submetidos a retransplante, o uso de terapia de indução com ATG foi observado em 11 de 15 (73,3%) dos pacientes submetidos a retransplante, comparado a 56 de 161 (34,8%) pacientes submetidos ao primeiro transplante. Em relação as demais variáveis investigadas, a idade foi semelhante e variou de 32 a 62 anos no grupo retransplante e 23 a 63 anos no grupo do primeiro transplante. A proporção do sexo masculino também foi semelhante nos dois grupos, 46,7% no grupo retransplante e 49,7% no grupo do primeiro transplante. A média de tempo pós-transplante não diferiu entre os pacientes submetidos a retransplante ($39,8 \pm 46,5$ meses) ou submetidos ao primeiro transplante renal ($38 \pm 44,7$ meses) e a proporção de pacientes com tempo pós-transplante acima de 180 também foi semelhante 80,1% e 73,3%, respectivamente. A proporção de indivíduos que recebeu a dose de reforço da vacina foi maior em retransplantados, onde oito (53,3%) receberam a dose de reforço da vacina em relação a 51 (31,6%) nos indivíduos com único transplante. Em relação às outras doses da vacina, entre retransplantados quatro (26,7%) receberam a dose padrão e três (20%) receberam a dose dobrada e entre indivíduos com primeiro transplante 54 (33,5%) receberam a dose padrão e 56 (34,7%) receberam a dose dobrada. Portanto, este achado reforça a possibilidade da associação entre retransplante e soroconversão ser resultado de confusão.

Em nosso estudo, a terapia de indução com ATG foi associada à soroconversão a Influenza B na análise bivariada, onde doses de ATG até 240 mg aumentaram as chances de resposta, mas esta associação não se manteve na análise multivariada. Poucos estudos avaliaram o impacto da terapia de

indução na resposta vacinal, uma vez que este efeito é mais intenso nos primeiros seis meses pós-transplante, sem relevância biológica significativa após este período(84,85,87). Portanto, a maioria dos estudos avaliou o impacto de diferentes esquemas imunossupressores utilizados no momento da vacinação na resposta às vacinas de influenza assim como no presente estudo.

Em nosso estudo, não encontramos associação entre número de drogas na terapia imunossupressora de manutenção (imunossupressão dupla, tripla ou quadrupla) ou o esquema de imunossupressão clássica (micofenolato, inibidor de calcineurina e corticoesteróide) em relação a outros esquemas e a soroconversão. No entanto, estudos de Quintana et al., Fairhead et al. e Felldin et al. relataram redução da resposta à vacina monovalente de A/H1N1 com imunossupressão tripla(70,72,105). No estudo de Quintana et al. a taxa de soroconversão nos transplantados renais com imunossupressão tripla contendo micofenolato, inibidor de calcineurina e corticoesteróide foi de 35,3% comparado às taxas de 83,3% em usuários de imunossupressão dupla com micofenolato e inibidor de mTOR, de 71,4% em usuários de micofenolato e inibidor de calcineurina e de 87,5% em usuários de monoterapia com inibidor de calcineurina ou de inibidor de mTOR ($p=0,02$)(105).

Também não encontramos diferença significativa nas taxas de soroconversão entre usuários mTOR e de inibidor de calcineurina em relação aos não usuários destes imunossupressores. Em relação ao inibidor de mTOR, Azevedo et al. relataram que esquemas com sirolimus favoreceram a soroconversão, embora sem significância estatística ($OR=4,43$; $IC_{95\%}$ 0,75-25, $p=0,099$)(91). Semelhante aos resultados de Azevedo et al., as taxas de soroconversão às três cepas no nosso estudo foram discretamente maiores em usuários de inibidor de mTOR em comparação aos pacientes que não faziam uso dessa droga, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Azevedo et al. relataram taxas de soroconversão a A/H1N1pdm09 de 17% e 3,9% em pacientes com e sem uso de inibidor de mTOR, respectivamente. Em nosso estudo, estas taxas para A/H1N1 foram 23,5% e 19,4%, respectivamente. Na casuística de Azevedo et al., como na casuística do presente estudo, o número de pacientes em uso de inibidor de mTOR foi

baixo (8.1% na casuística anterior e 8.7% na casuística atual)(91). Portanto, a baixa proporção de transplantados renais no nosso serviço em uso de inibidor de mTOR podem ter dificultado a demonstração da real associação dessa droga com resposta vacinal. Outro estudo por Willcocks et al. também mostrou maior proporção de títulos protetores para os três antígenos vacinais em transplantados de rim e fígado usuários de sirolimus do que nos que utilizavam inibidor de calcineurina(125).

Em relação aos outros imunossupressores, no estudo por Felldin et al., o uso de tacrolimus foi associado a menor resposta vacinal a A/H1N1, embora sem significância(70). No estudo de Maryam et al., doses elevadas de prednisolona e ciclosporina reduziram a soroproteção a pelo menos um antígeno vacinal, com significância estatística(119). No estudo de Lidemann et al., a prednisona teve correlação negativa significativa com a resposta imune celular. Neste mesmo estudo, o tacrolimus e ciclosporina também exerceram efeito imunossupressor celular, que foi mais intenso com o tacrolimus. Esses autores não estudaram o efeito destes fatores na imunidade humoral já que o estudo era específico para a imunidade celular(75). Semelhante aos achados de nosso estudo, o uso de corticóide e inibidores de calcineurina não tiveram associação com a redução de soroproteção para A/H1N1pdm09 no estudo de Mulley et al.(95).

Em nosso estudo encontramos associação independente entre o uso de minofenolato e a redução da soroconversão para as cepas vacinais A/H1N1 e A/H3N2. O uso de micofenolato tem sido associado à redução de resposta vacinal em vários estudos(68,92,94,95,119). A redução de soroconversão a A/H1N1 foi relatado por Felldin et al.(70) e Azevedo et al.(91), enquanto que Maryam et al(119) relataram redução de soroproteção A/H1N1 e Salles et al(94) relataram redução de soroproteção a A/H1N1 e A/H3N2 com o uso de micofenolato. O estudo de Mombelli et al. mostrou tendência de menor chance de resposta vacinal com o uso de micofenolato, embora sem significância(85). Por fim, o estudo de Cordero et al. não mostrou tendência positiva ou negativa na resposta vacinal com micofenolato na análise multivariada(55). O efeito mais potente de supressão da resposta vacinal pelo micofenolato se dá graças

à sua ação supressora tanto de linfócitos T como da produção de anticorpos por linfócitos B, quando comparado a tacrolimus, azatioprina e ciclosporina cujo efeito prejudica especificamente os linfócitos T(92,119). Smith et al. argumentaram que o efeito do micofenolato na resposta aos antígenos vacinais seja heterogênea, uma vez que no estudo deles a resposta a Influenza B foi muito menor em relação ao efeito na resposta a Influenza A. Estes autores sugeriram que em pacientes em uso de micofenolato, a vacina de influenza muitas vezes deve ser ineficaz e que estes indivíduos talvez se beneficiem da titulação da resposta para se decidir sobre necessidade de dose de reforço da vacina(92). No estudo de Maryam et al. não se identificou fator de risco para resposta vacinal a Influenza B(119).

O efeito imunossupressor do micofenolato é descrita como sendo dose-dependente, com doses > 2 g sendo as que mais afetam a resposta vacinal. No estudo de Mulley et al., realizou-se análise de fatores de risco para resposta vacinal apenas em transplantados renais com títulos de anticorpos < 1:40 para evitar a influência da soroproteção basal. Nesta análise, o uso de micofenolato manteve-se como associação negativa para a soroproteção (OR ajustada=0,24; IC95%=0,07-0,79; p=0,02) com relação dose dependente, onde o uso de dose diária acima de 2g teve maior impacto na redução da resposta após ajustes para idade, sexo, tempo pós-transplante, uso de inibidor de calcineurina, rituximab e prednisolona. As taxas de soroproteção em indivíduos com micofenolato acima de 2g, micofenolato abaixo de 2g e sem micofenolato foram 20%, 34% e 50%, respectivamente (p=0,026). Embora sem significância estatística, observou-se possível associação do uso de rituximab com a redução de soroproteção uma vez que apenas um de dez indivíduos com histórico de uso de rituximab obteve títulos protetores, sendo que este indivíduo havia feito uso de rituximab há 3,5 anos e apresentava contagem normal de linfócitos B(95). Em relação ao efeito dose-dependente do micofenolato, Natori et al. encontraram associação entre doses < 2g de micofenolato com maior probabilidade de soroconversão a pelo menos uma cepa vacinal (OR=2,76; IC95%=1,12 – 6,76; p=0,027), sem diferença significativa nas taxas de soroproteção(84).

O tempo pós-transplante é um fator clássico descrito em estudos como determinante da resposta vacinal onde demonstra-se uma associação positiva entre maior tempo pós-transplante (geralmente > 6 meses) com resposta vacinal tanto em receptores TOS como TCTH(55,70,85,87,91,94,95,98,104). Maior tempo pós-transplante significa pacientes mais estáveis e geralmente com menor imunossupressão e menor efeito imunossupressor de terapia de indução. Em nosso estudo, maior tempo pós-transplante também aumentou a chance de soroconversão para todos os vírus vacinais em 1% (RP=1,01), porém esta variável foi eliminada do modelo final da análise multivariada por apresentar colinearidade com o uso de micofenolato e por ser um fator não modificável, diferente do micofenolato que pode ter a sua dose alterada ou até ser substituído por outro imunossupressor. De todos os estudos avaliados, apenas Broders et al não encontraram nenhuma associação entre tempo pós-transplante e soroconversão(93).

O corte do tempo pós-transplante associado com melhor soroconversão ou soroproteção tem variado entre os estudos. Fairhead et al., Birdwell et al., Mulley et al. e Baluch et al. encontraram associação a partir de seis meses pós-transplante renal(70,87,95,97); Karras et al. demonstraram associação independente a partir de um ano pós-transplante em receptores TCTH alogênico(104); Mombelli et al. mostraram associação independente a partir de dois anos pós-transplante em receptores TOS(85); Salles et al mostraram associação indepedente a partir de quase sete anos pós-transplante, que é o tempo mais longo relatado(94). Outros autores como Cordero et al. e Azevedo et al. não citaram o tempo de corte(55,91).

A partir dos estudos acima, também se sugere uma associação heterogênea do tempo pós-transplante com a soroconversão ou soroproteção às diferentes cepas de vírus vacinal. Por exemplo, nos estudos da vacina monovalente A/H1N1pdm09, Fairhead et al. relataram que tempo pós-transplante < 6 meses reduziu a soroconversão, sem efeito na soroproteção(70), enquanto que Mulley et al. relataram que tempo pós-transplante < 6 meses reduziu apenas a soroproteção à A/H1N1pdm09(95). Nos estudos de resposta à vacina trivalente, Birdwell et al. relataram que

transplantados renais com tempo pós-transplante < 6 meses tiveram redução significativa na soroconversão à todas as cepas vacinais e menor soroproteção para A/H1N1 e A/H3N2 comparado aos adultos saudáveis (97), e o estudo de Salles et al. demonstrou que o tempo pós-transplante < 87 meses foi fator de risco para menor soroproteção para A/H1N1 e menor soroconversão para A/H1N1 e A/H3N2 (94).

A creatinina sérica foi independentemente associado à soroconversão para A/H1N1 apenas em nosso estudo onde aumento da creatinina sérica resultou em uma redução de 51% na probabilidade de soroconversão para A/H1N1. A taxa de filtração glomerular é fator associado à resposta vacinal em vários estudos, onde a redução da TFG potencializa à imunossupressão(72,92,95). No estudo de Smith et al., compararam a intensidade imunossupressora da disfunção renal ao efeito da ciclosporina(92). Estudos comparando a resposta vacinal em adultos saudáveis, indivíduos sob hemodiálise e transplantados renais, demonstram resposta vacinal hierárquica de acordo com TFG, ou seja, maior resposta em adultos saudáveis, moderada em indivíduos sob hemodiálise e menor resposta em transplantados renais(72,92,95). No estudo de Mulley et al., houve menor soroproteção em indivíduos com taxa de filtração glomerular < 30ml/min do que os com TFG $\geq$ 60ml/min (OR=0,16; IC95%=0,03-0,88; p=0,04)(95). No estudo de Felldin et al. transplantados com TFG < 30 ml/min tiveram menor proporção de soroproteção (61% versus 87%) e soroconversão (67% versus 85%) do que os com TFG $\geq$ 30 ml/min (p=0,16).(72) O estudo de Broeders et al. e Fairhead et al. não encontraram associação entre disfunção renal e soroconversão e soroproteção, respectivamente(70,93).

Segurança

Assim como na literatura, a avaliação de segurança demonstrou que a vacina de influenza é bem tolerada, sem aumento na incidência de eventos adversos locais ou sistêmicos. A maioria dos eventos adversos registrados foram eventos solicitados de intensidade leve e moderada e autolimitados, sendo mais comum dor no local da administração da vacina assim como relatado em outros estudos(70,84,85,91).

Embora o estudo de Mombelli et al. tenha encontrado maior incidência de dor no local de administração da vacina no grupo que recebeu a dose dobrada da vacina ($P=NS$)⁽⁸⁴⁾, em nosso estudo a incidência foi semelhante entre os grupos. Em nosso estudo, administramos a dose dobrada da vacina em uma única aplicação, enquanto que no estudo de Mombelli et al., dividiu-se as aplicações em duas doses de 15 mcg, aplicadas em cada braço, que pode explicar maior incidência de eventos locais⁽⁸⁵⁾. No estudo de Natori et al., houve tendência não significativa de maior frequência de eventos adversos sistêmicos como artralgia, fadiga e queixas gastrointestinais no grupo da dose quadruplicada da vacina⁽⁸⁴⁾. No estudo de Halasa et al., a dose quadruplicada da vacina teve registro significativamente maior de reações locais (67%) em relação a grupo controle (31%) ($p=0,033$)⁽¹⁰¹⁾.

Em relação aos eventos adversos sérios, em nosso estudo, o critério de gravidade para reportá-los foi de internação hospitalar e nenhum evento adverso sério foi relacionada à vacina assim como mostrado em outros estudos^(55,84,85). Os pacientes transplantados renais são uma população complexa e de maior risco a complicações infecciosas ou cardiovasculares e já se esperava maior registro de internações eletivas e de urgência durante o seguimento. Em nosso estudo, a maior causa de internação foram as infecções de trato urinário. Apenas Felldin et al. reportaram um evento adverso sério associado à vacina monovalente A/H1N1pdm que foi um caso de surdez neurossensorial. Este tipo de complicação é considerada rara e havia sido previamente descrito em estudo de 2010 por outros autores⁽⁷²⁾.

Influenza

Estudos prévios de avaliação da eficácia vacinal como medida de prevenção de doença clínica na população de transplantados são escassos. A nossa incidência de influenza foi de 1,16% (2 casos confirmados em 172 vacinados) semelhante às taxas encontradas no estudo de Natori et al. e Cordero et al.^(55,84). Vale salientar que em nosso estudo a incidência de influenza pode ter sido subestimada uma vez que foram investigados apenas 27% dos sintomáticos respiratórios. A investigação etiológica de uma pequena proporção dos pacientes sintomáticos respiratório se deveu a diferentes

fatores, incluindo a dificuldade na vigilância telefônica dos pacientes vacinados ao longo do período de seguimento e o não comparecimento dos pacientes para avaliação medico-laboratorial diante de sintomas respiratórios frustos como coriza e odinofagia.

Todos os casos confirmados de influenza foram por vírus A não H1N1. Dois participantes que tiveram influenza antes da vacinação e nove dias após a vacinação apresentavam títulos não protetores de anticorpos de 1:10 para A/H3N2 na avaliação pré-vacinação. O terceiro participante que teve início de sintomas 20 dias após a vacinação apresentava título de anticorpo de 1/320 para A/H3N2 e suspeita-se que possa ter havido falha da proteção com a vacina uma vez que o título de anticorpos estava adequado. Os títulos na pré-vacinação para A/H1N1 e Influenza B eram acima de 1:40 em todos os três participantes, embora sem soroconversão para A/H1N1 na avaliação pós-vacinação.

Estudos de Natori et al. e Cordero et al. também mostraram que pode haver falha da proteção vacinal mesmo em indivíduos com títulos de anticorpos > 1:40 que é considerado correlato de proteção na população geral(55,84). O caso considerado como falha da proteção vacinal em nosso estudo não foi investigado. Geralmente, a investigação de falha vacinal requer técnico de laboratório qualificado e envolve testes sorológicos e moleculares que são caros. No entanto, presume-se que tenha ocorrido infecção por cepa viral mutante com incompatibilidade antigênica em relação à cepa utilizada na vacina. Neste contexto, talvez as vacinas polivalentes de amplo espectro compostas por antígenos sintéticos que mimetizam os principais e mais conservados epítomos dos subtipos de vírus influenza poderia oferecer maior proteção. Um estudo deste tipo de vacina foi iniciado por van Doorn et al., mas ainda não foi concluído(69).

Outro ponto importante a se discutir e investigar é o ponto de corte dos títulos de anticorpos que correspondam a proteção em imunodeprimidos. O ponto de corte de 1:40 foi estabelecida para a população geral e os parâmetros sorológicos de resposta à vacina e correlatos de proteção para indivíduos imunodeprimidos não têm sido estabelecidos. Mesmo com títulos de anticorpos

$\geq 1:40$, a proteção conferida contra a doença é de apenas 50%, com maior benefício sendo de redução de complicações. Na população de imunodeprimidos, assim como sugerido na revisão dos critérios de imunogenicidade pela EMA, é possível que sejam necessários títulos de anticorpos mais altos para alcançar a mesma efetividade da vacina na população geral. No estudo de Black et al. realizado com população pediátrica foram necessários títulos de anticorpos inibidores de hemaglutinação de 1:110 para proteção de 50% das crianças, e títulos crescentes 1:215, 1:330 e 1:629 aumentaram a eficácia da proteção para 70%, 80% e 90%, respectivamente(126).

Sabe-se também que há queda progressiva dos títulos de anticorpos após a vacinação e talvez este fato tenha correlação com suscetibilidade à influenza(98). Por termos uma população de transplantados renais e adultos saudáveis que frequentemente estão no HCFMUSP, poderíamos ter realizado seguimento a longo prazo para estudar a manutenção dos anticorpos e estimar a durabilidade da proteção. Este objetivo não foi definido na fase de planejamento do estudo e, conforme mencionado anteriormente, estudos avaliando a durabilidade da proteção são escassos.

Rejeição do enxerto

Em nosso estudo, não foi identificada diferença significativa na incidência de rejeição aguda do enxerto renal entre os grupos de tratamento. Nenhum episódio de rejeição aguda foi relacionada à vacina à semelhança com a literatura(105). O estudo da dose quadruplicada da vacina registrou quatro casos de rejeição aguda do enxerto por biópsia, sem relação com a dose da vacina recebida(84). Há estudos que não registraram nenhum evento de rejeição aguda após a vacinação(85).

Não fizemos avaliação de HLA como foi feito em outros estudos que tiveram como objetivo avaliar a sensibilização pelos(70). Em geral, os relatos de desenvolvimento de novos anticorpos antiHLA foram de estudos da vacina adjuvantada e não foi estabelecida associação entre vacinação e rejeição do enxerto(57,70). Também não realizou-se biópsia de rotina nos participantes e

pode ser que alguns episódio de rejeição assintomática não tenha sido diagnosticada. No entanto, como a maioria dos estudos de vacina de influenza demonstram a segurança desta e falta de associação com a rejeição do enxerto, realizar biópsia renal de rotina iria aumentar a morbidade sem trazer benefício.

Nosso estudo apresentou algumas limitações que são descritas a seguir:

1. O tamanho amostral foi estimado e não fizemos cálculo formal do poder do estudo, mas consideramos que a amostra foi suficiente já que o desenho foi de ensaio clínico piloto.
2. Os grupos de transplantados renais não foram 100% homogêneos, mas o grupo de vacina de reforço pareceu até pior, o que nos permite valorizar o resultado encontrado.
3. Não foi possível estimar de forma mais precisa a incidência de influenza uma vez que a maioria dos sintomáticos respiratórios não compareceu para avaliação clínico-laboratorial, comprometendo a avaliação da eficácia vacinal. Não tivemos equipe suficiente para realizar constantemente os contatos telefônicos de vigilância aos sintomáticos respiratórios com o intuito de lembrá-los da necessidade de comparecimento para investigação. Ao mesmo tempo, houve fragilidade do método elegido para a vigilância, pois a frequência mensal do contato de vigilância pode ter levado a uma subestimação de sintomáticos respiratórios uma vez que a influenza e outras infecções respiratórias de etiologia viral costumam ter curso agudo e autolimitado com resolução em até sete dias. Avaliando os resultados retrospectivamente, consideramos que deveríamos ter realizados os contatos telefônicos de vigilância semanalmente para que aumentássemos a chance de detectar a vigência dos sintomas respiratórios.

Frente aos resultados encontrados, e, considerando que os estudos da imunogenicidade da vacina de influenza frequentemente trazem resultados heterogêneos, inconclusivos e conflitantes, três questões em relação às perspectivas futuras merecem ser mencionadas.

Primeiro, destaca-se a importância de que estudos de imunogenicidade de vacinas de influenza idealmente sejam multicêntricos para aumentar o tamanho amostral e poder do estudo já que a demonstração da superioridade de esquemas alternativos de vacinação de melhor imunogenicidade em pacientes imunodeprimidos são de extrema importância para auxiliar decisão de inclusão do mesmo na rotina nacional de vacinação em imunodeprimidos se aprovação regulatória-

Segundo, estudos de imunogenicidade que avaliem um período mais longo de tempo, de mais de uma estação de influenza, permitirá avaliar variabilidades na imunogenicidade, títulos de anticorpos a longo prazo e estudar melhor a eficácia/efetividade da vacina.

Terceiro, os esquemas de vacinação utilizando a dose de reforço ou a dose dobrada da vacina para imunização na população de imunodeprimidos são promissoras e devem ser melhor estudados, preferencialmente em estudos de comparação direta (*head-to-head*) destes dois esquemas.

7 CONCLUSÕES

1. As taxas globais de soroconversão tanto nos transplantados renais como nos adultos sadios foram mais baixas do que na literatura possivelmente devido à baixa antigenicidade da vacina de influenza trivalente do Instituto Butantan fabricada para o ano de 2014.
2. As maiores taxas de soroconversão foram observadas no grupo de transplantados renais que recebeu a dose de reforço da vacina do que nos outros grupos, inclusive do que no grupo de adultos sadios.
3. Em nosso estudo, a vacina atingiu o critério de imunogenicidade conforme critérios da EMA apenas para as taxas de soroproteção na análise PP.
4. Para A/H1N1, os fatores independentemente associados à soroconversão foram título de anticorpos na avaliação pré-vacinação $< 1:40$ (RP=3,76; IC95%=1,76-8,02; $p=0,001$), retransplante (RP=3,34; IC95%=1,76-6,33; $p<0,001$), uso de micofenolato (RP=0,46; IC95%=0,24-0,88; $p=0,020$) e creatinina sérica (RP=0,49; IC95%=0,270-0,91; $p=0,025$).
5. Para A/H3N3, os fatores independentemente associados à soroconversão foram dose de reforço da vacina (RP=2,99; IC95%=1,59-6,37; $p=0,003$), título de anticorpos na avaliação pré-vacinação $< 1:40$ (RP=3,48; IC95%=1,79-6,75; $p<0,001$) e uso de micofenolato (RP=0,48; IC95%=0,25-0,91; $p<0,025$).
6. Para Influenza B, os fatores independentemente associados à soroconversão foram título de anticorpos na avaliação pré-vacinação $< 1:40$ (RP=2,30; IC95%=1,27-4,18; $p=0,006$) e retransplante (RP=2,62; IC95%=1,49-4,61; $p=0,001$).
7. Títulos de anticorpos $< 1:40$ tiveram associação independente com soroconversão para todas as três cepas vacinais.
8. As doses experimentais da vacina foram seguras e não foram associadas com aumento de reações adversas locais ou sistêmicas.
9. A incidência de influenza confirmada laboratorialmente em receptores de transplante renal sintomáticos respiratórios no período de até 26 semanas após a administração inicial da vacina influenza trivalente foi de 1,16%.
10. A incidência de rejeição do enxerto confirmada por biópsia no período de até 26 semanas após a administração inicial da vacina influenza trivalente foi de 8,8% e não diferiu entre os três grupos de esquema vacinal.

8 REFERÊNCIAS²

² De acordo com o estilo Vancouver.

1. Couch R. Chapter 58 Orthomyxoviruses. Med Microbiol. 1996;2.
2. Gomez Lorenzo MM, Fenton MJ. Immunobiology of influenza vaccines. Chest. 2013;143(2):502–10.
3. CDC. No Title. Types of influenza viruses. 2016. [Último acesso 24/ago/2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
4. WHO. No Title [Internet]. Influenza seasonal fact sheet. 2016 [Último acesso 17/set/2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>
5. Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetal B, Fry A, Gubareva L, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014–2015. Antiviral Res. 2016;132:178–85.
6. Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: The contributions of virus and host factors. Curr Opin Immunol. 2011;23(4):481–6.
7. WHO. Global Influenza Surveillance Network Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011.
8. WHO. Influenza biologicals. 2017 [Último acesso 17/set/2017]. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/vaccines/influenza/en/>
9. CDC. Cell-Based Flu Vaccines [Internet]. Cell-Based Flu Vaccines. 2016 [Último acesso 17/set/2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/cell-based.htm>
10. WHO. WHO launches new global influenza strategy. 2019 [Último acesso 18/ago/2019]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/11-03-2019-who-launches-new-global-influenza-strategy>
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo de Tratamento de Influenza. 2017. [Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/publicacoes/protocolo_tratamento_influenza_2017].
12. Lai, Lin, Ho, Chen, Lee. Alternative-Dose versus Standard-Dose Trivalent Influenza Vaccines for Immunocompromised Patients: A Meta-Analysis of Randomised Control Trials. J Clin Med. 2019 Apr 29;8(5):590.
13. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe técnico: Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza. 2016;41 [Disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/11/informe-tecnico-campanha-vacinacao-influenza-2016.pdf>]
14. Kawaoka GN and Y. Transmission of Influenza A Viruses. Virology. 2015;0:234–46.

15. WHO. No Title [Internet]. Avian and other zoonotic influenza. 2016 [Último acesso 17/set/2017]. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/
16. World Health Organization. Influenza virus infections in humans. Note. 2013. [Último acesso 3/10/2019]. Disponível em: https://www.who.int/influenza/GIP_InfluenzaVirusInfectionsHumans_Jul13.pdf
17. WHO. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) [Último acesso 17/set/2017]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/
18. CDC. How flu spreads. 2014. [Último acesso 17/set/2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/disease/spread.htm>
19. CDC. Flu Symptoms & Complications. 2017. [Último acesso 17/set/2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/consumer/symptoms.htm>
20. Wang C, Yu H, Horby PW, Cao B, Wu P, Yang S, et al. Comparison of patients hospitalized with influenza A subtypes H7N9, H5N1, and 2009 pandemic H1N1. Clin Infect Dis. 2014;58(8):1095–103.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo de Tratamento de Influenza. 2015. [Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_tratamento_influenza_2015.pdf]
22. Nichols WG, Guthrie KA, Corey L, Boeckh M. Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. Clin Infect Dis. 2004;39(9):1300–6.
23. Gainer SM, Patel SJ, Seethamraju H, Moore LW, Knight RJ GA, Gainer SM, Patel SJ, Seethamraju H, Moore LW, Knight RJ, et al. Increased mortality of solid organ transplant recipients with H1N1 infection: a single center experience. Clin Transplant. 2012;26(2):229–37.
24. Kumar D, Michaels MG, Morris MI, Green M, Avery RK, Liu C, et al. Outcomes from pandemic influenza A H1N1 infection in recipients of solid-organ transplants: A multicentre cohort study. Lancet Infect Dis. 2010;10(8):521–6.
25. Memoli MJ, Athota R, Reed S, Czajkowski L, Bristol T, Proudfoot K, et al. The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs nonimmunocompromised hosts. Clin Infect Dis. 2014;58(2):214–24.
26. Yong Low C, Kee T, Peng Chan K, Oon L LE, Kiat Tan C, Tee NW, et al. CLINICAL AND TRANSLATIONAL RESEARCH Pandemic (H1N1) 2009 Infection in Adult Solid Organ Transplant Recipients in Singapore. Transplantation. 2010;90:1016–21.

27. Kumagai Y, Takeuchi O AS. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother.* 2008;2:86–92.
28. Lin KL, Suzuki Y, Nakano H, Gunn MD, Lin KL, Suzuki Y, et al. CCR2 + Monocyte-Derived Dendritic Cells and Exudate Macrophages Produce Influenza-Induced Pulmonary Immune Pathology and Mortality. 2017;
29. Szretter KJ, Gangappa S, Belser JA, Zeng H, Chen H, Matsuoka Y, et al. Early control of H5N1 influenza virus replication by the type I interferon response in mice. *J Virol.* 2009;83(11):5825–34.
30. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):315–28.
31. GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol.* 2008;1(6):442–50.
32. Bot A, Reichlin A, Isobe H, Bot S, Schulman J, Yokoyama WM, et al. Cellular mechaniss involved in protection and recovery from influenza virus infection in immunodeficient mice. *J Virol.* 1996;70(8):5668–72.
33. Monsalvo AC, Batalle JP, Lopez MF, Krause JC, Zea J, Maskin B, et al. Pathogenic Immune Complexes. 2011;17(2):195–9.
34. Laborda P, Wang SY, Voglmeir J. Influenza neuraminidase inhibitors: Synthetic approaches, derivatives and biological activity. *Molecules.* 2016;21(11):1–40.
35. Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol.* 1994;68(9):6074–8.
36. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. *Nature.* 2006;
37. Liu Y, Childs RA, Matrosovich T, Wharton S, Palma AS, Chai W, et al. Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus. *J Virol.* 2010;84(22):12069–74.
38. Kilander A, Rykkvin R, Dudman SG, Hungnes O. Author's reply: Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza a (H1N1) with severe disease. *Eurosurveillance.* 2010;15(14):2009–10.
39. Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, et al. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(3):263–9.
40. Kim HM, Lee Y-W, Lee K-J, Kim HS, Cho SW, van Rooijen N, et al. Alveolar Macrophages Are Indispensable for Controlling Influenza Viruses

- in Lungs of Pigs. *J Virol*. 2008;82(9):4265–74.
41. Vilchez R a, McCurry K, Dauber J, Lacono A, Griffith B, Fung J, et al. Influenza virus infection in adult solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2002;2(3):287–91.
 42. Ridao-Cano, Natalia; Sanchez-Fructuoso, Ana I; Rodriguez-Moreno, Antolina; Barrientos A. H1N1 2009 Influenza in Kidney Transplant Patients. *Transplantation*. 2010;90(2):224–5.
 43. Ljungman P, de la Camara R, Perez-Bercoff L, Abecasis M, Campuzano JBN, Cannata-Ortiz MJ, et al. Outcome of pandemic H1N1 infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*. 2011;96(8):1231–5.
 44. Helanterä I, Anttila VJ, Lappalainen M, Lempinen M, Isoniemi H. Outbreak of Influenza A(H1N1) in a Kidney Transplant Unit - Protective Effect of Vaccination. *Am J Transplant*. 2015;15(9):2470–4.
 45. Cordero E, Pérez-Romero P, Moreno A, Len O, Montejo M, Vidal E, et al. Pandemic influenza A(H1N1) virus infection in solid organ transplant recipients: Impact of viral and non-viral co-infection. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(1):67–73.
 46. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico Influenza. 2018. [Disponível em: <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/01/Informe-Epidemiologico-Influenza-2018-SE-52.pdf>]
 47. Viasus D, Paño-Pardo JR, Pachón J, Campins A, López-Medrano F, Villoslada A, et al. Factors associated with severe disease in hospitalized adults with pandemic (H1N1) 2009 in Spain. Vol. 17, *Clinical Microbiology and Infection*. 2011. p. 738–46.
 48. Muthuri SG, Myles PR, Venkatesan S, Leonardi-Bee J, Nguyen-Van-Tam JS. Impact of neuraminidase inhibitor treatment on outcomes of public health importance during the 2009-2010 influenza A(H1N1) pandemic: a systematic review and meta-analysis in hospitalized patients. *The Journal of infectious diseases*. 2013.
 49. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GI, Singleton JA, et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Prevention and Control of Influenza with Vaccines Recommendations of the Advisory Committee on. Vol. 59. 2010.
 50. Liao YC, Hsieh YC, Chang WC, Huang JL, Ting CT, Wu TJ. Fulminant myocarditis in an adult with 2009 pandemic influenza A (H1N1 influenza) infection. *J Chinese Med Assoc JCMA*. 2011;74(3):130–3.
 51. Ukimura A, Satomi H, Ooi Y, Kanzaki Y. Myocarditis Associated with Influenza A H1N1pdm2009. *Influenza Res Treat*. 2012;2012:351979.

52. Asadi-Pooya Aa, Yaghoubi E, Nikseresht A, Moghadami M, Honarvar B. The neurological manifestations of H1N1 influenza infection; diagnostic challenges and recommendations. *Iran J Med Sci.* 2011;36(1):36–9.
53. Odongo FC, Azevedo LS, Neto ED, Yeh-Li H, Caiaffa H, Pierrotti LC. Clinical Characteristics and Outcomes of Influenza A Infection in Kidney Transplant Recipients: A Single-Center Experience. *Transplant Proc.* 2016;48(7):2315–8.
54. Freitas T V, Ono G, Corrêa L, Gomes PS, Galante NZ, Tedesco-Silva H, et al. Clinical manifestations and evolution of infection by influenza A (H1N1) in kidney transplant recipients. *J Bras Nefrol.* 2011;33(2):136–41.
55. Cordero E, Roca-Oporto C, Bulnes-Ramos A, Aydillo T, Gavalda J, Moreno A, et al. Two doses of inactivated influenza vaccine improve immune response in solid organ transplant recipients: a randomized controlled clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2017;
56. Briggs J. Viral infection and renal transplant rejection. *Br Med J.* 1972;1(1417):425–37.
57. Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R, Ferrari-Lacraz S, Meier S, Van Delden C, et al. De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2011;11(8):1727–33.
58. Muthuri SG, Venkatesan S, Myles PR, Leonardi-Bee J, Lim WS, Al Mamun A, et al. Impact of neuraminidase inhibitors on influenza A(H1N1)pdm09-related pneumonia: An individual participant data meta-analysis. *Influenza Other Respi Viruses.* 2016;10(3):192–204.
59. Ison MG. Antiviral Treatments. *Clin Chest Med.* 2017;38(1):139–53.
60. Dong G, Peng C, Luo J, Wang C, Han L, Wu B, et al. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): Frequency and distribution of M2 gene mutations. *PLoS One.* 2015;
61. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, et al. Surveillance of Resistance to Adamantanes among Influenza A(H3N2) and A(H1N1) Viruses Isolated Worldwide. *J Infect Dis.* 2007;
62. Lopez-Medrano F, Cordero E, Gavalda J, Cruzado JM, Marcos MA, Perez-Romero P, et al. Executive summary. Management of influenza infection in solid-organ transplant recipients: Consensus statement of the Group for the Study of Infection in Transplant Recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiol. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(8):528-534.
63. CDC. Preventing the Flu: Good Health Habits Can Help Stop Germs. 2016. [Último acesso 17/set/2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/protect/habits.htm>

64. Lee PP. Prevention and Control of Influenza. *South Med J*. 2003;96(8):751–7.
65. JJ T, FG H, PS V, al et. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: A randomized controlled trial. *Jama*. 2000;283(8):1016–24.
66. WHO. No Title [Internet]. WHO launches new global influenza strategy. 2019. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/11-03-2019-who-launches-new-global-influenza-strategy>
67. Pérez-Romero P, Bulnes-Ramos A, Torre-Cisneros J, Gavaldá J, Aydillo TA, Moreno A, et al. Influenza vaccination during the first 6 months after solid organ transplantation is efficacious and safe. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(11):1040.e11-1040.e18.
68. Scharpé J1, Evenepoel P, Maes B, Bammens B, Claes K, Osterhaus AD, Vanrenterghem Y PW, Scharpé J, Evenepoel P, Maes B, Bammens B, Claes K, et al. Influenza vaccination is efficacious and safe in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2008;8(2):332–7.
69. van Doorn E, Pleguezuelos O, Liu H, Fernandez A, Bannister R, Stoloff G, et al. Evaluation of the immunogenicity and safety of different doses and formulations of a broad spectrum influenza vaccine (FLU-v) developed by SEEK: study protocol for a single-center, randomized, double-blind and placebo-controlled clinical phase IIb trial. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):241.
70. Fairhead T, Hendren E, Tinckam K, Rose C, Sherlock CHH, Shi L, et al. Poor seroprotection but allosensitization after adjuvanted pandemic influenza H1N1 vaccine in kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2012;14(6):575–83.
71. Chong PP, Handler L, Weber DJ. A Systematic Review of Safety and Immunogenicity of Influenza Vaccination Strategies in Solid Organ Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2018;66(11):1802–11.
72. Felldin M, Studahl M, Svennerholm B, Friman V. The antibody response to pandemic H1N1 2009 influenza vaccine in adult organ transplant patients. *Transpl Int*. 2012;25(2):166–71.
73. Benoit A, Beran J, Devaster JM, Esen M, Launay O, Leroux-Roels G, et al. Hemagglutination Inhibition Antibody Titers as a Correlate of Protection Against Seasonal A/H3N2 Influenza Disease. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2(2):ofv067.
74. CDC. Fluzone High-Dose Seasonal Influenza Vaccine [Internet]. Fluzone High-Dose Seasonal Influenza Vaccine. 2017 [cited 2017 Sep 17]. Available from: https://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/qa_fluzone.htm
75. Lindemann M, Witzke O, Lütke P, Fiedler M, Kreuzfelder E, Philipp T, et

- al. ELISpot assay as a sensitive tool to detect cellular immunity following influenza vaccination in kidney transplant recipients. *Clin Immunol*. 2006;120(3):342–8.
76. Trombetta C, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. *Vaccines*. 2014;2(4):707–34.
 77. Cheng LW, Huang SW, Huang LM, Chang LY, Shao PL, Kiang D, et al. Comparison of neutralizing and hemagglutination-inhibiting antibody responses for evaluating the seasonal influenza vaccine. *J Virol Methods*. 2012;182(1–2):43–9.
 78. Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A, Refinery E. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J Hyg (Lond)*. 1972;70(4):767–77.
 79. Beyer, W. E.P., Bruijn IA, Palache, AM, westendorp RGJ, Osterhaus A. Protection Against Influenza After Annually Repeated Vaccination. 1999;159:182–8.
 80. Schild GC, Pereira MS, Chakraverty P. Single radial haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. Applications for diagnosis and seroepidemiologic surveillance of influenza. *Bull World Health Organ*. 1975;52(1):43–50.
 81. Products TEA for the E of M. Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines. [WwwEudraOrg/EmeaHtml](http://www.EudraOrg/EmeaHtml). 1997;(April):19.
 82. Beyer WEP, Palache AM, Lüchters G, Nauta J, Osterhaus ADME. Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: Which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? *Virus Res*. 2004;103(1–2):125–32.
 83. Wijnans L, Voordouw B. A review of the changes to the licensing of influenza vaccines in Europe. *Influenza Other Respi Viruses*. 2016;10(1):2–8.
 84. Natori Y, Shiotsuka M, Slomovic J, Hoschler K, Ferreira V, Ashton P, et al. A Double-Blind, Randomized Trial of High-Dose vs Standard-Dose Influenza Vaccine in Adult Solid-Organ Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2018;66(11):1698–704.
 85. Mombelli M, Rettby N, Perreau M, Pascual M, Pantaleo G, Manuel O, et al. Immunogenicity and safety of double versus standard dose of the seasonal influenza vaccine in solid-organ transplant recipients: A randomized controlled trial. *Vaccine*. 2018;36(41):6163–9.
 86. Eckerle I, Rosenberger KD, Zwahlen M, Junghanss T. Serologic

- Vaccination Response after Solid Organ Transplantation: A Systematic Review. *PLoS One*. 2013;8(2).
87. Baluch A, Humar A, Eurich D, Egli A, Liacini A, Hoschler K, et al. Randomized controlled trial of high-dose intradermal versus standard-dose intramuscular influenza vaccine in organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2013;13(4):1026–33.
 88. Kumar D, Blumberg EA D-IL, Kumar D, Blumberg EA, Danziger-Isakov L, Kotton CN, Halasa NB, et al. Influenza vaccination in the organ transplant recipient: review and summary recommendations. *Am J Transplant*. 2011;10:2020–30.
 89. Beck CR, Mckenzie BC, Hashim AB, Harris RC, Zanuzdana A, Morgan G, et al. Influenza Vaccination for Immunocompromised Patients : Systematic Review and Meta-Analysis from a Public Health Policy Perspective. 2011;6(12).
 90. Miraglia JL, Abdala E, Hoff PM, Luiz AM, Oliveira DS, Saad CGS, et al. Immunogenicity and reactogenicity of 2009 influenza a (H1N1) inactivated monovalent non-adjuvanted vaccine in elderly and immunocompromised patients. *PLoS One*. 2011;6(11).
 91. Azevedo LSS, Gerhard J, Miraglia JLL, Precioso ARRS, Timenetsky M dC. ST, Agena F, et al. Seroconversion of 2009 pandemic influenza A (H1N1) vaccination in kidney transplant patients and the influence of different risk factors. *Transpl Infect Dis*. 2013;15(6):612–8.
 92. Smith KG1, Isbel NM, Catton MG, Leydon JA, Becker GJ WR, Smith KG, Isbel NM, Catton MG, Leydon JA, Becker GJ, et al. Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *nephrol dial Transpl*. 1998;13(1):160–4.
 93. Broeders NE, Hombrouck A, Lemy A, Wissing KM, Racapé J, Gastaldello K, et al. Influenza A/H1N1 vaccine in patients treated by kidney transplant or dialysis: a cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(11):2573–8.
 94. Salles MJCC, Sens YASS, Boas LSV V, Machado CM. Influenza virus vaccination in kidney transplant recipients: serum antibody response to different immunosuppressive drugs. *Clin Transplant*. 2010;24(1):e17–23.
 95. Mulley WR, Visvanathan K, Hurt AC, Brown FG, Polkinghorne KR, Mastorakos T, et al. Mycophenolate and lower graft function reduce the seroresponse of kidney transplant recipients to pandemic H1N1 vaccination. *Kidney Int*. 2012;82(2):212–9.
 96. Smith KGC, Isbel NM, Catton MG, Leydon JA, Becker GJ, Walker RG. Nephrology Dialysis Transplantation Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;160–4.

97. Birdwell KA, Ikizler MR, Sannella EC, Wang L, Byrne DW, Ikizler TA, et al. Decreased Antibody Response to Influenza Vaccination in Kidney Transplant Recipients: A Prospective Cohort Study. *Am J Kidney Dis*. 2009 Jul;54(1):112–21.
98. Birdwell KA, Ikizler MR, Wang L, Byrne DW, Sannella EC, Wright PF, et al. Seasonal maintenance of influenza vaccine-induced antibody response in kidney transplant recipients. *Am J Nephrol*. 2012;36(3):201–7.
99. Wyzgał J, Brydak LB, Zygiel D, Paczek L, Rowin S, Ki W, Grochowiecki T, et al. Study on efficacy of influenza vaccination in renal allograft recipients. *Transplant Proc*. 2002;34(2):572–5.
100. Jamshed S, Walsh EE, Dimitroff LJ, Santelli JS, Falsey AR. Improved immunogenicity of high-dose influenza vaccine compared to standard-dose influenza vaccine in adult oncology patients younger than 65 years receiving chemotherapy: A pilot randomized clinical trial. *Vaccine*. 2016;34(5):630–5.
101. Halasa NB, Savani BN, Asokan I, Kassim A, Simons R, Summers C, et al. Randomized, Double Blind, Study of the safety and Immunogenicity of Standard-Dose Trivalent Inactivated Influenza Vaccine versus High-Dose Trivalent Inactivated Influenza Vaccine in Adult Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2015;22(3):528–35.
102. Ravinder Wali IFH. Phase IV, Pilot, Randomized, Investigator-blinded, Study to Evaluate the Reactogenicity and Immunogenicity of Standard-dose Versus High-dose Inactivated Influenza Vaccine After Kidney, Heart and Lung Transplantation. Standard-dose Versus High-dose Flu Vac.
103. Donna Curtis et al. Immunogenicity of Fluzone High Dose in Immunocompromised Children and Young Adults [Internet]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01685372>
104. Karras NA, Weeres M, Sessions W, Xu X, DeFor T, Young JAH, et al. A Randomized Trial of One versus Two Doses of Influenza Vaccine after Allogeneic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(1):109–16.
105. Quintana LF, Serra N, De Molina-Llauradó P, Blasco M, Martinez M, Campos B, et al. Influence of renal replacement therapy on immune response after one and two doses of the A(H1N1) pdm09 vaccine. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013;7(5):809–14.
106. Le Corre N, Thibault F, Noble CP, Meiffrédy V, Daoud S, Cahen R, et al. Effect of two injections of non-adjuvanted influenza A H1N1pdm2009 vaccine in renal transplant recipients: INSERM C09-32 TRANSFLUVAC trial. *Vaccine*. 2012;30(52):7522–8.
107. Pileggi C, Lotito F, Bianco A, Nobile CGA, Pavia M. Immunogenicity and

- safety of intradermal influenza vaccine in immunocompromized patients : a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Infect Dis.* 2015;
108. Morelon E, Noble CP, Daoud S, Cahen R, Goujon-Henry C, Weber F, et al. Immunogenicity and safety of intradermal influenza vaccination in renal transplant patients who were non-responders to conventional influenza vaccination. *Vaccine.* 2010;
 109. Marra F, Young F, Richardson K, Marra CA. A Meta-analysis of intradermal versus intramuscular influenza vaccines: Immunogenicity and Adverse Events. *Influenza Other Respi Viruses.* 2013;7(4):584–603.
 110. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012;
 111. Edward A Belongia, Belongia EA, Simpson MD, King JP, Sundaram ME, Kelley NS, et al. Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(8):942–51.
 112. Hirve S, Lambach P, Paget J, Vandemaele K, Fitzner J, Zhang W. Seasonal influenza vaccine policy, use and effectiveness in the tropics and subtropics – a systematic literature review. *Influenza Other Respi Viruses.* 2016;10(4):254–67.
 113. Cdc. Vaccine Effectiveness - How Well Does the Flu Vaccine Work? [Internet]. Vaccine Effectiveness - How Well Does the Flu Vaccine Work? 2017 [cited 2017 Sep 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/about/qa/vaccineeffect.htm>
 114. Cdc. Why is flu vaccine typically less effective against influenza A(H3N2) viruses? [Internet]. Why is flu vaccine typically less effective against influenza A(H3N2) viruses? 2017 [cited 2017 Sep 18]. Available from: https://www.cdc.gov/flu/about/qa/vaccineeffect.htm#doe_flu_vax_effect_vary_by_type_subtype
 115. Wu J, Xu F, Lu L, Lu M, Miao L, Gao T, et al. Safety and Effectiveness of a 2009 H1N1 Vaccine in Beijing. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2416–23.
 116. Greenberg ME. Response to a Monovalent 2009 Influenza A (H1N1) Vaccine. *N Engl J Med.* 2009;361(25):2405–13.
 117. Mosterín Höpping A, McElhaney J, Fonville JM, Powers DC, Beyer WEP, Smith DJ. The confounded effects of age and exposure history in response to influenza vaccination. *Vaccine.* 2016;
 118. Mondini G, Braga PE, Lopes MH, Sartori AMC, Miyaji KT, Infante V, et al. Prospective cohort studies to evaluate the safety and immunogenicity of the 2013, 2014, and 2015 seasonal influenza vaccines produced by instituto Butantan. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2018;60(April):1–11.

119. Keshtkar-Jahromi M, Argani H, Rahnavardi M, Mirchi E, Atabak S, Tara SA, et al. Antibody response to influenza immunization in kidney transplant recipients receiving either azathioprine or mycophenolate: A controlled trial. *Am J Nephrol*. 2008 Jun;28(4):654–60.
120. Cowan M, Chon WJ, Desai A, Andrews S, Bai Y, Veguilla V, et al. Impact of immunosuppression on recall immune responses to influenza vaccination in stable renal transplant recipients. *Transplantation*. 2014 Apr 27;97(8):846–53.
121. Crespo M, Collado S, Mir M, Cao H, Barbosa F, Serra C, et al. Efficacy of influenza A H1N1/2009 vaccine in hemodialysis and kidney transplant patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(9):2208–14.
122. Machado MJCSYASSPMJFSLSVBCM. Antibody response to the non-adjuvanted and adjuvanted influenza A H1N1/09 monovalent vaccines in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2012;
123. Bellei NCJ, Carraro E, Castelo A, Granato CFH. Risk factors for poor immune response to influenza vaccination in elderly people. *Brazilian J Infect Dis*. 2006;10(4):269–73.
124. Beltrame A, Busca MDE, Literatura DA. § 2º É obrigatória a observância desse Protocolo para fins de dispensação de medicamento nele previsto. 2010;1–15.
125. Willcocks LC, Chaudhry AN, Smith JC, Ojha S, Doffinger R, Watson CJE, et al. The effect of sirolimus therapy on vaccine responses in transplant recipients. *Am J Transplant*. 2007 Aug;7(8):2006–11.
126. Black S, Nicolay U, Vesikari T, Knuf M, Del Giudice G, Della Cioppa G, Tsai T, Clemens R RR. No Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. Title. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(12):1081-5.

9 APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos
Receptores de Transplante Renal

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD
(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Ensaio Clínico Aberto Randomizado Paralelo para avaliação da imunogenicidade de três esquemas de administração da Vacina Influenza Trivalente (fragmentada e inativada) em Receptores de Transplante Renal.

2. PESQUISADORES:

Pesquisador: Fatuma Catherine Atieno Odongo

Coordenador Geral: Alexander R. Precioso

Pesquisadores: Alexander R. Precioso^{1,2} Ana Marli C. Sartori³, Elias David-Neto⁴, João L. Miraglia², Karim Ibrahim Yaquib³, Lígia Camera Pierrotti³, Luis Sérgio Azevedo⁴, Maria do Carmo S. T. Timenetsky⁵, Marta Heloisa Lopes³, William Nahas⁴

3. INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

¹ Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Departamento de Pediatria da FMUSP, Disciplina de Pediatria Preventiva e Social – Diretoria de Ensaios Clínicos - Fundação Butantan.

² Fundação Butantan – Instituto Butantan – Diretoria Médica de Ensaios Clínicos.

³ Departamento/Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Grupo de infecção em imunodeprimidos e Centro de Referência em Imunobiológicos Especiais (CRIE).

⁴ Serviço de Transplante Renal da Divisão de Urologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

⁵ Instituto Adolfo Lutz - Divisão de Biologia Médica.

4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

5. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 MESES

A – Estudo e objetivo(s)

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar como o seu organismo responde à administração da vacina de influenza produzida pelo Instituto Butantan comparando a dose padrão (usada de rotina todo ano), a dose dobrada e duas doses sequenciais da vacina administrada com um intervalo de 21 dias.

A gripe é uma doença infecciosa causada por vírus conhecidos pelo nome de Influenza. Os vírus Influenza podem causar doença tanto nos seres

humanos como em outros animais, como as aves e os porcos. É muito comum esses vírus sofrerem mudanças ou mesmo se misturarem entre si dando origem a novos vírus Influenza que podem ser mais ou menos graves para os seres humanos. Sabe-se que, a cada ano, 250.000 a 500.000 pessoas morrem de gripe em todo o mundo.

A melhor forma de se proteger para não ter gripe é se vacinar. Porém, a vacina protege contra infecção por um período limitado, e por isso, a cada ano você precisa receber a vacina de gripe, mesmo que já tenha recebido nos anos anteriores. E a cada ano a vacina é atualizada, para proteção dos vírus da gripe que podem ir se modificando continuamente.

Esse estudo vai investigar se a dose dobrada ou duas doses sequenciais da vacina administradas com um intervalo de 21 dias, em pessoas com imunidade baixa, como os transplantados renais, melhora ou não a proteção oferecida pela vacina. Ainda não sabemos se é melhor receber a vacina na dose padrão, na dose dobrada ou duas doses sequenciais da vacina administradas com um intervalo de 21 dias, mas sabemos que a vacina é formada por vírus morto, e por isso, não há risco de infecção pela vacina, em qualquer dose utilizada.

Exceto para o grupo que receberá duas doses sequenciais da vacina administradas com um intervalo de 21 dias, todos os participantes do estudo receberão a vacina em apenas uma aplicação e na forma de injeção no braço que não é usado para escrever.

Assim, como você tem o direito de receber essa vacina de forma prioritária estamos lhe convidando para participar deste estudo. A vacina será administrada no Centro de Referência em Imunobiológicos Especiais (CRIE) do Hospital das Clínicas, localizado no 4º andar do Prédio dos Ambulatórios (Prédio Amarelo).

B – Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Antes que você decida participar deste estudo os pesquisadores vão explicar tudo a respeito da sua participação. Após essa explicação você deverá

ler este termo de consentimento e deverá assiná-lo após o esclarecimento de todas as suas dúvidas. Após o seu consentimento você iniciará sua participação que está descrita a seguir.

1ª VISITA: Após ter assinado esse consentimento será colhido 15 mL de sangue antes de você receber a vacina. Essa amostra de sangue será utilizada para demonstrar quais são os seus níveis de anticorpo contra esse vírus antes de você receber a vacina. Após ter recebido a vacina você será liberado(a) e receberá um papel impresso (Cartão do Participante). No Cartão do Participante você irá anotar a sua temperatura axilar durante os primeiros três dias após a vacinação, e tudo o que você sentir e achar que está relacionado com a vacina que você tomou. Receberá também orientação por escrito para a próxima visita.

2ª VISITA: Vinte e um dias após o recebimento da primeira dose da vacina. Nesta visita você deverá trazer o seu Cartão do Participante preenchido para entregar ao pesquisador. Será colhido novamente amostra de sangue (5ml) que será utilizada para demonstrar como o seu organismo produziu anticorpo contra a vacina que você recebeu, e portanto, saber se você ficou protegido(a) ou não contra esse vírus. Nessa visita será entregue uma orientação, por escrito, para o retorno ao atendimento médico caso ocorra aparecimento de quadro respiratório agudo.

Se você permitir, todo mês a equipe da pesquisa entrará em contato com você, por telefone ou correio eletrônico, o que você optar, para reforçar a importância de procurar atendimento médico na presença de quadro respiratório agudo, durante o período de até 6 meses após a vacinação.

Consulta médica se quadro respiratório agudo até seis meses após recebimento da vacina de Influenza: se você apresentar sinais e sintomas de quadro respiratório agudo, conforme material de orientação por escrito que você recebeu, você deverá retornar ao Hospital das Clínicas para atendimento médico, até 7 dias do início dos sintomas, quando será coletado material respiratório para confirmação ou não de infecção por vírus da Influenza. Esse atendimento médico poderá ser no Ambulatório de Infecção em Imunodeprimido (localizado no 5º andar do Prédio dos Ambulatórios, bloco 2A),

às quintas-feiras, o Ambulatório do STR (localizado no 5º andar do Prédio dos Ambulatórios, Urologia, Bloco 5) ou no Pronto Socorro do Hospital das Clínicas, conforme está explicado no material entregue.

C – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos

Com relação à vacina, no local da aplicação você poderá sentir dor, inchaço, vermelhidão e até coceira. Você poderá também ter febre, dor pelo corpo, enjoo, náusea, tontura, vômitos, dor de cabeça, sudorese, dor nas juntas, tremores e fraqueza. A fraqueza que começa nas pernas e depois atinge os braços característica da doença conhecida pelo nome de Síndrome de Guillain-Barré eventualmente pode ocorrer após a infecção pelo vírus Influenza, mas não se espera que ela ocorra após o recebimento de vacina de Influenza. Se você apresentar qualquer uma dessas situações você deverá entrar em contato com o médico pesquisador para receber orientações de como proceder. Acredita-se que se alguma dessas manifestações ocorrerem, elas serão leves como se você estivesse tendo uma gripe fraca.

Com relação à coleta de sangue para a realização dos exames laboratoriais, esses procedimentos serão realizados por profissionais devidamente capacitados, com uso de material descartável, devidamente identificado. Ainda assim pode ocorrer dor no local da picada, pequenos extravasamentos sanguíneos que deixarão manchas arroxeadas, mas que logo desaparecerão.

Com relação à coleta de material respiratório para a confirmação ou não de infecção pelo vírus Influenza, caso você apresente quadro respiratório agudo, esse procedimento será realizado da mesma maneira que é realizado de rotina para todos os participantes transplantados renais que apresentam quadro respiratório agudo, porque infecção pelo vírus da Influenza em pessoas com imunidade reduzida, como no caso dos transplantados renais, deve sempre ser investigada para ser devidamente tratada. Esse exame pode causar um leve desconforto local durante a coleta, mas que logo desaparecerão, sem outras complicações. Todo o tratamento da infecção pelo vírus da Influenza, se confirmada, seguirá a rotina do Serviço do Transplante Renal realizada para todos os pacientes transplantados, independente da

participação nesse estudo.

D – Imunidade Celular

Quinze participantes de cada grupo serão convidados para participar da análise de imunidade celular. Para esses voluntários, será necessário colher 30ml de sangue adicionais na primeira e última visita da pesquisa. As amostras colhidas serão armazenadas para utilização em análises futuras.

E – Armazenamento de Amostras Biológicas

Quando as amostras de sangue são processadas para fazer análises de imunidade (como as células do seu corpo respondem à vacinação) há sobras de amostras. Esse material que sobra pode ser guardado para futuras análises ou pesquisas sobre a gripe e a vacina. As amostras são marcadas com um código, seu nome não aparecerá nelas. Essas amostras não serão vendidas e nem usadas para fazer produtos comerciais. O pesquisador deverá obter uma nova permissão do comitê de ética antes de fazer qualquer pesquisa futura utilizando essas amostras. A futura análise dessas amostras será essencial para tentar compreender melhor as respostas de suas células à vacina e pode contribuir para melhorias no esquema de vacinação dos transplantados renais, e outras pessoas com imunidade baixa.

Da mesma maneira, o material respiratório colhido se você tiver suspeita de gripe, também pode ser armazenado e permitir estudos futuros de vírus respiratórios. Portanto, se você não concorda que suas amostras sejam armazenadas, não poderá participar deste estudo. Os participantes que concordam que suas amostras sejam armazenadas podem mudar de ideia, a qualquer momento, quanto à permissão de uso de suas amostras em pesquisas futuras. Caso mudem de ideia, telefonem ou escrevam para o médico ou enfermeira do estudo para informá-los. A partir de então suas amostras não serão disponibilizadas para pesquisa e serão destruídas.

F – Benefícios para o participante

Ao colaborar com este estudo você terá a chance de ficar protegido (a) contra a gripe, ou pelo menos, se proteger das suas complicações.

G – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos

Não existem procedimentos alternativos que possam ser vantajosos. Você pode optar por não participar do estudo.

H – Confidencialidade

Todas as informações coletadas durante o estudo serão sigilosas, de forma a proteger sua identidade. Se você não retornar para uma das duas visitas programadas, nós tentaremos encontrá-lo(a), por telefone ou pessoalmente em sua casa. Nós só tentaremos contatá-lo nos locais que você nos informar e autorizar.

I – Garantia de acesso

A participação nesse estudo é voluntária - você decide se quer ou não participar do estudo. Se você escolher não participar, você não terá nenhum tipo de censura ou limitação dos seus direitos e continuará sendo acompanhado(a) por seu médico sem nenhuma restrição. Se você decidir participar, você poderá se retirar do estudo a qualquer hora, sem nenhum tipo de prejuízo. A qualquer momento, se você tiver alguma preocupação ou dúvidas sobre a pesquisa, você pode entrar em contato com o pesquisador responsável pela sua participação no estudo de acordo com as informações abaixo:

Pesquisador: Ligia C. Pierrotti; Serviço de Transplante Renal – secretaria:
3069-8084/3069-8087, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255, 7^o andar – São Paulo- SP. Celular: 11-97563 4142.

IMPORTANTE: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

CAPPesq – Comissão de Ética de Análise para Projetos de Pesquisa

Prédio da Administração — Diretoria Clínica
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos 225, 5º andar
Cerqueira César. CEP: 05403-010. São Paulo - SP
Telefone: 11-3069-6442 ramal 16,17,18 ou 20
FAX: 11-3069-6442 ramal 26
Email: cappesq@hcnet.usp.br

J – Esclarecimentos dados pelo pesquisador aos participantes do estudo

- a) Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- b) Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo ou algum tipo de censura ou limitação dos seus direitos. Continuará sendo acompanhado(a) por seu médico sem nenhuma restrição.
- c) Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum voluntário.
- d) Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados.
- e) Despesas e compensações: Não há despesas pessoais para o voluntário participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e visitas ao hospital. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.
- f) Disponibilidade de assistência médica na instituição através da qual você foi recrutado(a), caso você apresente alguma intercorrência médica comprovadamente associada ao uso da vacina.
- g) Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para a pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Ensaio Clínico Aberto Randomizado Paralelo para avaliação da imunogenicidade de três esquemas de administração da Vacina Influenza Trivalente (fragmentada e inativada) em Receptores de Transplante Renal”**. Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em

participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Estou ciente de que não poderei participar do estudo se não concordar que as amostras de sangue sejam armazenadas.

Em relação a sua participação no estudo da imunidade celular:

[☐] Sim, eu aceito participar do estudo de imunidade celular, e dessa forma, autorizo a coleta adicional de 30 ml de sangue na primeira e na última visita do estudo.

[☐] Não, eu não aceito participar do estudo de imunidade celular.

[☐] Não fui convidado para participar do estudo de imunidade celular.

Em relação ao uso de suas amostras de sangue para estudos futuros:

[☐] Sim, eu dou permissão para o uso das minhas amostras de sangue em pesquisas futuras.

[☐] Não, eu não dou permissão para o uso das minhas amostras de sangue em pesquisas futuras e sou ciente que por isso não posso fazer parte do estudo.

____/____/____

Nome do participante

Data

Assinatura do participante

____/____/____

Nome do responsável legal

Data

Assinatura do responsável legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para a participação neste estudo.

____/____/____

Nome do investigador

Data

Assinatura do investigador

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos
Voluntários Sadios

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

.....
BAIRRO: CIDADE

.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

.....
BAIRRO: CIDADE

.....
CEP:..... TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Ensaio Clínico Aberto Randomizado Paralelo para avaliação da imunogenicidade de três esquemas de administração da Vacina Influenza Trivalente (fragmentada e inativada) em Receptores de Transplante Renal.

2. PESQUISADORES:

Pesquisador: Fatuma Catherine Atieno Odongo

Coordenador Geral: Alexander R. Precioso

Pesquisadores: Alexander R. Precioso^{1,2} Ana Marli C. Sartori³, Elias David-Neto⁴, João L. Miraglia², Karim Ibrahim Yaquib³, Lígia Camera Pierrotti³, Luis Sérgio Azevedo⁴, Maria do Carmo S. T. Timenetsky⁵, Marta Heloisa Lopes³, William Nahas⁴

3. INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

¹ Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Departamento de Pediatria da FMUSP, Disciplina de Pediatria Preventiva e Social – Diretoria de Ensaios Clínicos - Fundação Butantan.

² Fundação Butantan – Instituto Butantan – Diretoria Médica de Ensaios Clínicos.

³ Departamento/Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Grupo de infecção em imunodeprimidos e Centro de Referência em Imunobiológicos Especiais (CRIE).

⁴ Serviço de Transplante Renal da Divisão de Urologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

⁵ Instituto Adolfo Lutz - Divisão de Biologia Médica.

4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

5. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 MESES

A – Estudo e objetivo(s)

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar como o seu organismo responde à administração da vacina de influenza produzida pelo Instituto Butantan utilizando a dose padrão da vacina (usada de rotina todo ano).

A gripe é uma doença infecciosa causada por vírus conhecidos pelo nome de Influenza. Os vírus Influenza podem causar doença tanto nos seres humanos como em outros animais, como as aves e os porcos. É muito comum

esses vírus sofrerem mudanças ou mesmo se misturarem entre si dando origem a novos vírus Influenza que podem ser mais ou menos graves para os seres humanos. Sabe-se que, a cada ano, 250.000 a 500.000 pessoas morrem de gripe em todo o mundo.

A melhor forma de se proteger para não ter gripe é se vacinar. Porém, a vacina protege contra infecção por um período limitado, e por isso, a cada ano você precisa receber a vacina de gripe, mesmo que já tenha recebido nos anos anteriores. E a cada ano a vacina é atualizada, para proteção dos vírus da gripe que podem ir se modificando continuamente.

Esse estudo vai investigar se a dose dobrada ou duas doses sequenciais da vacina administradas com um intervalo de 21 dias, em pessoas com imunidade baixa, como os transplantados renais, melhora ou não a proteção oferecida pela vacina. Ainda não sabemos se é melhor receber a vacina na dose padrão, na dose dobrada ou duas doses sequenciais da vacina administradas com um intervalo de 21 dias, mas sabemos que a vacina é formada por vírus morto, e por isso, não há risco de infecção pela vacina, em qualquer dose utilizada.

A sua participação neste estudo será importante porque através da comparação da resposta de suas células à vacina de influenza com a resposta de pessoas que têm baixa imunidade (pessoas que receberam transplante de rim), poderemos compreender melhor porque os transplantados renais apresentam respostas insatisfatórias à vacina. Além disso, de acordo com os resultados que obtivermos, poderemos avaliar o melhor esquema de vacinação dos transplantados renais para que eles sejam mais protegidos da gripe.

Todos os participantes do estudo receberão a vacina em apenas uma aplicação e na forma de injeção no braço que não é usado para escrever. A vacina será administrada no Centro de Referência em Imunobiológicos Especiais (CRIE) do Hospital das Clínicas, localizado no 4º andar do Prédio dos Ambulatórios (Prédio Amarelo).

B – Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Antes que você decida participar deste estudo os pesquisadores vão explicar tudo a respeito da sua participação. Após essa explicação você deverá ler este termo de consentimento e deverá assiná-lo após o esclarecimento de todas as suas dúvidas. Após o seu consentimento você iniciará sua participação que está descrita a seguir.

1ª VISITA: Após ter assinado esse consentimento será colhido 45 mL de sangue antes de você receber a vacina. Essa amostra de sangue será utilizada para demonstrar quais são os seus níveis de anticorpo contra esse vírus antes de você receber a vacina. Após ter recebido a vacina você será liberado(a) e receberá um papel impresso (Cartão do Participante). No Cartão do Participante você irá anotar a sua temperatura axilar durante os primeiros três dias após a vacinação, e tudo o que você sentir e achar que está relacionado com a vacina que você tomou. Receberá também orientação por escrito para a próxima visita.

2ª VISITA: Vinte e um dias após o recebimento da vacina. Nesta visita você deverá trazer o seu Cartão do Participante preenchido para entregar ao pesquisador. Será colhido novamente amostra de sangue (35ml) que será utilizado para demonstrar como o seu organismo produziu anticorpo contra a vacina que você recebeu, e portanto, saber se você ficou protegido(a) ou não contra esse vírus.

C – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos

Com relação à vacina, no local da aplicação você poderá sentir dor, inchaço, vermelhidão e até coceira. Você poderá também ter febre, dor pelo corpo, enjoo, náusea, tontura, vômitos, dor de cabeça, sudorese, dor nas juntas, tremores e fraqueza. A fraqueza que começa nas pernas e depois atinge os braços característica da doença conhecida pelo nome de Síndrome de Guillain-Barré eventualmente pode ocorrer após a infecção pelo vírus influenza, mas não se espera que ela ocorra após o recebimento de vacina de Influenza. Se você apresentar qualquer uma dessas situações você deverá entrar em contato com o médico pesquisador para receber orientações de como proceder. Acredita-se que se alguma dessas manifestações ocorrerem,

elas serão leves como se você estivesse tendo uma gripe fraca.

Com relação à coleta de sangue para a realização dos exames laboratoriais, esses procedimentos serão realizados por profissionais devidamente capacitados, com uso de material descartável, devidamente identificado. Ainda assim pode ocorrer dor no local da picada, pequenos extravasamentos sanguíneos que deixarão manchas arroxeadas, mas que logo desaparecerão.

Com relação à coleta de material respiratório para a confirmação ou não de infecção pelo vírus Influenza, caso você apresente quadro respiratório agudo, esse procedimento será realizado da mesma maneira que é realizado de rotina para todos os participantes transplantados renais que apresentam quadro respiratório agudo, porque infecção pelo vírus da Influenza em pessoas com imunidade reduzida, como no caso dos transplantados renais, deve sempre ser investigada para ser devidamente tratada. Esse exame pode causar um leve desconforto local durante a coleta, mas que logo desaparecerão, sem outras complicações. Todo o tratamento da infecção pelo vírus da Influenza, se confirmada, seguirá a rotina do Serviço do Transplante Renal.

D – Imunidade Celular

Quinze participantes de cada grupo serão convidados para participar da análise de imunidade celular. Para esses voluntários, será necessário colher 30ml de sangue adicionais na primeira e última visita da pesquisa. As amostras colhidas serão armazenadas para utilização em análises futuras.

E – Armazenamento de Amostras Biológicas

Quando as amostras de sangue são processadas para fazer análises de imunidade (como as células do seu corpo respondem à vacinação) há sobras de amostras. Esse material que sobra pode ser guardado para futuras análises ou pesquisas sobre a gripe e a vacina. As amostras são marcadas com um código, seu nome não aparecerá nelas. Essas amostras não serão vendidas e nem usadas para fazer produtos comerciais. O pesquisador deverá obter uma

nova permissão do comitê de ética antes de fazer qualquer pesquisa futura utilizando essas amostras. A futura análise dessas amostras será essencial para tentar compreender melhor as respostas de suas células à vacina e pode contribuir para melhorias no esquema de vacinação dos transplantados renais, e outras pessoas com imunidade baixa.

Da mesma maneira, o material respiratório colhido se você tiver suspeita de gripe, também pode ser armazenado e permitir estudos futuros de vírus respiratórios. Portanto, se você não concorda que suas amostras sejam armazenadas, não poderá participar deste estudo. Os participantes que concordam que suas amostras sejam armazenadas podem mudar de ideia, a qualquer momento, quanto à permissão de uso de suas amostras em pesquisas futuras. Caso mudem de ideia, telefonem ou escrevam para o médico ou enfermeira do estudo para informá-los. A partir de então suas amostras não serão disponibilizadas para pesquisa e serão destruídas.

F – Benefícios para o participante

Ao colaborar com este estudo você terá a chance de ficar protegido (a) contra a gripe, ou pelo menos, se proteger das suas complicações.

G – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos

Não existem procedimentos alternativos que possam ser vantajosos. Você pode optar por não participar do estudo.

H – Confidencialidade

Todas as informações coletadas durante o estudo serão sigilosas, de forma a proteger sua identidade. Se você não retornar para uma das duas visitas programadas, nós tentaremos encontrá-lo(a), por telefone ou pessoalmente em sua casa. Nós só tentaremos contatá-lo nos locais que você nos informar e autorizar.

I – Garantia de acesso

A participação nesse estudo é voluntária - você decide se quer ou não participar do estudo. Se você decidir participar, você poderá se retirar do estudo a qualquer hora, sem nenhum tipo de prejuízo. A qualquer momento, se você tiver alguma preocupação ou dúvidas sobre a pesquisa, você pode entrar em contato com o pesquisador responsável pela sua participação no estudo de acordo com as informações abaixo:

Pesquisador: Ligia C. Pierrotti; Serviço de Transplante Renal – secretaria:
3069-8084/3069-8087, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255, 7º andar – São Paulo- SP. Celular: 11-97563 4142.

IMPORTANTE: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

CAPPesq – Comissão de Ética de Análise para Projetos de Pesquisa
Prédio da Administração — Diretoria Clínica
Endereço: Rua Ouvídio Pires de Campos 225, 5º andar
Cerqueira César. CEP: 05403-010. São Paulo - SP
Telefone: 11-3069-6442 ramal 16,17,18 ou 20
FAX: 11-3069-6442 ramal 26
Email: cappesq@hcnet.usp.br

J – Esclarecimentos dados pelo pesquisador aos participantes do estudo

- h) Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- i) Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo ou algum tipo de censura ou limitação dos seus direitos. Continuará sendo acompanhado(a) por seu médico sem nenhuma restrição.
- j) Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum voluntário.
- k) Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados.
- l) Despesas e compensações: Não há despesas pessoais para o voluntário participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e visitas ao hospital. Também não há compensação financeira relacionada à sua

participação.

- m) Disponibilidade de assistência médica na instituição através da qual você foi recrutado(a), caso você apresente alguma intercorrência médica comprovadamente associada ao uso da vacina.
- n) Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para a pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Ensaio Clínico Aberto Randomizado Paralelo para avaliação da imunogenicidade de três esquemas de administração da Vacina Influenza Trivalente (fragmentada e inativada) em Receptores de Transplante Renal”**. Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Estou ciente de que não poderei participar do estudo se não concordar que as amostras de sangue sejam armazenadas.

Em relação a sua participação no estudo da imunidade celular:

- [☐] Sim, eu aceito participar do estudo de imunidade celular, e dessa forma, autorizo a coleta adicional de 30 ml de sangue na primeira e na última visita do estudo.
- [☐] Não, eu não aceito participar do estudo de imunidade celular.
- [☐] Não fui convidado para participar do estudo de imunidade celular.

Em relação ao uso de suas amostras de sangue para estudos futuros:

- [☐] Sim, eu dou permissão para o uso das minhas amostras de sangue em pesquisas futuras.
- [☐] Não, eu não dou permissão para o uso das minhas amostras de sangue em pesquisas futuras e sou ciente que por isso não posso fazer parte do estudo.

_____/_____/_____

Nome do participante

Assinatura do participante

Data

_____/_____/_____

Nome do responsável legal

Assinatura do responsável legal

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para a participação neste estudo.

_____/_____/_____

Nome do investigador

Assinatura do investigador

Data

APÊNDICE C - Foto dos cartões com o grupo de randomização e a dose da vacina

Dose habitual=Dose padrão; Dose sequencial=Dose de reforço.

APÊNDICE D - Classificação da intensidade dos Eventos Adversos solicitados.

Evento Adverso	Grau 1 (leve)	Grau 2 (moderada)	Grau 3 (grave)	Grau 4 (risco à vida)
Dor no local da administração da vacina	Não interfere com atividades diárias	Uso repetido de analgésico não narcótico >24 horas OU Interfere pouco com atividades diárias	Qualquer uso de analgésico narcótico OU Impede atividades diárias	Visita ao pronto socorro* OU Hospitalização
Eritema no local da administração da vacina**	25 – 50 mm	51 – 100 mm	>100 mm	Necrose OU Dermatite esfoliativa
Inchaço no local da administração da vacina**	25 – 50 mm	51 – 100 mm OU Interfere pouco com atividades diárias	>100 mm	Necrose
Enduração no local da administração da vacina**	25 – 50 mm	51 – 100 mm OU Interfere com atividades diárias	>100 mm	Necrose
Equimose no local da administração da vacina	25 – 50 mm	51 – 100 mm OU Interfere com atividades diárias	>100 mm	Necrose
Febre	37,8 – 38,4°C	38,5 – 38,9°C	39,0 – 40,0°C	>40°C
Calafrios	Sensação leve de frio; arrepios, bater os dentes	Tremor moderado do corpo inteiro, requer uso de narcóticos	Grave ou prologando, sem resposta aos narcóticos	-----
Cefaléia	Não interfere com atividades diárias	Uso repetido de analgésico não narcótico >24 horas OU Interfere pouco com atividades diárias	Qualquer uso de analgésico narcótico OU Impede atividades diárias	Visita ao pronto socorro* OU Hospitalização
Fadiga	Não interfere com atividades diárias	Interfere pouco com atividades diárias	Impede atividades diárias	Visita ao pronto socorro* OU Hospitalização
Mialgia	Não interfere com atividades diárias	Interfere pouco com atividades diárias	Impede atividades diárias	Visita ao pronto socorro* OU Hospitalização

* Requer 12 horas ou mais de internação em enfermaria ou pronto socorro para manejo do Evento Adverso.

** O valor registrado deve ser o aferido no local de maior diâmetro e como uma variável contínua.

APÊNDICE E - Classificação da relação causal dos Eventos Adversos solicitados.

<u>Certa</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Uma alteração (valor anormal) em exame laboratorial, com relação temporal plausível em relação à administração da intervenção; • Não pode ser explicado por doença concomitante ou outra intervenção ou medicamento; • A resposta à interrupção ou retirada é plausível (farmacologicamente, patologicamente); • O evento é definido farmacologicamente ou fenomenologicamente (i.e., uma desordem objetiva e específica ou um fenômeno farmacologicamente reconhecido); • Re-exposição satisfatória, se necessário.
<u>Provável</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Um evento clínico, incluindo uma alteração (valor anormal) em exame laboratorial, com relação temporal razoável em relação à administração da intervenção; • Improvável que seja atribuído a uma doença concomitante ou a outra intervenção ou medicamento; • A resposta à interrupção ou retirada é clinicamente razoável; • Re-exposição não exigida.
<u>Possível</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Um evento clínico, incluindo uma alteração (valor anormal) em exame laboratorial, com relação temporal razoável em relação à administração da intervenção; • Também pode ser explicado por doença concomitante ou outras intervenções ou medicamentos; • A informação sobre a retirada ou interrupção do tratamento pode estar faltando ou não ser clara.
<u>Improvável</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Um evento clínico, incluindo uma alteração (valor anormal) em exame laboratorial, que devido ao momento da administração da intervenção faz uma relação improvável, mas não impossível; • Outra doença ou outro medicamento fornecem uma explicação plausível.
<u>Não relacionado</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Um evento clínico, incluindo uma alteração (valor anormal) em exame laboratorial, que devido ao momento da administração da intervenção faz que não exista uma relação; • Outra doença ou outro medicamento fornecem uma explicação plausível

APÊNDICE F - Aprovação do protocolo de estudo

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ENSAIO CLÍNICO ABERTO RANDOMIZADO PARALELO PARA AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE TRÊS ESQUEMAS DE ADMINISTRAÇÃO DA VACINA INFLUENZA TRIVALENTE (FRAGMENTADA E INATIVADA) EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL
Pesquisador Responsável: Lígia Camera Pierrotti **Versão:** 3
Pesquisador Executante: Fatuma Catherine Atieno Odongo **CAAE:** 27529814.0.0000.0068
Co-autores: Alexander R. Precioso, João Luiz Miraglia, Ricardo Palacios, Gabriella Mondini, Elias David-Neto, Luiz Sérgio Azevedo, Fabiana Agena, William Nahas, Ana Mari Christovam Sartori, Marta Heloisa Lopes, Karim Yaqub Ibrahim, Helio Hehl Caiaffa Filho, Maria do Carmo S.T. Timenetsky, Esper Georges Kallás, Acram Zahredine Abdul Latif, Cecília Salete Alencar
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Dra. Lígia Pierrotti
Instituição: HCFMUSP
Departamento: CIRURGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11952

Número do Parecer: 610.341

Data da Relatoria: 09/04/2014

Apresentação do Projeto: Trata-se de Ensaio Clínico Aberto Randomizado Paralelo para avaliação da imunogenicidade de três esquemas de administração da Vacina Influenza Trivalente (fragmentada e inativada) em Receptores de Transplante Renal, designado como FLU-03-18.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar a resposta humoral de pacientes receptores de transplante renal à vacina influenza trivalente fragmentada e inativada) produzida pelo Instituto Butantan administrada em três esquemas de vacinação: na dose preconizada, na dose dobrada e em duas doses, administradas com um intervalo de 21 dias. Como objetivos secundários, os autores propõem avaliar a segurança da vacina influenza trivalente (fragmentada e inativada) produzida pelo Instituto Butantan administrada a pacientes receptores de transplante renal em três esquemas de vacinação: na dose preconizada, na dose dobrada e em duas doses, administradas com um intervalo de 21 dias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Nesta 2ª versão do TCLE os autores adequaram o risco para baixo e não mínimo. Com relação aos benefícios, os pacientes transplantados já recebem a vacinação preconizada e podem não apresentar boa resposta. Neste caso, poderão ser beneficiados se a dose dobrada apresentar evidências de melhor resposta imune.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Trata-se de ensaio clínico aberto, randomizado, devidamente registrado. O estudo está bem delineado, apresenta objetivos claros e metodologia adequada. Na versão de 6/4/2014, os pesquisadores esclarecem sobre

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

recrutamento dos indivíduos do grupo controle (saúdáveis) e sobre o financiamento da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os documentos estão apresentados de forma satisfatória na nova versão. Os pesquisadores revisaram e adequaram os termos e o conteúdo do TCLE e atualizaram os telefones da CEP e dos pesquisadores.

Recomendações: O projeto está adequado para aprovação, devendo apresentar os relatórios temporais exigidos pela CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências ou inadequações após a anexação dos esclarecimentos/adequações solicitados.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 09 de Abril de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

APÊNDICE G - Eventos adversos e reações adversas em até 3 dias após vacinação no grupo da dose padrão da vacina na população mITT (n=57)

	EVENTO ADVERSO		GRAU 1		GRAU 2		GRAU 3		GRAU 4		REAÇÃO ADVERSA		GRAU 1		GRAU 2		GRAU 3		GRAU 4	
SOLICITADO	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Dor	9	15.8	9	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	9	15.8	9	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Eritema	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Inchaço	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Enduração	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Equimose	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Calafrios	2	3.5	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	3.5	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Cefaleia	2	3.5	1	50.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Fadiga	3	5.3	3	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	3.5	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Febre	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Mialgia	2	3.5	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	3.5	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	19		18		1		0		0		16		16		0		0		0	
NÃOSOLICITADO	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Dorsalgia	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Inflamação	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Influenza	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Nausea	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0
Piora de resfriado	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0
Prurido	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Resfriado	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Rinorreia	2	3.5	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Sinusite	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Tontura	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0
Tosse	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	12		7		5		0		0		5		2		3		0		0	

APÊNDICE H - Eventos adversos e reações adversas em até 3 dias após vacinação no grupo da dose dobrada da vacina na população MITT (n=58)

	EVENTO ADVERSO				Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 4		REAÇÃO ADVERSA				Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
SOLICITADO																								
Dor	11	19.0	10	90.9	1	9.1	0	0.0	0	0.0	11	19.0	10	90.9	1	9.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Eritema	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Inchaço	1	1.7	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	1	1.7	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Enduração	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Equimose	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Calafrios	4	6.9	3	75.0	1	25.0	0	0.0	0	0.0	3	5.2	3	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Cefaleia	2	3.4	0	0.0	2	100	0	0.0	0	0.0	2	3.4	0	0.0	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Fadiga	1	1.7	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.7	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Febre	3	5.2	0	0.0	2	66.7	1	33.3	0	0.0	2	3.4	0	0.0	1	50.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Mialgia	3	5.2	1	33.3	2	66.7	0	0.0	0	0.0	2	3.4	1	50.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	25		15		9		1		0		22		15		6		1		0					
NÃO SOLICITADO	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Diarreia aguda	1	1.7	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Tosse	2	3.4	1	50.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0	2	3.4	1	50.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	3		1		2		0		0		2		1		1		0		0					

APÊNDICE I - Eventos adversos e reações adversas em até 3 dias após vacinação no grupo da dose de reforço da vacina na população mITT (n=57)

	EVENTO ADVERSO		Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 4		REAÇÃO ADVERSA		Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
SOLICITADO																				
Dor	11	19.3	11	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	11	19.3	11	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Eritema	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Inchaço	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Enduração	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Equimose	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Calafrios	2	3.5	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	3.5	2	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Cefaleia	2	3.5	0	0.0	2	100	0	0.0	0	0.0	2	3.5	0	0.0	2	100	0	0.0	0	0.0
Fadiga	3	5.3	2	66.7	1	33.3	0	0.0	0	0.0	3	5.3	2	66.7	1	33.3	0	0.0	0	0.0
Febre	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Mialgia	2	3.5	1	50.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0	2	3.5	1	50.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	21		17		4		0		0		21		17		4		0		0	
NÃO SOLICITADO	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Diarreia aguda	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Epistaxe	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Herpes	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Laringite	1	1.8	0	0.0	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Rinorreia	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Sudorese	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	1	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	6		4		2		0		0		2		2		0		0		0	

APÊNDICE J - Ocorrência de eventos adversos sérios por grupo de vacinação mostrando o início, a duração e o desfecho

DOSE PADRÃO	TEMPO ENTRE VACINAÇÃO E INÍCIO DO EVENTO ADVERSO (DIAS)	DURAÇÃO (DIAS)	DESFECHO
CARCINOMA RENAL	98	8	RECUPERADO
ESTENOSE DE URETRA	73	3	RECUPERADO
FIBRILACAO ATRIAL AGUDA	176	6	RECUPERADO
INSUFICIENCIA CARDIACA	108	4	RECUPERADO
INTOXICACAO CUMARINICA	77	6	RECUPERADO
NEFRECTOMIA BILATERAL	112	8	RECUPERADO
OTITE MEDIA	117	13	RECUPERADO
PIELONEFRITE	35	13	RECUPERADO
PIELONEFRITE	169	39	RECUPERADO
PIELONEFRITE	73	17	RECUPERADO
PIELONEFRITE	105	52	ÓBITO
PIELONEFRITE	141	98	RECUPERADO
PIELONEFRITE	131	8	RECUPERADO
PNEUMONIA	20	10	RECUPERADO
DOSE DOBRADA	TEMPO ENTRE VACINAÇÃO E INÍCIO DO EVENTO ADVERSO (DIAS)	DURAÇÃO (DIAS)	DESFECHO
ABSCESSO	135	15	RECUPERADO
CELULITE	167	21	RECUPERADO
CISTITE BOLHOSA	158	31	RECUPERADO
DIARREIA AGUDA	52	3	RECUPERADO
CISTO RENAL INFECTADO	100	14	RECUPERADO

DIARREIA AGUDA	105	21	RECUPERADO
DIARREIA SUBAGUDA	73	25	RECUPERADO
FEBRE DE ORIGEM INDETERMINADA	64	20	RECUPERADO
HÉRNIA INCISIONAL	122	15	RECUPERADO
INSUFICIENCIA ARTERIAL	8	2	RECUPERADO
INSUFICIENCIA RENAL	7	12	RECUPERADO
PANCREATITE AGUDA	136	32	RECUPERADO
PIELONEFRITE	10	10	RECUPERADO
PIELONEFRITE	38	11	RECUPERADO
PNEUMONIA	28	42	RECUPERADO
PNEUMONIA HOSPITALAR	70	16	RECUPERADO
REJEICAO AGUDA DO ENXERTO	80	43	RECUPERADO
REJEICAO AGUDA DO ENXERTO	80	85	RECUPERADO
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA	105	.	RECUPERADO

DOSE DE REFORÇO	TEMPO ENTRE VACINAÇÃO E INÍCIO DO EVENTO ADVERSO (DIAS)	DURAÇÃO (DIAS)	DESFECHO
ABSCESSO PULMONAR	29	1	ÓBITO
COLITE	16	5	RECUPERADO
HEMORRAGIA DIGESTIVA BAIXA	88	37	RECUPERADO
PIELONEFRITE	119	6	RECUPERADO
PIELONEFRITE	54	15	RECUPERADO
PIELONEFRITE	113	10	RECUPERADO