ALESSANDRA APARECIDA MACHADO

Imunogenicidade da vacina contra o vírus da influenza sazonal em crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo vírus da imunodeficiência humana

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

Programa: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra. Daisy Maria Machado

São Paulo

2010

ALESSANDRA APARECIDA MACHADO

Imunogenicidade da vacina contra o vírus da influenza sazonal em crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo vírus da imunodeficiência humana

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

Programa: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra. Daisy Maria Machado

Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Machado, Alessandra Aparecida
Imunogenicidade da vacina contra o vírus da influenza sazonal em crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo vírus da imunodeficiência humana / Alessandra Aparecida Machado -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Daisy Maria Machado.

Descritores: 1.Imunogenicidade 2.Vacinas contra influenza 3.HIV 4.Infecções respiratórias/virologia

USP/FM/DBD-452/10

DEDICATÓRIA

Em forma de oração, dedico esta dissertação a Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conduzir meus passos.

À Nossa Senhora Aparecida, pelo abrigo materno.

Aos meus queridos pais, João Machado e Maria Aparecida de Fátima dos Santos Machado, pelas orações, apoio e estímulos inesgotáveis.

Aos meus familiares, Marcio Denilson Machado, Juliana de Novaes Machado e Josué de Novaes Machado.

À Dra. Daisy Maria Machado, amiga e orientadora, exemplo de humildade e competência, com mãos fortes, porém suaves, conduziu este trabalho.

À Dra. Clarisse Martins Machado, pela amizade e estímulo para o desenvolvimento científico e acadêmico.

Ao Dr. Cláudio Sérgio Pannuti e Dra. Vanda A. U. F. de Souza, pela acolhida no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

À Lucy Santos Vilas Boas e Tatiana Mitiko Kanashiro, pela disponibilidade na execução das reações de Inibição da Hemaglutinação.

À Tânia Regina Tozetto Mendoza pela leitura das lâminas de imunufluorescência.

À Ana Carolina Mamana Fernandes de Souza, pela amizade e apoio na realização das técnicas de Biologia Molecular.

À Maria Cristina Domingues da Silva Fink e Luiz Henrique da Silva Nali, pelo encorajamento e auxílio nos PCRs para vírus respiratórios.

Ao Dr. José Eduardo Levi e membros do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês, pela realização dos testes de ELISA para HIV.

Aos funcionários, sempre solícitos, do Centro de Atendimento da Disciplina de Infectologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo.

À equipe gestora da Unidade Escolar Marina Cintra, pela aceite em sediar parte deste trabalho.

A todas as crianças e adolescentes participantes do estudo, sempre prestativos para coleta de dados e materiais biológicos, fundamentais neste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Pós-Graduação, Roseli Antonia Santo e Vânia Regina Miguel, pelo carinho e disponibilidade.

Às amigas- irmãs, Débora Alves dos Santos, Jaila Borges e Kátia Neves, pelo carinho, partilhas e orações.

Aos amigos, José de Paula Paz Júnior, Érica Roberta Godoi, Elaine Xavier de Lima, Célia Luíza de Lima Rodrigues, José Aparecido Nogueira e Rosane Dias Reis, pela amizade e incentivo.

À todos os demais membros do Laboratório de Virologia, pelo auxílio direto ou indireto e agradável convivência: Aluísio A. C. Segurado, Luiz V. F. da Silva Filho, Adriana Tateno, Camila Malta Romano, Cynthia L. M. do Canto, Laura M. Sumita, Marli de Paula Estevam, Silvia Helena de Lima, Wilton Santos Freire, Daniel Alves dos Santos , Cícero R. da Silva Júnior, Daniel R. da Silva, Jussara C.S.P. de Moraes, Luciano M. da Silva, Maria A. F. de Lima, Sonia Ap. dos Anjos Ferraz, Vera Lucia P. da Silva, Synara A. A. Silva, Adriana M. Freire, Renato dos Reis Oliveira, Rodrigo Melim Zerbinati, Marcelo Plaisant Geraldi, Cristiane Mendes de Oliveira, Paulo Roberto Palma Urbano, Maira Marcele Birochi, Priscila Bruce de Souza Braga, Renata Moscoline Romão, Thiago Santiago Faria, Silvia de Andrade Imura, Michele Galhardone Padovan, Wanessa Cardoso da Silva.

Tudo posso naquele que me fortalece.

Filipenses 4, 13.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura de títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS
RESUMO
SUMMARY
1 INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Vírus da influenza..... 1
1.1.1 Características gerais..... 1
1.1.2 Biossíntese viral..... 4
1.1.3 Histórico..... 5
1.1.4 Manifestações clínicas..... 6
1.1.5 Grupo de risco..... 7
1.1.6 Epidemiologia do vírus da influenza..... 8
1.1.6.1 Surtos de gripe na população humana..... 8
1.1.6.2 Epidemias mundiais provocadas pelo vírus da influenza..... 9
1.1.7 Sazonalidade do vírus da influenza..... 11
1.1.8 Medidas de prevenção..... 11
1.1.8.1 Vacinação..... 12
1.1.8.1.1 Eficácia..... 12
1.1.8.1.2 Imunogenicidade..... 12
1.1.8.1.3 Tipos de vacinas..... 13
1.1.8.1.3.1 Vacinas de vírus inativado..... 13
1.1.8.1.3.2 Vacina de vírus vivo atenuado..... 14
1.1.8.1.3.3 Vacinas virossomais..... 15
1.1.9 Rede de Vigilância 16
1.1.10 Vacinação contra o vírus da influenza no Brasil..... 16
1.2 HIV/aids e o vírus da influenza..... 18
1.2.1 HIV/aids..... 18
1.2.2 Infecções por influenza em indivíduos com HIV/aids..... 20
1.2.3 Desempenho da vacinação contra influenza em pacientes

HIV/aids..... 21
2 JUSTIFICATIVA..... 22
3 OBJETIVOS..... 23
4.CASUÍSTICA E MÉTODOS..... 24
4.1 Desenho do estudo..... 24
4.2 Critérios de inclusão do grupo HIV..... 24
4.3 Critério de exclusão do grupo HIV..... 25
4.4 Critérios de inclusão do grupo controle..... 25
4.5 Critérios de exclusão do grupo controle..... 26
4.6 Termo de consentimento livre e esclarecido..... 26
4.7 Aprovação pelos Comitês de Ética e Pesquisa com seres humanos..... 26
4.8 Imunização..... 27
4.9 Acompanhamento..... 27
4.9.1 Pacientes infectados pelo HIV..... 27
4.9.2 Grupo controle..... 28
4.10 Definição de caso de infecção respiratória..... 28
4.11 Coleta e processamento dos materiais..... 28
4.11.1 Sangue..... 28
4.11.2 Inibição da Hemaglutinação..... 29
4.11.2.1 Cultura de células..... 29
4.11.2.2 Cultivo dos vírus..... 30
4.11.2.3 Preparação das hemácias..... 31
4.11.2.4 Titulação dos antígenos..... 31
4.11.2.5 Tratamento do soro..... 32
4.11.2.6 Execução da reação de inibição da hemaglutinação..... 33
4.11.2.7 Determinação dos Títulos Médios Geométricos, Taxa de Soroproteção e Soroconversão..... 34
4.11.3 ELISA..... 34
4.11.4 Lavado de nasofaringe..... 35
4.11.5 Imunofluorescência Direta..... 35
4.11.6 Reação em Cadeia da Polimerase..... 36

4.11.6.1 Extração de RNA..... 36
4.11.6.2 Síntese de cDNA (RT-PCR)..... 37
4.11.6.3 Amplificação das seqüências alvo..... 37
4.11.6.3.1 Influenza A..... 37
4.11.6.3.2 Influenza B..... 38
4.11.6.3.3 Metapneumovirus..... 40
4.11.6.3.4 Rinovirus..... 41
4.11.6.3.5 Adenovirus..... 42
4.11.6.3.5.1 Revelação..... 45
4.11.6.3.6 Coronavirus..... 45
4.11.6.3.6.1 Revelação..... 46
4.11.6.3.7 Bocavirus..... 47
4.11.6.3.7.1 Revelação..... 48
4.11.6.3.8 CD4 e carga viral..... 48
4.11.6.3.9 Quadro clínico e terapia..... 49
4.11.6.3.10 Análise estatística..... 49
4.11.6.3.10.1 Softwares utilizados..... 50
5 RESULTADOS..... 51
6 DISCUSSÃO..... 66
7 CONCLUSÕES..... 73
8 ANEXOS..... 75
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas codificadas pelos segmentos genômicos dos vírus da influenza e suas respectivas funções..... 2
Tabela 2 – Vacinas contra os vírus da influenza disponíveis atualmente..... 15

Tabela 3 – Vacinas contra os vírus da influenza disponíveis no Brasil..... 17
Tabela 4 – Cepas de *Myxovirus influenza* propagados em ovos embrionados de galinha, presentes na vacina contra os vírus da influenza do ano de 2008 para hemisfério sul..... 27
Tabela 5 – Primers e sondas utilizadas para a detecção dos vírus da influenza A..... 37
Tabela 6 - Primers e sondas utilizadas para a detecção dos vírus da influenza B..... 39
Tabela 7 - Primers e sondas utilizadas para a detecção dos metapneumovirus..... 40
Tabela 8 - Primers e sondas utilizadas para a detecção dos rinovirus..... 41
Tabela 9 – Seqüência de *primers* Hex1deg e Hex2deg..... 43
Tabela 10 - Seqüência de *primers* P1 e P2..... 43
Tabela 11 - Seqüência de *primers* CoV1 e CoV2..... 45
Tabela 12 - Seqüência de *primers* 188R e 542R..... 47
Tabela 13 – Sexo e idade das crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo HIV..... 51
Tabela 14 – Valores dos títulos médios geométricos de anticorpos contra os antígenos vacinais H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação segundo exposição ao HIV..... 52
Tabela 15 – Valores dos títulos médios geométricos de anticorpos contra os antígenos vacinais H1, H3 e B em crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo HIV instante pré-vacina e um mês após a vacinação..... 53
Tabela 16 – Taxa de proteção de anticorpos contra os antígenos vacinais H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação segundo grupo de exposição ao HIV..... 54
Tabela 17 – Número (%) de indivíduos protegidos para os antígenos H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação, segundo sexo..... 55

Tabela 18 – Taxa de soroconversão de anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação segundo exposição ao HIV..... 56
Tabela 19 – Freqüência dos agentes virais presentes nos episódios de infecção respiratória segundo infecção pelo HIV..... 58
Tabela 20 – Distribuição do número de episódios de infecção respiratória segundo infecção pelo vírus HIV..... 59
Tabela 21 - Distribuição das crianças soropositivas para o HIV segundo classificação clínica/munológica e número de vacinas contra influenza sazonal recebidas em anos anteriores..... 60
Tabela 22 – Estatística descritiva dos resultados da determinação quantitativa de Linfócitos TCD4+ e TCD8+ no sangue periférico/mm^3 das crianças e adolescentes infectados pelo HIV antes e após a última vacinação..... 61
Tabela 23 – Estatística descritiva da carga viral do HIV detectável das crianças e adolescentes infectados pelo HIV antes e após a última vacinação..... 62
Tabela 24 – Valores dos títulos médios geométricos de anticorpos para os antígenos vacinais H1, H3 e B nas crianças e adolescentes infectados pelo HIV nos instantes pré-vacina e 6 meses após a vacinação..... 62
Tabela 25 – Taxa de proteção dos anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B das crianças e adolescentes infectados pelo HIV nos instantes pré-vacina e seis meses após a vacinação..... 63
Tabela 26 – Valores dos títulos médios geométricos de anticorpos para os antígenos vacinais H1, H3 e B em crianças e adolescentes infectados pelo HIV seis meses após a vacinação segundo número de vacinas recebida..... 63
Tabela 27 - Valores dos títulos médios geométricos dos anticorpos para os antígenos vacinais H1, H3 e B em crianças e adolescentes infectados pelo HIV seis meses após a vacinação segundo CD4+ à

vacinação..... 64
Tabela 28 – Valores dos títulos médios geométricos de anticorpos para os antígenos vacinais H1, H3 e B em crianças e adolescentes infectados pelo HIV seis meses após a vacinação segundo carga viral do HIV..... 64
Tabela 29 – Correlação entre os títulos médios geométricos de anticorpos para os antígenos vacinais H1, H3 e B e número de vacinas recebidas, Linfócitos TCD4+ à vacinação e carga viral do HIV à vacinação..... 65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do vírus da influenza sazonal..... 3
Figura 2 – Taxa de proteção de anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após vacinação nos infectados pelo HIV..... 55
Figura 3 – Taxa de proteção de anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após vacinação nos não infectados pelo HIV..... 55
Figura 4 – Taxa de soroconversão de anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B segundo exposição ao HIV..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP	*American Academy of Pediatrics*
BEPA	Boletim Epidemiológico Paulista
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
CEADIPe	Centro de Atendimento da Disciplina de Infectologia Pediátrica
EDTA	Etilenodiaminotetracético
HA	Hemaglutinina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IMT	Instituto de Medicina Tropical
MDCK	*Martin Darby Canine Kidney*
MS	Ministério da Saúde
NA	Neuraminidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RDE	*Receptor Destroing Enzime*
SBIM	Sociedade Brasileira de imunizações
TMG	Título Médio Geométrico
UHA	Unidade Hemaglutinante

RESUMO

MACHADO AA. Imunogenicidade da vacina contra o vírus da influenza sazonal em crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo vírus da imunodeficiência humana [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO: Indivíduos infectados pelo HIV apresentam maior risco de quadros graves de infecção por influenza sazonal e, portanto, devem receber doses anuais da vacina contra gripe. No entanto, a capacidade dos indivíduos responderem às vacinas com títulos apropriados de anticorpos depende de variáveis como tipo de antígeno vacinal, idade e grau de comprometimento imunológico no momento da imunização. OBJETIVOS: 1) Avaliar a imunogenicidade da vacina contra influenza sazonal em 37 pacientes infectados pelo HIV, em comparação com 29 indivíduos não infectados pelo HIV 2) Realizar a vigilância dos episódios de infecções respiratórias durante o período de acompanhamento após a vacinação. MÉTODOS: Ambos os grupos receberam a vacina contra o vírus da influenza sazonal recomendada para o hemisfério sul em 2008. A resposta de anticorpos contra os antígenos H1N1, H3N2 e B foi medida em amostras de sangue extraídas 1-2h antes da vacinação (T0), após 1 mês (T1) e após 6 meses (T6; apenas no Grupo HIV). A vigilância dos sintomas respiratórios foi realizada através de telefonemas semanais, durante 6 meses após a vacinação. Em indivíduos sintomáticos para infecções respiratórios foram coletadas amostras de lavado nasofaríngeo para pesquisa de vírus respiratórios por Imunofluorescência e PCR: influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3, adenovírus, metapneumovírus, vírus sincicial respiratório, rinovírus e coronavírus. RESULTADOS: A idade mediana da população de estudo foi de 12 (10-18) anos. No momento T1, ambos os grupos mostraram aumento significativo nos TMGs para todos os antígenos. Contudo, o grupo controle apresentou valores mais elevados para os antígenos A/H1N1 e A/H3N2 (p = 0,002 e 0,001, respectivamente). Houve maior aumento na porcentagem de indivíduos não infectados pelo HIV com títulos protetores A/H1N1 (96,6%) em comparação aos infectados pelo HIV (67,6%). No T1 (p=0,004). A porcentagem de indivíduos do grupo controle com aumento de quatro vezes ou mais nos títulos de anticorpos para A/H1N1 e A/H3N2 foram mais elevadas que no grupo HIV (p = 0,03 e 0,01, respectivamente). Agentes virais foram detectados em 39/60 (65%) dos episódios de infecção respiratória no grupo HIV e em 17/32 (53,1%) no grupo controle. Os vírus diagnosticados no grupo HIV e grupo controle foram respectivamente: adenovirus (8,6%), metapneumovirus (1,2%), rinovirus (16,8%), coronavirus (14,0 %) e influenza B (0,1%).CONCLUSÕES: A vacina sazonal contra os vírus da influenza foram imunogenicas em ambos os grupos. Ocorreram diferença nas taxas de soroproteção entre os grupos somente para o antígeno H1, que foi mais elevadas no grupo controle. O grupo controle também mostrou valores mais altos nos TMGs para os antígenos H1 e H3 depois da imunização. Os rinovirus (27,7%) e coronavirus (22,5%) foram os agentes mais prevalentes identificados no grupo infectado pelo HIV. No grupo controle, os vírus mais freqüentes foram os rinovirus (24,2%) e adenovirus (21,2%).

SUMMARY

MACHADO AA. IMMUNOGENICITY OF THE VACCINE AGAINST SEASONAL INFLUENZA IN HIV-INFECTED AND NON-INFECTED CHILDREN AND ADOLESCENTS [DISSERTATION]. SÃO PAULO: "FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO"; 2010

INTRODUCTION: Individuals infected with HIV are at higher risk for severe cases of seasonal influenza infection and therefore should receive annual doses of influenza vaccine. However, the ability to respond to vaccines respond appropriate antibodies titres depends on variables such as vaccine antigen, age and degree of immune impairment at immunization. OBJECTIVES: 1)To evaluate the immunogenicity of a seasonal influenza vaccine in 37 HIV-infected patients (HIV Group), compared to 29 uninfected individuals (Control Group) 2) To carry out a clinical and virological surveillance of influenza in this population during a follow-up period of six months. METHODS: Both groups received the vaccine against seasonal influenza virus recommended for the southern hemisphere in 2008. The antibody response against the antigens H1N1, H3N2 and B were measured in blood samples drawn at vaccination (T0), after 30 days (T1) and after 6 months (T6; only for HIV Group). Antibody titres $\geq$1:40 were considered protective against influenza infection A surveillance of respiratory symptoms was performed weekly by telephone calls for a post-vaccination follow-up period of 6 months. Samples were collected (nasal wash) if respiratory symptoms. DFA and real time PCR was used to diagnose influenza A virus (FLU A) and B (FLU B), respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus types 1, 2 and 3 (Paraflu 1, 2 or 3), adenovirus, coronavirus, rhinovirus, metapneumovirus and bocavirus. RESULTS: The median age of the study population was 12 (10-18) years. At T0, there were no significant differences in the antibody geometric mean titres (GMTs) against all vaccine antigens between groups. One month after vaccination (T1), both groups showed significant increases in the antibody GMTs for all antigens. However, healthy controls showed higher values for antigens A/H1N1 and A/H3N2 ($p = 0.002$ and 0.001, respectively). There was a higher increase in the percentage of HIV-uninfected subjects with protective A/H1N1 antibodies (96.6%) comparing to HIV-infected vaccinees (67.6%) at T1 ($p = 0.004$). The percentage in subjects control group with a fourfold or greater increase of A/H1N1 and A/H3N2 antibody titres was higher than that found in HIV group ($p = 0.03$ and $p = 0.01$, respectively. Viral agents were identified in 39/60 (65%) episodes of respiratory infections in HIV-infected group and in 17/32 episodes (53.1%) from the control group (P=0.273). The virus diagnosed in HIV group and control group were, respectively: Adenovirus (8;6), Metapneumovirus(1;2) Rinovirus(16;8), Coronavirus(14 ;0); Influenza B(0;1). CONCLUSIONS: The seasonal influenza vaccine was immunogenic in both groups. There were differences in seroprotection rates between groups only for AgH1, which was higher in the control group. The control group also showed a greater increase in GMTs for H1 and H3 antigens after immunization. Viral agents were identified in respiratory symptoms during the follow-up: Rhinoviruses (27.7%) and coronavirus (22.5%) were the most prevalent agents identified in HIV-infected individuals. In the control group, the viruses most frequently found were rhinoviruses (24.2%) and adenovirus (21.2%).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Influenza

1.1.1 Características gerais

Os vírus da Influenza, responsáveis por infecções em seres humanos, estão classificados na família *Orthomyxoviridae* e são divididos em 3 diferentes gêneros, *Influenzavirus A*; *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*, de acordo com as diferenças antigênicas em duas de suas proteínas estruturais, a proteína de matriz (M) e a nucleoproteína (NP) (Wright et al., 2007; Girard et al., 2005). São relevantes para a saúde humana os gêneros A e B.

Os *Influenzavirus B* são responsáveis apenas por infecções em seres humanos, já os *Influenzavirus A* podem infectar uma ampla variedade de animais, como aves domésticas, aves aquáticas, suínos, eqüinos e mamíferos marinhos; infecções pelos *Influenzavirus C* são descritas com menor freqüência, tanto em humanos como em animais (Girard et al.,2005; Jofre et al.,2005).

As partículas dos vírus da influenza são esféricas ou filamentosas, com aproximadamente 100 nm de diâmetro, compostas por 0,8 a 1% de RNA; 70% de proteínas; 20% de lipídios e 5 a 8% de carboidratos (Couceiro, 2002). Seu material genético é constituído de RNA de fita simples, com polaridade negativa, segmentado, sendo os gêneros A e B formados por oito segmentos de RNA e o gênero C por apenas sete segmentos de RNA,

responsáveis pela codificação de diferentes proteínas virais (Tabela 1) (Couceiro, 2002; Palese et al.,2007).

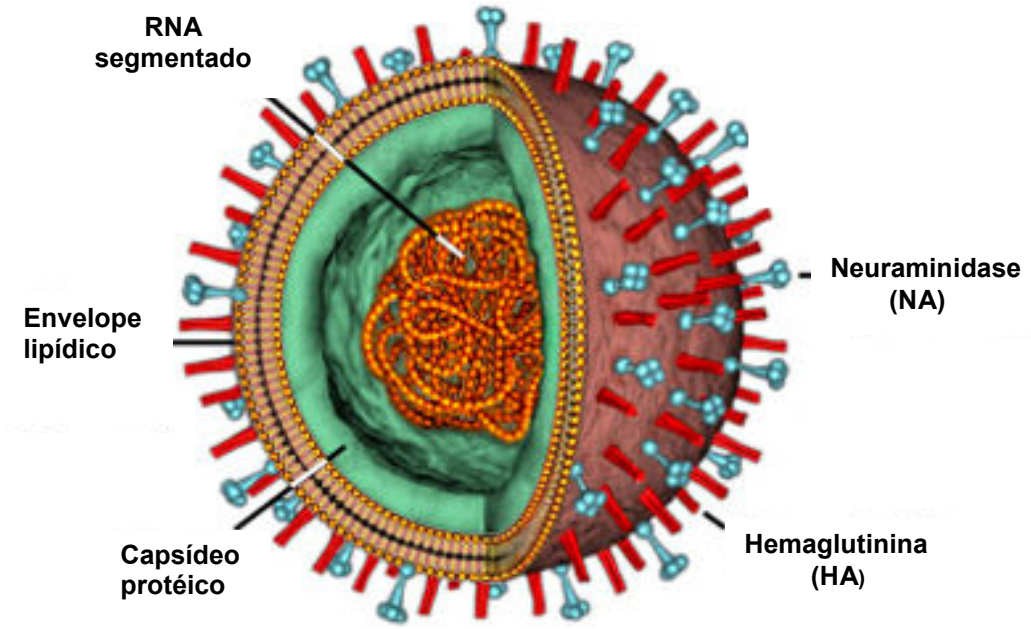
O genoma viral é envolto por um capsídeo protéico e por um envelope lipídico derivado da célula hospedeira (Couceiro,2002;Palese et al.,2007). Na superfície dos vírus estão presentes duas glicoproteínas, denominas Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA) que desempenham importante papel na antigenicidade e patogenia do vírus (Figura1) (Palese, et al., 2007).

Tabela 1 - Proteínas codificadas pelos segmentos genômicos dos vírus da influenza e suas respectivas funções

Proteína	**Função**
PB2	Endonuclease que funciona como iniciadora da transcrição do RNA viral, usando *primers* fornecidos pela célula hospedeira.
PB1	Continuadora do processo de transcrição.
PA	Atua na replicação do RNA viral.
HÁ	Responsável pelos processos de adsorção a receptores celulares e fusão pH-dependente, nos vírus da influenza A e B.
NP	Formadora do nucleocapsídeo viral.
NA	Responsável pelo processo de clivagem de ácidos siálicos, permitindo a expansão da infecção, nos vírus da influenza A e B.
M1	Responsável pelo brotamento.
M2	Canal de prótons, responsável pelo processo de fusão pH-dependente. No vírus da influenza B, a função da proteína M2 é desempenhada por NB.
NS1 e NEP	Responsáveis, respectivamente, por processos envolvendo o RNA mensageiro e pela exportação do nucleocapsídeo do núcleo para o citoplasma.
HEF	Adsorção, fusão e acetil-esterase, presente somente no vírus da influenza C.

(Couceiro, 2002)

Figura I - Representação esquemática do vírus da influenza sazonal



Neuraminidase (NA): Glicoproteína de superfície;

Hemaglutinina (HA): Glicoproteína de superfície;

RNA segmentado: Genoma viral;

Envelope lipídico: Revestimento derivado da célula hospedeira;

Capsídeo protéico: Envoltório viral protéico.

(http: // micro.magnet.fsu.edu / cells / viruses / influenzavirus.html)

Os fragmentos de RNA permanecem no centro, envolvidos por um capsídeo protéico e por um envelope lipídico. Na superfície dos vírus estão presentes as glicoproteínas Hemaglutina (HA) e Neuraminidase (NA).

No gênero *Influenzavirus A* são encontrados diferentes subtipos virais classificados de acordo com as diferenças genéticas e antigênicas de suas HA e NA. Atualmente são conhecidos dezesseis subtipos de HA (H1 – H16) e nove subtipos de NA (N1 – N9). São comumente encontrados circulando na população humana os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 (Palese et al., 2007; Girard et al., 2005).

1.1.2 Biossíntese viral

A replicação dos vírus da influenza ocorre no epitélio do trato respiratório, onde as partículas virais adsorvem-se às células através da ligação da HA com os resíduos de ácido siálico, presentes na superfície celular (Couceiro, 2002). Após a adsorção, ocorre a endocitose, com posterior fusão entre o envelope viral e a membrana do endossomo, processo em que atua a proteína M2 que funciona como canal de prótons (Couceiro, 2002). No interior da célula, o ácido nucléico é liberado do nucleocapsídeo e dirigido ao núcleo pelo citoesqueleto, onde penetra pelo poro nuclear (Couceiro, 2002; Treanor, et al., 2002). No núcleo, ocorrem os processos de transcrição e replicação do genoma viral, restando aos ribossomos a tarefa de síntese das proteínas virais (Jofre et al., 2005).

Após a replicação do genoma e produção de proteínas virais, ocorre a montagem dos novos vírus, com posterior lançamento pelo processo de brotamento, resultando na lise das células infectadas (Jofre et al., 2005). A liberação das partículas virais é favorecida pela glicoproteína NA, que cliva

os resíduos de ácido siálico da membrana citoplasmática, liberando os novos vírus e fazendo com que a infecção se dissemine para as células vizinhas (Couceiro, 2002).

1.1.3 Histórico

Estima-se que o vírus da influenza esteja circulando na população humana por muitos séculos, sendo provavelmente responsável por doenças respiratórias descritas por Hipócrates em 412 a.C. (Wright, 2007).

O termo *influenza* tem sua origem na Idade Média, quando na região de Florença, Itália, pensava-se que os sinais clínicos de febre, tosse e calafrios ocorriam por *influência* de conjunções planetárias (Couceiro, 2002).

O primeiro isolamento do vírus da influenza humana ocorreu em 1933, por Wilson Smith, Christopher Andrewes e Patrick Laidlaw, do Instituto Nacional de Pesquisas Médicas em Londres, Inglaterra. Esses pesquisadores realizaram inoculações intranasais em animais de laboratório (furões), utilizando lavado nasofaringeo de um paciente com sintomas de infecção respiratória. Esses animais apresentaram um quadro semelhante à infecção em seres humanos e transmitiram o vírus para os animais das jaulas vizinhas. Um colaborador do estudo, chamado Charles Stuart-Harris, foi infectado por um desses animais de experimentação e o vírus foi seguidamente isolado desse indivíduo. Por ser o primeiro vírus da influenza humana isolado, foi chamado de *Influenzavirus A*. Em 1940, um vírus antigenicamente distinto foi encontrado e posteriormente classificado como

influenzavirus B. Anos mais tarde, em 1947, foi identificado outro gênero do vírus da influenza denominado, então, *influenzavirus C* (Wright, 2007; Couceiro, 2002).

1.1.4 Manifestações clínicas

A influenza humana, também chamada de gr*ipe*, provoca doença respiratória altamente contagiosa, que após um período curto de incubação, de um a quatro dias, se manifesta por febre geralmente alta, dor de cabeça, cansaço extremo, tosse seca, dor de garganta, coriza, congestão nasal e dores musculares. Sintomas gastrointestinais como náusea, vômito e diarréia, também podem ocorrer, sendo mais freqüentes em crianças que em adultos (CDC, 2009).

O diagnóstico etiológico de infecção por influenza é de difícil conclusão devido às semelhanças das manifestações com outras viroses respiratórias, o que requer confirmação laboratorial (Cox et al., 1999).

A transmissão do vírus da gripe ocorre através das secreções respiratórias e se dissemina facilmente de pessoa a pessoa. O período de transmissão é de um a dois dias antes do aparecimento dos sintomas até sete dias depois (CDC, 2006). Pacientes imunodeprimidos e crianças pequenas transmitem o vírus por um tempo mais prolongado (SBIM, 2008). Crianças que freqüentam creches e escolas são consideradas as principais disseminadoras do vírus na comunidade e introdutoras do vírus nos domicílios (Glezen, 1986).

Na maioria dos casos e na ausência de complicações, a doença evolui em torno de três a sete dias, podendo persistir a tosse e o mal-estar por mais de duas semanas (MS, 2008). Contudo, não são raras as ocorrências de complicações geradas pela influenza, que anualmente respondem por um número elevado de óbitos (Thompson et al., 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), durante os surtos anuais de influenza, de 5 a 15% da população são afetados por infecções respiratórias, o que resulta na morte de 250 a 500 mil pessoas, anualmente (OMS, 2008). A gripe é também considerada a maior causa de doenças, perturbações na vida diária e falta ao trabalho na população de 18 a 64 anos (SBIM,2008).

As complicações geradas pelo vírus da influenza podem ser primárias, relacionadas ao próprio vírus, ou secundárias, relacionadas às infecções bacterianas subseqüentes (Girard et al., 2005). O agravamento do quadro, provocado pelo próprio vírus, como a pneumonia viral, é pouco freqüente, mas apresenta alta letalidade (MS, 2008). Já as complicações secundárias são mais comuns e acontecem principalmente pela sobre infecção bacteriana por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus*, podendo gerar quadros graves de otite média, pneumonia, sinusite, asma e bronquiolite. (MS, 2008).

1.1.5 Grupo de risco

Pacientes com imunodeficiências, como os indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana e/ou síndrome da imunodeficiência

adquirida (HIV/Aids), fazem parte do grupo de risco para maior gravidade da infecção por influenza, assim como, idosos maiores de 60 anos de idade e portadores de doenças cardiopulmonares (Succi et al., 2006; Foster et al., 1992; Gorse et al., 1997; MS, 2008).

Existem relatos de maior morbidade e letalidade por agravamento da doença preexistente e/ou pneumonia, em pacientes pertencentes ao grupo de risco para infecções por influenza (Succi et al., 2006; Foster et al., 1992; Gorse et al., 1997 MS, 2008). Alguns estudos demonstram que mais de 80% dos pacientes portadores de aids, desenvolvem infecção pulmonar em algum estágio da doença (Andiman, et al.,1998). Crianças infectadas pelo HIV têm uma elevada susceptibilidade para infecções respiratórias virais e bacterianas, com casos de infecções persistentes pelo vírus da influenza (Andiman et al.,1998; Englund et al.,1998).

1.1.6 Epidemiologia do vírus da influenza

1.1.6.1 Surtos de gripe na população humana

A ocorrência de repetidas epidemias do vírus da influenza na população humana é resultado de variações antigênicas que ocorrem principalmente nas glicoproteínas de superfície do vírus (HA e NA). Essas alterações permitem aos vírus escaparem da neutralização pelos anticorpos, tornando os indivíduos susceptíveis apesar de infecções anteriores (Cox et al., 1999; Murphy et al., 1996).

Essas variações antigênicas ocorrem de duas formas principais. A primeira delas é chamada de mutação antigênica menor (*antigenic drift)* e atinge principalmente os gêneros A e B. Ocorre pelo acúmulo de mutações pontuais nos genes que codificam as moléculas de HA e NA, resultando em novas cepas virais, contra as quais existe pouca ou nenhuma imunidade prévia na população (Girard et al.,2005). Esse processo ocorre como parte da evolução contínua dos vírus da gripe (Cox et al., 1999).

O segundo tipo de variação, conhecida como mutação antigênica maior (antigenic *shift*), ocorre somente nos vírus pertencentes ao gênero A. É definida como o surgimento na população humana de um novo vírus da influenza, contendo uma molécula de HA e/ou NA completamente nova. Esse processo ocorre devido à natureza segmentada do vírus que de forma repentina pode adquirir novos genes de outros vírus da influenza. Acredita-se que esse processo ocorra mais frequentemente em porcos, uma vez que esses animais possuem a capacidade de se co-infectarem com cepas de distintas espécies de forma simultânea, permitindo a reorganização genética e a geração de um novo subtipo viral (Moorman,2003; Zambon,2001; Girard et al.,2005). Se o vírus recombinante infectar a população humana e se disseminar de pessoa a pessoa de modo eficiente, uma nova epidemia mundial pode acontecer (Lipatov et al., 2004).

1.1.6.2 Epidemias mundiais provocadas pelo vírus da influenza

Três pandemias de influenza assolaram o século XX. Em 1918, o

vírus H1N1 foi o causador da chamada “gripe espanhola”. No ano de 1957, emergiu a “gripe asiática”, provocada pelo vírus H2N2. Em 1968, o vírus H3N2 foi o responsável pela “gripe de Hong Kong”. Todas as epidemias se alastraram rapidamente pelo mundo, mas a de 1918 foi a que mais dizimou a população mundial, sendo responsável pela morte de 20 a 50 milhões de pessoas (Palese, 2007; Cox et al.,2003).

No começo deste século, no ano de 2003, foi identificado um novo vírus da influenza (H5N1), com uma glicoproteína (HA) de um vírus aviário, apresentando mortalidade elevada e potencial pandêmico (CDC, 2004). Contudo, foram escassos os relatos a respeito da transmissão de pessoa a pessoa, sugerindo que o vírus ainda não se adaptou a espécie humana. Mundialmente esforços foram realizados no intuito de conter uma possível pandemia (BEPA, 2005).

No ano de 2009, um vírus completamente novo surgiu no México e ameaçou a população mundial. Apesar dos árduos esforços para reter a propagação do vírus, no dia 11 de junho de 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS), declarou Pandemia de “Gripe A” (H1N1). A primeira epidemia mundial de gripe em quarenta e um anos (OMS, 2009).

Segundo a OMS, a “gripe A” começou como “gripe suína”, porém o vírus ganhou capacidade de passar de pessoa a pessoa e assim de país para país. Na data da declaração da pandemia, o vírus já tinha atingido a proporção de 30.000 casos em 74 países (OMS, 2009).

A pandemia de “gripe A” foi considerada um evento sem precedentes na história da virologia moderna. O aparecimento do virus da influenza

A/H1N1 de 2009 não se encaixa na definição clássica de um novo subtipo viral (*antigenic shift*) para o qual a população não tem experiência de infecção previa, pois desde 1977, cepas do vírus H1N1sazonal estão em circulação na população humana. No entanto, o vírus também não pode ser classificado como mutação antigênica menor (*antigenic drift*), porque não tem relação evolutiva direta com o vírus sazonal H1N1 de origem humana (Smith et al., 2009).

1.1.7 Sazonalidade do vírus da influenza

Em países de clima temperado e no Sul e Sudeste do Brasil, as epidemias provocadas pelo vírus da influenza acontecem nos meses de inverno (De Paiva et al., 2001; Cintra et al., 2005). No entanto, nos locais com climas tropicais, podem acontecer em qualquer época do ano e às vezes, mais que uma vez por ano, podendo estar associadas às estações chuvosas (Arruda et al., 1999).

Alonso et al, em seu trabalho sobre os padrões sazonais da gripe no Brasil, sugere que as forças ambientais, como temperatura e umidade, desempenham importante papel na condução do calendário da epidemia de gripe no país, superando os fatores populacionais como densidade e tráfego de viajantes (Alonso et al., 2007).

1.1.8 Medidas de prevenção

1.1.8.1 Vacinação

A vacinação anual contra os vírus da influenza sazonal, constitui-se medida eficaz e de grande impacto epidemiológico na redução de doenças respiratórias, seja da gripe ou de suas complicações (Farhat et al., 2002).

1.1.8.1.1 Eficácia

A eficácia da vacina varia em função da idade, do estado imunológico do indivíduo e da similaridade entre as cepas vacinais e circulantes. Quando as cepas contidas nas vacinas são antigenicamente similares às que estão circulando, a porcentagem de prevenção da enfermidade varia entre 70 a 90% dos indivíduos saudáveis (Jofre et al.,2005).

1.1.8.1.2 Imunogenicidade

Os valores de imunogenicidade proporcionada pela vacina inativada contra os vírus da influenza tem relação diretamente proporcional à idade (Neuzil, et al., 2002). Em crianças menores de 6 anos, aproximadamente 40 a 80% apresentam soroconversão após uma dose da vacina, enquanto que, nas crianças maiores de 6 anos, a taxa de soroconversão eleva-se para 70 a 100% (Clover et al.,1991; Gruber et al.,1990).

De acordo com os critérios publicados pelo Comitê Europeu para Proprietários de Produtos Medicinais (CPMP), para que uma vacina contra os vírus da influenza A e B seja licenciada, é necessário que os seguintes parâmetros sejam respeitados: para indivíduos entre 18 a 60 anos de idade,

a taxa de soroconversão deve ser maior que 40% e a taxa de proteção maior que 70%. Para indivíduos acima de 60 anos, a taxa de soroconversão deve ser maior que 30% e a taxa de proteção maior que 60% (CEC,1997)

Não existem parâmetros pré-estipulados para indivíduos imunodeprimidos, porém, diversos autores já demonstraram que a concentração de anticorpos contra os vírus influenza, após a vacinação, nessa população é inferior quando comparada com indivíduos saudáveis (Viganò, et al., 2008; Montoya et al.,2007; Amendola et al., 2001).

A concentração de anticorpos protetores é alcançada depois de dez a quatorze dias da vacinação, com a produção de anticorpos séricos e locais, frente aos subtipos de HA e NA presentes nos vírus vacinais (Jofre et al., 2005).

1.1.8.1.3 Tipos de vacinas

As vacinas contra a gripe disponíveis atualmente são compostas por vírus inativados (completos, particulados ou antígenos virais purificados) e vírus vivos atenuados ou virossomais (Tabela 2).

1.1.8.1.3.1 Vacinas de vírus inativado

As vacinas inativadas, de uso parental, são as mais empregadas mundialmente. No início eram elaboradas com vírus completo inativado, posteriormente passaram a ser desenvolvidas com fragmentos do vírus, chamadas de vacinas particuladas ou *split vaccines*, ou com antígenos purificados, conhecidas como vacinas de subunidade (Jofre et al., 2005).

As vacinas compostas por vírus inteiros apresentam boa imunogenicidade, porém com maior reatogenicidade, especialmente a ocorrência de febre em crianças, não sendo indicada para essa faixa etária. (Cintra et al., 2000). As vacinas fracionadas, seja a particulada ou a subunitária, apresentam bom perfil de segurança, sendo a primeira mais imunogênica que a segunda (Ruben, 2004).

1.1.8.1.3.2 Vacina de vírus vivo atenuado

A vacina de vírus vivo atenuado foi elaborada para a administração intranasal, com uma cepa de influenza adaptada ao frio, com capacidade de se replicar efetivamente a temperatura de 25°C e de restringir sua replicação a temperatura de 37°C, o que limita sua replicação no trato respiratório inferior (Wright et al.,2007; Jofre et al., 2005).

A vacina atenuada contra o vírus da influenza tem se revelado segura, imunogênica e eficaz, porém sua administração não é recomendada para crianças pequenas, idosos e pacientes com imunosupressão, tendo como público alvo apenas a faixa etária de 5 a 49 anos (Piedra et al., 2005; Bergen et al.,2004;Wright et al.,2007).

As vantagens desta vacina se comparada com as vacinas inativadas, diz respeito à possibilidade de gerar uma resposta imune mais ampla, tanto da mucosa respiratória como sistêmica, além de ter melhor aceitação devido ao uso não injetável (Jofre et al., 2005).

1.1.8.1.3.3 Vacinas virossomais

As vacinas virossomais são vacinas inativadas nas quais os antígenos de superfície dos vírus da influenza, HA e NA, são incorporadas a vesículas lipídicas, com função coadjuvante (Huckried at al.,2005).

Está disponível uma formulação desde o ano de 1997, que tem demonstrado alta imunidade e segurança (Herzog et al., 2002; Kanra et al.,2004).

Tabela 2 - Vacinas contra os vírus da influenza disponíveis atualmente

Vacina	Tipo de vírus	Composição	Indicações	Esquemas/ Via	Doses
Vírus inteiros	inativados	Vírus inteiros inativados	Acima de 12 anos	1 dose IM	0,5mL
Fragmentado (*Split)*	Inativado	Vírus fragmentados (HA, NA e cápsula)	A partir de 6 meses	1 ou 2 doses* IM	0,25mL (6 a 36m) 0,5mL (>3 anos)
Subunitária	Inativado	HA e NA isoladas	A partir de 6 meses	1 ou 2 doses	_
Virossomal	Inativado	HA e NA adsorvidos à partícula virossomal	A partir de 6 meses	1 dose IM	0,25mL (6 a 36m) 0,5mL (>3anos)
Vírus vivo	Atenuado	Vírus inteiros atenuados e adaptados ao frio	5 a 49 anos saudáveis	1 ou 2 doses nasal	0,5mL

HA = Hemaglutinina; NA = Neuraminidase; IM = Intramuscular

* 6 meses a 9 anos: duas doses quando do primeiro ano de imunização. (Fonte: Cintra et.al, 2006)

1.1.9 Rede de vigilância

A OMS coordena centros de vigilância epidemiológica da gripe em várias partes do mundo, envolvendo atualmente cerca de 110 laboratórios em 80 países, os quais sistematicamente coletam amostras de secreções de nasofaringe de pacientes acometidos pela gripe e enviam o material para centros de referência mundial de influenza, que são responsáveis pela identificação completa do vírus, com sua caracterização antigênica detalhada (Cintra et a.l, 2006).

Com base nas análises realizadas pelos centros de referência, é determinada a composição da vacina contra a gripe para os laboratórios farmacêuticos, cuja recomendação é enviada anualmente aos países membros da rede de vigilância (BEPA, 2005).

No Brasil, a Fundação Oswaldo Cruz, o Instituto Adolfo Lutz e o Instituto Evandro Chagas, são as instituições governamentais responsáveis pela vigilância epidemiológica do país (SBIM,2008)

1.1.10 Vacinação contra os vírus da influenza no Brasil

As vacinas inativadas são as únicas licenciadas no Brasil para programas de prevenção contra os vírus da influenza (Tabela 2).

Estas vacinas são compostas por dois tipos de influenza A e um B, de acordo com as recomendações da OMS, que a partir da rede de vigilância, faz a averiguação dos vírus circulantes nos últimos

dozes meses e recomenda as cepas que devem entrar na composição da vacina para cada hemisfério (SBIM,2008).

Em 2008, a formulação recomendada para o hemisfério Sul foi: A/*Solomon Islands*/3/2006 (H1N1) – *like vírus*; A/*Brisbane*/10/2007 (H3N2) – *like vírus* e B/ *Florida*/4/2006 – *like vírus* (SBIM, 2008).

Tabela 3: Vacinas contra os vírus da influenza disponíveis no Brasil

Vacina	Tipo de vírus	Composição	Apresentações	Laboratório
Vacina de vírus inativado contra gripe	Inativado	Vírus fragmentado (HA, NA e cápsula)	Frasco multidose Monodose em seringa, adulto (0,5mL) e pediátrico (0,25mL)	Sanofi-Pasteur
Vacina de vírus inativado contra gripe	Inativado	Vírus fragmentado (HA, NA e cápsula)	Frasco-ampola 0,5mL	Glaxo Smith-Kline
Vacina de vírus inativado contra gripe	Inativado	Vírus fragmentado (HA, NA e cápsula)	Frasco-ampola 0,5mL	CSL Austrália
Vacina de vírus inativado contra gripe	Inativado	HA e NA adsorvidos à partícula virossomal	Frasco-ampola de 0,5mL	Berna
Vacina de vírus inativado contra gripe	Inativado	Vírus fragmentado (HA, NA e cápsula)	Frasco-ampola de 0,5mL	Instituto Butantã

Legenda: HA = Hemaglutinina; NA= Neuraminidade

(Adaptada de Cintra et.al, 2006)

1.2 HIV/aids e o vírus da influenza

1.2.1 HIV/aids

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) (Wigg, 2002). Este vírus tem a capacidade de destruir as células do sistema imunológico, preferencialmente células T CD4+ e macrófagos, reduzindo progressivamente a capacidade do organismo de combater infecções (CDC,2004).

A evolução da doença é caracterizada pela elevada taxa de replicação viral, que resulta na emergência de variantes virais mais virulentas (Wigg, 2002). A infecção pelo HIV é atualmente avaliada pela contagem do número de células CD4+, pela quantidade de partículas virais no sangue e pelos sintomas clínicos (Wigg, 2002).

Nem todas as pessoas apresentam todos os estágios da doença, e o tempo entre a infecção e a manifestação dos diferentes quadros clínicos pode variar, dependendo do indivíduo e de sua faixa etária (Wigg, 2002)

Em adultos, o curso natural da infecção pelo HIV normalmente evolui no período de alguns anos. Neste tempo pode ser observada uma queda considerável das células TCD4+ e um aumento abrupto da carga viral (Fauci et al.,2003).

O curso da infecção pelo HIV em crianças pode ocorrer de forma mais rápida que nos adultos. Isso acontece devido às altas taxas de replicação viral persistente, que refletem a imaturidade do sistema imune, bem como a

maior suscetibilidade de certos tipos celulares à infecção pelo HIV (Burns et al.,1999).

As principais formas de transmissão do HIV são: sanguínea, principalmente em usuários de drogas injetáveis; sexual, através de relações hetero ou homossexuais; e vertical, onde a mãe pode transmitir o vírus para o filho durante a gestação, parto ou aleitamento (Wigg, 2002).

A partir da segunda metade da década de 1990, importantes avanços no cuidado de pacientes infectados pelo HIV levaram a mudanças na progressão clínica da doença, resultando em menor morbidade e mortalidade. A melhor compreensão sobre a dinâmica do HIV e o desenvolvimento de novas classes de medicamentos propiciou a reformulação na terapêutica antirretroviral (TARV), resultando no tratamento combinado com três ou mais drogas (MS, 2004).

Apesar dos benefícios oferecidos pelas drogas antirretrovirais, seu uso deve ser criterioso, pois podem incorrer no risco da indução de resistência e, consequentemente, no esgotamento precoce do arsenal terapêutico disponível. Além disso, efeitos adversos importantes e freqüentes já estão bem caracterizados (MS, 2004).

No ano de 2008, existiam em média 33,4 milhões de pessoas infectadas com HIV no mundo, sendo 31,3 milhões de adultos e 2,1 milhões de crianças menores de 15 anos. Foram relatados neste mesmo ano 2,0 milhões de mortes relacionadas à aids, sendo 1,7 milhões de adultos e 280 mil crianças menores e 15 anos (UNAIDS, 2009).

No Brasil, já foram notificados 544.846 novos casos de aids, desde a primeira notificação em 1980 até junho de 2009. No ano de 2009, 13.658 novos casos foram relatados, deste total, 13.152 adultos na faixa etária de 20 a 60 anos ou mais e 506 crianças e jovens entre 0 a 19 anos. Em 2009 foram totalizados 11 523 óbitos por aids no país (MS, 2009).

1.2.2 Infecções por influenza em indivíduos com HIV/aids

Os indivíduos infectados pelo HIV são considerados mais vulneráveis as infecções pelo vírus da influenza sazonal, podendo apresentar prolongada replicação viral, longa duração dos sintomas de gripe e elevada taxa de mortalidade influenza-relacionada (Zanetti et al., 2002).

Nos períodos de maior circulação do vírus da influenza, são constatadas elevações consideráveis no número de internações de pacientes com HIV, bem como maior risco de morte por complicações decorrentes da gripe (CDC, 2004).

Diante disso, desde o início da década de 1990, os guias nacionais e internacionais de imunização, recomendam a vacinação anual contra o vírus da influenza em pacientes infectados pelo HIV, sendo classificados como membros do grupo prioritário para o procedimento (Bridges *et al*., 2001; MS, 1999-2000).

1.2.3 Desempenho da vacinação contra influenza em pacientes HIV/aids

Em pacientes com HIV, a proteção oferecida pela imunização contra os vírus da influenza permanece pouco definida (Atashili et al., 2006). Ainda existem questionamentos quanto à segurança deste procedimento nesta população, uma vez que, aumentos transitórios da carga viral do HIV pós-vacinação já foram evidenciados em alguns estudos (Fine et al., 2001; Vigano et al.,1998). Embora o significado clínico deste fenômeno não esteja esclarecido. Além disso, o efeito da vacina contra a gripe pode ser comprometida pela resposta reduzida de anticorpos observada em alguns indivíduos com HIV (Fine et al., 2001; Kroon et al., 1994; Jackson et al., 1997). Contudo, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos EUA e o Ministério da Saúde (MS), do Brasil, mantém a recomendação para vacinação anual contra a influenza nestes indivíduos (Bridges *et al*., 2001; MS, 1999-2000). Esta recomendação é fortalecida pela observação de uma maior susceptibilidade desses pacientes às infecções pelo vírus da influenza sazonal (Zanetti et al., 2002).

2 JUSTIFICATIVA

Indivíduos infectados pelo HIV fazem parte do grupo de maior vulnerabilidade para as formas graves de infecção por influenza e, portanto, devem receber doses anuais de vacina contra a gripe (Succi *et al*., 2006). No entanto, a capacidade desses indivíduos de responderem às vacinas com títulos adequados e protetores depende do grau de comprometimento imunológico no momento da imunização. Desta forma, portadores do HIV, devem ser considerados possivelmente suscetíveis mesmo se adequadamente vacinados (AAP, 2003). Atendo-se a esta questão, e levando em conta a escassez de dados na literatura, este estudo visou acompanhar um grupo de crianças e adolescentes infectadas e não infectados pelo HIV, vacinados contra o vírus da influenza sazonal no ano de 2008, no intuito de avaliar a imunogenicidade da vacina, bem como o grau de comprometimento gerado pelos possíveis episódios de gripe.

3 OBJETIVOS

- Avaliar a imunogenicidade da vacina contra os vírus da influenza sazonal, indicada para o ano de 2008, em crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo HIV.

- Realizar a vigilância dos epidódios de infecção respiratória nos indivíduos infectados e não infectados pelo HIV, para os vírus da influenza A e B; vírus sincicial respiratório; parainfluenza 1, 2 e 3; adenovírus; rinovirus, metapneumovirus, coronavírus e bocavirus.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo longitudinal com um grupo de 37 crianças ou adolescentes (8 - 18 anos) infectados pelo HIV, acompanhados no Centro de Atendimento da Disciplina de Infectologia Pediátrica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (CEADIPe – EPM - UNIFESP), com indicação para a vacinação contra o vírus da influenza sazonal no ano de 2008. Também foram recrutadas 29 crianças ou adolescentes saudáveis (9 -15 anos), alunos da Unidade Escolar Marina Cintra, situada no município de São Paulo e pertencente à Rede Publica de Ensino do Estado de São Paulo, com disponibilidade para vacinação contra o vírus da influenza no ano de 2008.

O cálculo amostral foi realizado com o programa *EpInfo 6*, levando em consideração uma resposta vacinal de 85% nas crianças e adolescentes saudáveis e de 45 a 50% nas crianças a adolescentes infectados pelo HIV, resultando em um número previsto de 26 a 32 indivíduos em cada grupo.

Após a imunização, os pacientes e grupo controle foram acompanhados longitudinalmente durante um período de 24 semanas.

4.2 Critérios de inclusão do grupo HIV

Os pacientes foram selecionados com base nos seguintes critérios de inclusão:

1. Comprovadamente infectados pelo HIV, segundo os critérios para o diagnóstico do Ministério da Saúde;

2. Em uso de esquemas terapêuticos anti-retrovirais há mais de três meses, com condições clínicas e imunológicas estáveis;

3. Com disponibilidade para retornar ao centro de atendimento quando solicitado.

4.3 Critérios de exclusão do grupo HIV

Foram excluídos do estudo os pacientes que se encontrava em algumas das situações abaixo relacionadas:

1. Uso prolongado (acima de 30 dias) de corticoterapia nos últimos seis meses;

2. Em vigência de alguma infecção oportunista ativa;

3. Possuir alguma doença que impeça a realização das coletas de materiais e vacina.

4. Não estar em acompanhamento médico regular nos últimos seis meses.

4.4 Critérios de inclusão do grupo controle

Após convite enviado aos pais e alunos da Unidade Escolar Marina Cintra, as crianças e adolescentes foram selecionados com base nos seguintes critérios de inclusão:

1. Com disponibilidade para coleta de materiais quando solicitado;

2. Comprovadamente não infectados pelo HIV, segundo os critérios para o diagnóstico do Ministério da Saúde;

4.5 Critérios de exclusão do grupo controle

Foram excluídos do estudo os indivíduos que se encontravam na situação abaixo relacionada:

1. Faixa etária inferior a oito anos, devido à necessidade de duas doses da vacina contra influenza sazonal.

4.6 Termo de consentimento livre e esclarecido

O termo de consentimento livre e esclarecido dos pais ou responsáveis legais pelas crianças ou adolescentes, foi obtido por um profissional de saúde envolvido na pesquisa, após esclarecimento dos detalhes da mesma.

4.7 Aprovação pelos Comitês de Ética em Pesquisa com seres humanos

O estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa com seres humanos da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (N° 0202/08) e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (N° 1287/09, registro 4677). Sendo também registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (N° 307702).

4.8 Imunização

Os pacientes infectados pelo HIV, bem como o grupo controle, foram imunizados com uma solução injetável de 0,5mL, produzida pela Sanofi Pasteur®, contendo diferentes cepas dos vírus da influenza, fragmentados e purificados, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde para a temporada de 2008 do hemisfério sul (Tabela 4).

O procedimento foi realizado entre os dias 15 de maio a 10 de julho de 2008.

Tabela 4 - Cepas de *Myxovirus influenza*, propagados em ovos embrionados de galinha, presentes na vacina contra os vírus da influenza do ano de 2008 para o hemisfério sul

Composição	**Quantidade**
A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)	15ug de Hemaglutinina.
A/Brisbane/10/2007 (H3N2).	15ug de Hemaglutinina
B/Florida/4/2006	15ug de Hemaglutinina
Formaldeído	$\geq$30mcg.
Solução tampão	0,5ml.

4.9 Acompanhamento

4.9.1 Pacientes infectados pelo HIV

Consultas médicas foram agendadas, com intervalos de 30 dias pós-vacinação, para avaliação clínica e coleta de materiais. Os mesmos foram

alertados para comparecerem ao centro de atendimento, caso apresentassem sintomas de infecção respiratória nos intervalos das consultas agendadas, para realização de coleta de materiais e avaliação clínica. Os participantes também foram contatados semanalmente por via telefônica, como procedimento de busca ativa de sintomáticos respiratórios no período entre as consultas agendadas.

4.9.2 Grupo controle

As crianças ou adolescentes saudáveis pertencentes ao grupo controle foram acompanhados semanalmente através de visitas à unidade escolar, em busca de sintomáticos para infecção respiratória e coleta de materiais.

4.10 Definição de caso de infecção respiratória

Infecções respiratórias foram definidas pela presença de dois ou mais sinais e sintomas como tosse, coriza, obstrução nasal, falta de ar, chiado no peito (sibilos), acompanhados ou não de febre (T>/= 37^{5} ^{0}C).

4.11 Coleta e processamento dos materiais

4.11.1 Sangue

Aproximadamente 5ml de sangue total foram coletados dos pacientes infectados pelo HIV, 1-2 horas antes da aplicação da vacina, 30 e 60 dias

após sua administração. No grupo controle, os 5ml de sangue foram colhidos 1-2 horas antes da aplicação da vacina e apenas 30 dias após sua administração. Após o acondicionamento em tubos contendo anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA), o material foi imediatamente encaminhado ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (LIM52 – IMT - USP) para seu processamento, obedecendo às regras de biosegurança.

4.11.2 Inibição da Hemaglutinação

Amostras de soro, cerca de 1mL, foram separadas do sangue total por centrifugação, acondicionadas em microtubos e estocadas em freezer –20°C para posterior realização do teste de Inibição da Hemaglutinação (Hist, 1941; Salk, 1944).

Durante a realização do teste, as amostras de cada paciente, pré e pós-vacinação, foram avaliadas simultaneamente, para cada cepa vacinal (vírus da influenza A H1N1 e H3N2 e vírus da influenza B).

4.11.2.1 Cultura de células

Os vírus da influenza A e B foram cultivados em células *Martin Darby Canine Kidney* (MDCK) de linhagem estabelecida, originada de rim de cachorro, mantidas e subcultivadas em meio *Eagle* (MEM), adicionado de 10% de soro fetal bovino e antibiótico (100U de Penicilina G potássica,

100μg de Estreptomicina e 2μg de Anfotericina B por ml). Os subcultivos foram feitos num intervalo de 3 a 4 dias. O meio de cultivo foi desprezado, a monocamada celular foi lavada com PBS para retirada de resíduos de soro fetal bovino. Em seguida foram adicionados 10 ml de solução de tripsina a 0,2% e EDTA a 0,02%, mantendo as garrafas em temperatura ambiente. Quando a camada de células começou a se desprender, a solução de tripsina foi removida e as garrafas mantidas em 37°C até o desprendimento total das células. Uma suspensão de células contendo três vezes o volume inicial de meio nutriente foi preparado e posteriormente distribuído em garrafas retangulares com aproximadamente 42 cm^2 de área útil (20ml por garrafa) e incubada a 37°C.

4.11.2.2 Cultivo dos vírus

O meio de crescimento das garrafas foi desprezado e a monocamada celular lavada com PBS por duas vezes. Foram inoculadas as suspensões virais (influenza H1N1, H3N2 e B) em garrafas individualizadas, contendo 0,1% de tripsina. Estas foram incubadas a 33^0C por 60 minutos. Em seguida foi adicionado o meio de manutenção Eagle (MEM) suprimido do soro fetal bovino. As garrafas foram mantidas em 33^0C por 48 a 72 horas e observadas diariamente ao microscópio, para verificação do efeito citopático.

Foram colhidas alíquotas do sobrenadante para realização da titulação por hemaglutinação, com o intuito de confirmar a presença e potência dos vírus. Se o título fosse maior ou igual a 4 Unidades

Hemaglutinantes (UHA), as garrafas eram congeladas por 24horas a -70^{0}C. A seguir, congeladas e descongeladas por 3 vezes, para rompimento das células e liberação dos vírus. A suspensão de células foi centrifugada a 1200 Gs durante 10 minutos em 4^{0}C. O sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 500μl e estocadas a 70^{0}C, até o uso.

Os vírus utilizados foram:

- ✓ A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1);
- ✓ A/Brisbane/10/2007 (H3N2);
- ✓ B/Florida/4/2006.

4.11.2.3 Preparação das hemácias

Hemácias de peru foram colhidas por punção venosa no biotério do Instituto de Medicina Tropical da USP e misturadas rapidamente com igual volume de solução de *Alsever*. A seguir foi feito uma filtragem em gaze e conservado a 4^{0}C. Posteriormente, as hemácias foram lavadas 3 vezes com PBS, através de centrifugações sucessivas a 900Gs por 5 minutos. Por último foi feita uma centrifugação a 900Gs por 10 minutos e preparada uma suspensão 0,5% de hemácias.

4.11.2.4 Titulação dos antígenos

A titulação foi feita em duplicata, por meio de placas de microtitulação. Na primeira fileira foram colocados 100μl de antígeno, nas demais fileiras

50μl de PBS. Com uma micropipeta multicanal foram transferidos 50μl para o segundo orifício e assim uma diluição seriada em múltiplos de dois. Foram adicionados em todos os orifícios 50μl de hemácias a 0,5%. A placa foi agitada por um minuto e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. O controle das hemácias foi realizado usando apenas o diluente PBS e as hemácias a 0,5%, sem a presença dos antígenos.

A maior diluição do antígeno que apresentou hemaglutinação total foi considerada como 1UHA. No momento da reação de inibição da hemaglutinação, a diluição de uso foi calculada para ter 8UHA em 50μl. Todos os dias o antígeno era titulado para calculo da diluição de uso na reação e re-titulado durante a reação para confirmar o título e ter a certeza de que a quantidade de vírus estava correta. O antígeno foi mantido durante toda a execução da reação em banho de gelo.

4.11.2.5 Tratamento do soro

Para destruição dos inibidores inespecíficos, foi utilizada a enzima *receptor destroying enzime* (RDE) do *Vibrio cholerae*. Inicialmente foi feito a reconstituição do RDE adicionando ao frasco 20ml de solução fisiológica 0,85%. Foram feitas alíquotas e armazenadas a -20^{0}C.

Em tubos 12x74mm foram adicionados 50μl de soro e 150μl de RDE, ou seja, uma diluição inicial do soro a 1/4. Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria a 37^{0}C por 18 horas. Decorrido esse tempo os tubos foram transferidos para banho-maria a 56^{0}C e incubados por 30

minutos, para inativação do RDE. A seguir 300μl de solução fisiológica 0,85% foi adicionado ao tubo. Os soros, após esse procedimento, foram considerados como diluídos a 1/10. Posteriormente todos os soros foram testados para comprovação da destruição dos inibidores inespecíficos. Foram adicionados 25μl de soro tratado a 25μl de PBS e 50μl de hemácias e incubados a 30 minutos em temperatura ambiente. A presença do "botão" de hemácias confirmou a remoção dos inibidores. Os soros foram estocados a -20^{0}C até o momento da execução da reação.

4.11.2.6 Execução da reação de inibição da hemaglutinação

A reação de inibição da hemaglutinação foi feita em placas para microtitulação, utilizando o PBS como diluente. A partir do segundo orifício foi acrescido 25μl de PBS. No primeiro e segundo orifício foi colocado 25μl do soro tratado a 1/10. Utilizando micropipeta multicanal foi procedida a diluição do soro. Após homogeneização, 25μl do segundo orifício foi transferido para o terceiro e assim sucessivamente até o ultimo orifício. Em seguida foram adicionados 25μl de antígeno. A placa foi agitada por 1 minuto e mantida em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse tempo foram adicionados 50μl de hemácias, novamente agitada por 1 minuto e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura foi realizada.

Os títulos de anticorpos pela reação de inibição da hemaglutinação (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, até 1:1280) foram expressos como as

recíprocas das diluições séricas mais elevadas que inibiram a ação da hemaglutinação, ou seja, a completa inibição da aglutinação das hemácias testadas por uma concentração padrão de antígenos virais.

4.11.2.7 Determinação dos Títulos Médios Geométricos, Taxa de Soroproteção e Soroconversão

Para avaliação da resposta vacinal, foram utilizando os seguintes critérios (Brydak et al., 2003; Cavdar et al., 2003; Belshe at al., 2004):

1. Títulos Médios Geométricos (TMG): Determinação do antilog da média dos logaritmos dos títulos de anticorpos anti-hemaglutinina antes e após a vacinação.
2. Taxa de Proteção: Proporção de indivíduos com títulos de anticorpos anti-hemaglutininas $\geq$ 1:40 após a vacinação
3. Taxa de Soroconversão: Proporção de indivíduos com o aumento de pelo menos 4 vezes nos títulos de anticorpos anti-hemaglutinina após a vacinação.

4.11.3 ELISA

Alíquotas de 100μl das primeiras amostras de soro das crianças e adolescentes pertencentes ao grupo controle foram utilizadas para realização do teste imunoenzimatico ELISA para HIV Ag/Ab 4ª geração Biomerieux®, de acordo com as instruções do fabricante.

4.11.4 Lavado de nasofaringe

Foram coletadas amostras de lavado de nasofaringe dos participantes do estudo, sintomáticos para infecção respiratória.

Com o indivíduo sentado, o pescoço 45° para trás e fazendo uma inspiração profunda, solicitou-se que segurasse a respiração e elevasse o palato ou tentasse realizar uma deglutição parcial a fim de fechar a cavidade nasofaríngea, conseqüentemente melhorando a habilidade para manter o fluido na cavidade nasal. Uma seringa ou pipeta de poliestireno com 10ml de soro fisiológico estéril 0,9%, foi utilizada para instilar 5ml em cada narina. O fluido foi mantido nas cavidades nasais por 10 segundos e, então, o indivíduo flexionou a cabeça e permitiu que o lavado fluísse para dentro de um recipiente estéril.

O material colhido, acondicionado em coletor estéril e mantido sob refrigeração, foi imediatamente encaminhado ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, para seu processamento.

4.11.5 Imunofluorescência Direta

O método da imunofluorescência direta foi empregado para detecção rápida dos vírus da influenza A e B, bem como para o diagnostico diferencial dos vírus sincicial respiratório, adenovírus e vírus da parainfluenza tipos 1, 2 e 3.

Inicialmente, alíquotas de lavado nasal foram tratadas com agente mucolítico durante 30 minutos a 37°C. Após centrifugação do material, o

mesmo foi lavado duas vezes com solução salina tamponada (PBS), para obtenção de suspensão de células. As lâminas foram preparadas, fixadas com acetona por 10 minutos e secas em temperatura ambiente. Utilizando o kit comercial DAKO®, foi adicionado o monoclonal específico sobre cada gota. As lâminas foram incubadas a 37°C por 15 minutos, lavadas com PBS por 5 minutos, secas e montadas com glicerina. A leitura foi feita em microscópio de imunofluorescência.

4.11.6 Reação em Cadeia da Polimerase

Os métodos convencionais e em tempo real da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizados para detecção dos vírus da influenza A e B e diagnóstico diferencial dos adenovírus, coronavírus, rinovírus, bocavirus e metapneumovirus.

4.11.6.1 Extração de RNA

A obtenção de RNA das amostradas de lavado nasofaringeo foi realizada com o kit de extração Qiagen ®, de acordo com as instruções do fabricante.

4.11.6.2 Síntese de cDNA (RT-PCR)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Applied Biosystems ®, de acordo com as instruções do fabricante.

4.11.6.3 Amplificação das seqüências alvo

A amplificação das seqüências alvo foi realizada através de protocolos específicos para cada tipo de vírus:

4.11.6.3.1 Influenza A

Para a detecção dos vírus da influenza A, foi realizada a técnica qualitativa de Real Time PCR, utilizando primers e sondas descritas por Van Elden et al., 2001 (tabela 5).

O nível de sensibilidade do teste é de 0,02 $TCID_{50}$ para o vírus A/PR/8/34 (Van Elden et al., 2001).

Tabela 5 - Primers e sondas utilizadas para a detecção dos vírus da influenza A.

Primers/Sondas	**Seqüência (5'– 3')**
INFA1	GGACTGCAGCGTAGACGCTT
INFA2	CATCCTGTTGTATATGAGGCCCAT
INFA3	CATTCTGTTGTATATGAGGCCCAT
INFA Probe	*FAM* – CTCAGTTATTCTGCTGGTGCACTTGCCA – *TAMRA*

A seqüência alvo foi amplificada em uma reação com volume final de 25,0 μl contendo:

- 5μl de cDNA;
- 12,5μl de TaqMan Master Mix® 2x;
- 2,25μl de primer INFA1 (10μM);
- 1,125μl de primer INFA2 (10μM);
- 1,125μl de primer INFA3 (10μM);
- 0,25μl de sonda INFA Probe (10μM);
- 2,27μl de H_20 DEPC.

Os tubos de reação, contendo a amostra e a mistura de reagentes, foram submetidos a 45 ciclos de amplificação no termociclador Applied Biosystem 7300®, como segue:

- 50^0C – 2 minutos;
- 95^0C – 10 minutos;
- 95^0C – 15 segundos;
- 60^0C – 1 minuto.

A análise de resultados foi realizada através do programa Applied Biosystems Sequence Detection Software ®, versão1.3.

4.11.6.3.2 Influenza B

Para a detecção dos vírus da influenza B foi realizada a técnica qualitativa de Real Time PCR, utilizando primers e sondas descritos por Van Elden, et al., 2001 (tabela 6).

O nível de sensibilidade do teste é de 0,02 $TCID_{50}$ para o vírus B/Lee/40 (Van Elden et al., 2001).

Ta**bela 6 -**Primers e sondas utilizadas para a detecção dos vírus da influenza B.

Primers/Sondas	**Seqüência (5'– 3')**
INFB1	AAATACGGTGGATTAAATAAAAGCAA
INFB@	CCAGCAATAGCTCCGAAGAAA
INFB Probe	*FAM* - CACCCATATTGGGCAATTTCCTATGGC – *TAMRA*

A seqüência alvo foi amplificada em uma reação com volume final de 25,0 μl contendo:

- 5μl de cDNA;

- 12,5μl de TaqMan Master Mix® 2x;

- 0,75μl de primer INFB1 (10μM);

- 0,75μl de primer INFB2 (10μM);

- 0,25μl de sonda INFB Probe (10μM);

- 5,75μl de H_20 DEPC.

Os tubos de reação, contendo a amostra e a mistura de reagentes, foram submetidos a 45 ciclos de amplificação no termociclador Applied Biosystem 7300®, como segue:

- 50^0C – 2 minutos;

- 95^0C – 10 minutos;

- 95^0C – 15 segundos;

- 60^0C – 1 minuto.

A análise de resultados foi realizada através do programa Applied Biosystems Sequence Detection Software ®, versão1.3.

4.11.6.3.3 Metapneumovirus

Para a detecção dos metapneumovirus foi realizada a técnica qualitativa de Real Time PCR, utilizando primers e sondas descritos por Oliveira et al., 2008 (tabela 7).

Tabela 7 - Primers e sondas utilizadas para a detecção dos metapneumovirus.

Primers/Sondas	**Seqüência (5'– 3')**
Care1	GCACCAGACACACCCATAATCTT
Care2	TCAGCACCAGACACACCTATAATCTT
Care3	TTGAGTGCATCACTTAGTACACGGT
Care4 Probe	*FAM* - TTATGTGTAGGTGCCTTAATA – *MGB*

A seqüência alvo foi amplificada em uma reação com volume final de 25,0 μl contendo:

- 5μl de cDNA;
- 12,5μl de TaqMan Master Mix® 2x;
- 1,25μl de primer Care1 (10μM);
- 1,25μl de primer Care2 (10μM);
- 2,5μl de primer Care3 (10μM);
- 1,25μl de sonda Care4 Probe (10μM);

- 1,25μl de H_20 DEPC.

Os tubos de reação, contendo a amostra e a mistura de reagentes, foram submetidos a 45 ciclos de amplificação no termociclador Applied Biosystem 7300®, como segue:

- 50^0C – 2 minutos;
- 95^0C – 10 minutos;
- 95^0C – 15 segundos;
- 60^0C – 1 minuto.

A análise de resultados foi realizada através do programa Applied Biosystems Sequence Detection Software ®, versão1.3.

4.11.6.3.4 Rinovirus

Para a detecção dos rinovirus foi realizada a técnica qualitativa de Real Time PCR, utilizando primers e sondas descritos por Deffernez, et al. 2004 (Tabela 8).

O limite de detecção para rinovirus foi determinado como log 10^6 de uma inoculação inicial em cultura de célula correspondente a 10^3 50%.

Tabela 8: Primers e sondas utilizadas para a detecção dos rinovirus.

Primers/Sondas	**Seqüência (5'– 3')**
HRV fwd	GCACTTCTGTTTCCCC
HRV reverse	AGCCTGCGTGGCTGCC
RHP1	*FAM* - AGCCTCATCTGCCAGGTCTA – *TAMRA*
RHP2	*VIC* - AGCCTCATCGACCAAACTA – *TAMRA*

A seqüência alvo foi amplificada em uma reação com volume final de 25,0 μl contendo:

- 5μl de cDNA;
- 12,5μl de TaqMan Master Mix® 2x;
- 2,25μl de primer HRV fwd (10μM);
- 1,5μl de primer HRV reverse (10μM);
- 0,5μl de sonda RHP1 (10μM);
- 0,0,5μl de sonda RHP2 (10μM);
- 2,75μl de H_20 DEPC.

Os tubos de reação, contendo a amostra e a mistura de reagentes, foram submetidos a 55 ciclos de amplificação no termociclador Applied Biosystem 7300®, como segue:

- 50^0C – 2 minutos;
- 95^0C – 10 minutos;
- 95^0C – 15 segundos;
- 55^0C – 30 segundos;
- 60^0C – 1 minuto.

A análise de resultados foi realizada através do programa Applied Biosystems Sequence Detection Software ®, versão1.3.

4.11.6.3.5 Adenovirus:

Para detecção de adenovirus foi realizada a técnica de *Nested* PCR. Inicialmente foi empregado um par de primers (Hex1deg e Hex2deg) descrito

por Allard, et al. 2001 (Tabela 9), que possibilitou a amplificação de uma região conservada de 301pb.

Tabela 9: Seqüência de primers Hex1deg e Hex2deg

Primer	Seqüência (5' – 3')
Hex1deg	GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC
Hex2deg	CAGCACSCCICGRATGTCAAA

Posteriormente um segundo par de primers (Nehex3deg e Nehex4deg) (Tabela 10), foi utilizado no intuito de amplificar um fragmento interno da seqüência gerada com 171pb (Allard, et al. 2001).

Tabela 10: Seqüência de primers P1 e P2

Primer	Seqüência (5' – 3')
Nehex3deg	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC
Nehex4deg	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA

A seqüência alvo inicial foi amplificada em uma reação com volume final de 50,0 μl contendo:

- 3,0μl de cDNA
- 5,0μl de tampão 10x (50mM de KCl, 10mM de Tris)
- 4,0μl de dNTPs (2,5mM)
- 1,5μl de $MgCl_2$ (50mM)
- 1,0μl de primer Hex1deg (10μM)
- 1,0μl de primer Hex2deg (10μM)
- 0,4μl de Taq DNA Polimerase (2,5 U/ reação)

- 4,0μl de Glicerol;
- 5,0μl de Cresol red
- 25,1 μl de H_20

Os tubos de reação contendo a amostra e a mistura de reagentes foram submetidos a 30 ciclos de amplificação em termociclador como se segue:

94^0C – 7 minutos

94^0C – 1 minuto

45^0C – 1 minuto

72^0C – 1 minuto

72^0C – 10 minutos

Para amplificação da segunda seqüência alvo, foi realizada uma reação com 50μl contendo:

- 3,0μl do produto gerado na primeira amplificação
- 5,0μl de tampão 10x (50mM de KCl, 10mM de Tris)
- 4,0μl de dNTPs (2,5mM)
- 1,5μl de $MgCl_2$ (50mM)
- 1,0μl de primer Hex1deg (10μM)
- 1,0μl de primer Hex2deg (10μM)
- 0,4μl de Taq DNA Polimerase (2,5 U/ reação)
- 4,0μl de Glicerol;
- 5,0μl de Cresol red
- 25,1 μl de H_20

A reação foi submetida a 30 ciclos de amplificação em termociclador, conforme descrito anteriormente para a primeira amplificação.

4.11.6.3.5.1 Revelação:

Para revelação dos produtos de amplificação, foram retirados de cada tubo de reação 10μl de amostra e misturados a 2μl de tampão de amostra (20g de Ficoll, 60ml de H_2O, 20ml de EDTA 0,5M e 0,25g de Xileno Cianol). Esta mistura foi aplicada em gel de agarose 2%, diluído em TAE (Tris-acetato-EDTA) contendo 0,8mg/ml de brometo de etídeo que em seguida foi submetida a corrente de 100V para a eletroforese. Após a eletroforese, os produtos de amplificação resultantes, foram visualizados por trans-iluminação do gel por raios ultravioleta.

4.11.6.3.6 Coronavirus:

O protocolo empregado na detecção de coronavirus utilizou um par de primers (CoV1 e CoV2), descrito por Esper, et al.,2005 (Tabela 11), complementares a região conservada do primeiro gene da replicase. O fragmento gerado possui aproximadamente 550pb.

Tabela 11: Seqüência de primers CoV1 e CoV2

Primer	Seqüência (5' – 3')
CoV1	GCGCAAAATAATGAATTAATGCC
CoV2	GACGCACCACCATATGAATCCTG

A seqüência alvo foi amplificada em uma reação com volume final de 50 μl contendo:

- 10,0μl de cDNA
- 5,0μl de tampão 10x (50mM de KCl, 10mM de Tris)
- 4,0μl de dNTPs (2,5 mM)
- 2,0μl de $MgCl_2$ (50mM)
- 1,0μl de primer CoV1 (30pM)
- 1,0μl de primer CoV2 (30pM)
- 0,3μl de Taq DNA Polimerase (2,5 U/ reação)
- 26,7μl de H_20

Os tubos de reação contendo a amostra e a mistura de reagentes foram submetidos a 40 ciclos de amplificação em termociclador como se segue:

95^0C – 15 minutos

94^0C – 1 minuto

50^0C – 1 minuto

72^0C – 1 minuto

72^0C – 10 minutos

4.11.6.3.6.1 Revelação:

Para revelação dos produtos de amplificação, foram retirados de cada tubo de reação 10μl de amostra e misturados a 2μl de tampão de amostra (20g de Ficoll, 60ml de H_2O, 20ml de EDTA 0,5M e 0,25g de Xileno Cianol). Esta mistura foi aplicada em gel de agarose 2%, diluído em TAE (Tris-

acetato-EDTA) contendo 0,8mg/ml de brometo de etídeo que em seguida foi submetida a corrente de 100V para a eletroforese. Após a eletroforese, os produtos de amplificação resultantes, foram visualizados por trans-iluminação do gel por raios ultravioleta.

4.11.6.3.7 Bocavirus:

O protocolo empregado na detecção de bocavirus utilizou um par de primers (188R e 542R), descritos por Allander et al. 2005 (Tabela 12). O fragmento gerado possui aproximadamente 354 pb.

Tabela 12: Seqüência de primers 188R e 542R

Primer	Seqüência (5' – 3')
188R	CTCTGTGTTGACTGAATACAG
542R	CTCTGTGTTGACTGAATACAG

A seqüência alvo foi amplificada em uma reação com volume final de 50 μl contendo:

- 5μl de cDNA
- 5μl de tampão 10x (50mM de KCl, 10mM de Tris)
- 1μl de dNTPs (2,5 mM)
- 2,5μl de $MgCl_2$ (50mM)
- 2μl de primer 188R (30pM)
- 2μl de primer 542R (30pM)
- 0,5μl de Taq DNA Polimerase (2,5 U/ reação)
- 32μl de H_20

Os tubos de reação contendo a amostra e a mistura de reagentes foram submetidos a 40 ciclos de amplificação em termociclador como se segue:

95^0C – 15 minutos

94^0C – 1 minuto

50^0C – 1 minuto

72^0C – 1 minuto

72^0C – 10 minutos

4.11.6.3.7.1 Revelação:

Para revelação dos produtos de amplificação, foram retirados de cada tubo de reação 10μl de amostra e misturados a 2μl de tampão de amostra (20g de Ficoll, 60ml de H_2O, 20ml de EDTA 0,5M e 0,25g de Xileno Cianol). Esta mistura foi aplicada em gel de agarose 2%, diluído em TAE (Tris-acetato-EDTA) contendo 0,8mg/ml de brometo de etídeo que em seguida foi submetida a corrente de 100V para a eletroforese. Após a eletroforese, os produtos de amplificação resultantes, foram visualizados por trans-iluminação do gel por raios ultravioleta.

4.11.6.3.8 Linfócitos TCD4+ e Carga Viral

A contagem de linfócitos T CD4+, TCD8+ e a quantificação da carga viral dos pacientes infectados pelo HIV, antes e depois da vacinação, foram obtidos por meio de consultas aos prontuários, respeitando os critérios de acompanhamento adotados pelo centro de atendimento CEADIP – EPM.

4.11.6.3.9 Quadro clínico e terapia

O quadro clínico dos pacientes infectados pelo HIV, com sua classificação segundo os critérios clínicos e imunonológicos do CDC de 1994 (CDC,1994) e os esquemas de terapêutica ARV, foram obtidos dos prontuários durante todo o período de acompanhamento proposto.

4.11.6.3.10 Análise estatística

Inicialmente foi realizada a análise descritiva das variáveis do estudo para cada um dos grupos avaliados, ou seja, para os pacientes infectados pelo HIV e grupo controle. Os resultados foram apresentados em tabelas de freqüências para as variáveis qualitativas.

Para verificar a existência ou não de associação entre a variável sexo e a variável grupo utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson.

No que tange às variáveis quantitativas, foram feitas estimativas das medidas de tendência central e de dispersão.

Calcularam-se os títulos médios geométricos (TGM), aplicando a média geométrica aos valores encontrados, dos antígenos AgH1, AgH3 e AgB e seus respectivos intervalos com 95% de confiança utilizando a distribuição binomial.

Para a comparação dos valores dos títulos médios geométricos dos grupos, empregou-se o teste t-Student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, após verificação de não normalidade pelo teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov. Enquanto que, a comparação nos diferentes

momentos de avaliação (antes da aplicação da vacina, 1 mês e 6 meses após a vacinação) dentro de cada grupo foi realizada pelo teste t-Student para dados pareados quando esses valores apresentavam distribuição normal e, caso contrário, utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Em seguida, foram calculadas as taxas de proteção e de soroconversão, com seus respectivos intervalos com 95% de confiança utilizando a distribuição binomial. A comparação dessas taxas entre os grupos foi realizada pelo teste exato de Fisher. Ao passo que para a comparação das taxas de um mesmo grupo em momentos diferentes foi empregado o teste não-paramétrico exato de McNemar.

Para testar a hipótese de correlação entre os TMGs e as variáveis número de células CD4+ e carga viral utilizou-se o teste de correlação de Pearson ou, quando este não era apropriado, o teste não-paramétrico de correlação de Spearman.

Nesse estudo adotou-se o nível descritivo de 5%.

4.11.6.3.10.1 Softwares utilizados

- ✓ Excel para confecção de tabelas e gráficos.
- ✓ Stata (versão 11.0) para análise estatística.

5. Resultados

No decorrer do estudo, foram coletadas amostras para análise sorológica de 37 crianças ou adolescentes infectados pelo HIV em três ocasiões (antes da vacinação, 1 mês e 6 meses após o procedimento). Paralelamente, 29 crianças ou adolescentes não infectados tiveram amostras coletadas para análise sorológica antes da vacinação e 1 mês após a mesma.

Verificou-se que os grupos não diferiram quanto ao sexo (*p*=0,804), todavia as crianças soropositivas para o HIV eram mais velhas que as demais à vacinação (*p*=0,030) (Tabela 13).

Tabela 13 - Sexo e idade das crianças infectadas e não infectadas pelo HIV

VARIÁVEIS	**HIV**		**valor de *p***
	positivo	**negativo**	
Sexo			0,804
Feminino	18 (48,7)	15 (51,7)	
Masculino	19 (51,3)	14 (48,3)	
Idade			**0,030***
média (dp)	13,3 (2,2)	12,1 (1,3)	
mediana (mín - máx)	12,7 (9,9 - 18,0)	12,0 (10,3 - 14,6)	

*: teste de Mann-Whitney

5.1 Resposta sorológica à vacina contra os vírus Influenza A e B

5.1.1 Quantificação dos Títulos Médios Geométricos (TMG)

Os valores das médias geométricas dos títulos de anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B pré e pós vacinação das crianças infectadas e não infectadas pelo HIV são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores dos títulos médios geométricos [IC95%] de anticorpos contra os antígenos vacinais H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação segundo exposição ao HIV

Antígeno	momento	HIV		valor de *p*
		POSITIVO	NEGATIVO	
AgH1	**PRÉ**	18,6 [12,6 – 27,3]	14,0 [9,0 - 21,7]	0,235*
	PÓS	46,5 [29,4 – 73,3]	132,2 [92,3 - 189,2]	**0,002***
AgH3	**PRÉ**	17,9 [12,7 – 25,1]	16,1 [9,8 - 26,4]	0,719**
	PÓS	57,1 [34,1 – 95,6]	198,4 [119,3 - 329,9]	**0,001****
AgB	**PRÉ**	59,3 [39,1 – 89,9]	40,0 [23,2 - 69,0]	0,239**
	PÓS	77,1 [49,7 - 119,5]	64,5 [37,7 - 110,4]	0,600**

*: teste de Mann-Whitney

**: teste *t*-Student

No momento pré-vacinação, em relação ao TMG de anticorpos, não houve diferença com significância estatística entre o grupo infectado e o não infectado pelo HIV para os 3 antígenos vacinais (H1, H3 e B). Entretanto, após a imunização, os grupos diferiram para os antígenos H1 e H3 (p=0,002 e p=0,001, respectivamente).

Além disso, verificou-se também que houve aumento, com significância estatística, dos títulos médios geométricos de anticorpos um mês após a imunização para todos os antígenos vacinais tanto nos indivíduos infectado pelo HIV, quanto nos indivíduos não infectados pelo HIV (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores dos títulos médios geométricos [IC95%] de anticorpos contra os antígenos vacinais H1, H3 e B em crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo HIV no instante pré-vacina e 1 mês após a vacinação

antígeno	GRUPO	Momento		valor de *p*
		PRÉ	PÓS	
AgH1	**HIV+**	18,6 [12,6 - 27,3]	46,5 [29,4 - 73,3]	**<0,001***
	HIV-	14,0 [9,0 - 21,7]	132,2 [92,3 - 189,2]	**<0,001***
AgH3	**HIV+**	17,9 [12,7 - 25,1]	57,1 [34,1 - 95,6]	**<0,001****
	HIV-	16,1 [9,8 - 26,4]	198,4 [119,3 - 329,9]	**<0,001****
AgB	**HIV+**	59,3 [39,1 - 89,9]	77,1 [49,7 - 119,5]	**0,025****
	HIV-	40,0 [23,2 - 69,0]	64,5 [37,7 - 110,4]	**0,009****

*: teste de Wilcoxon para dados pareados

**: teste t-Student para dados pareados

5.1.2 Taxas de Proteção e Soroconversão

No que tange à taxa de proteção no momento pré-vacina, os grupos soropositivo e soronegativo para o HIV não apresentaram diferença com significância estatística para os anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B (*p*=0,586, *p*=0,611 e *p*=0,185, respectivamente) (Tabela 16). O mesmo ocorreu entre os grupos para anticorpos contra os antígenos H3 e B um mês após a vacinação (*p*=0,095 e *p*=0,764, respectivamente). Entretanto, observou-se maior taxa de proteção após um mês da vacina contra o antígeno H1 nos soronegativos (*p*=0,004); enquanto 67,6% do grupo HIV+

estavam protegidos para o H1, o mesmo foi observado para 96,6% do grupo HIV-.

Tabela 16 - Taxa de proteção [IC95%] de anticorpos contra os antígenos vacinais H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação segundo exposição ao HIV

ANTÍGENO	HIV		valor de *p**
	POSITIVO taxa [IC95%]	NEGATIVO taxa [IC95%]	
Antes da vacinação			
AgH1	32,4 [18,0 - 49,8]	24,1 [10,3 - 43,5]	0,586
AgH3	37,8 [22,5 - 55,2]	31,0 [15,3 - 50,8]	0,611
AgB	75,7 [58,8 - 88,2]	58,6 [38,9 - 76,5]	0,185
1 mês após vacinação			
AgH1	67,6 [50,2 - 82,0]	96,6 [82,2 - 99,9]	**0,004**
AgH3	75,7 [58,8 - 88,2]	93,1 [77,2 - 99,2]	0,095
AgB	75,7 [58,8 - 88,2]	72,4 [52,8 - 87,3]	0,491

*: Teste exato de Fisher

Na análise dos intervalos de confiança das taxas de proteção dos antígenos pré e pós vacinação, verifica-se que houve aumento das mesmas em ambos os grupos no que diz respeito aos antígenos H1 e H3 (Figuras 2 e 3). O mesmo não foi observado em relação ao antígeno B.

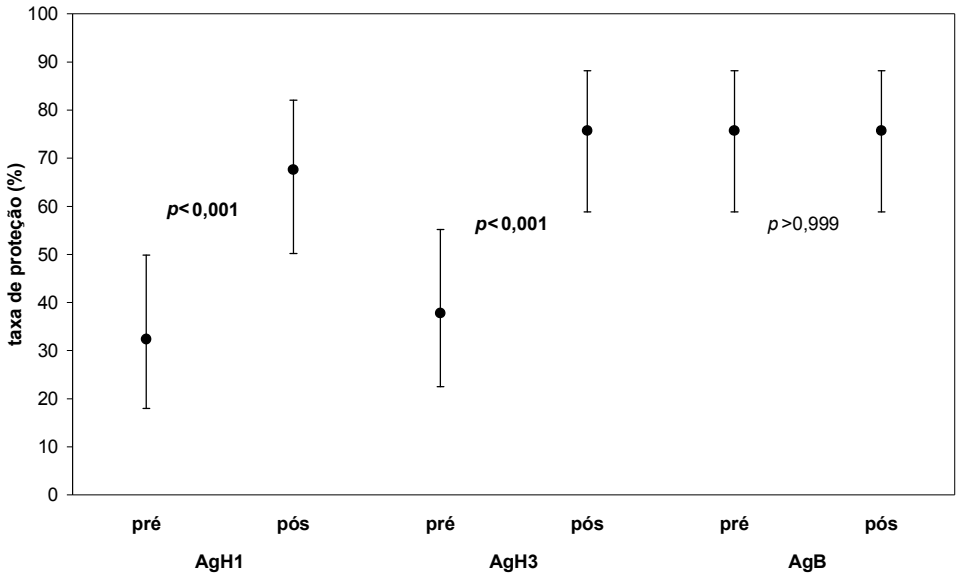


Figura 2-Taxa de proteção [IC95%] de anticorpos contra os antígenos antígenos H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação nos infectados pelo HIV.

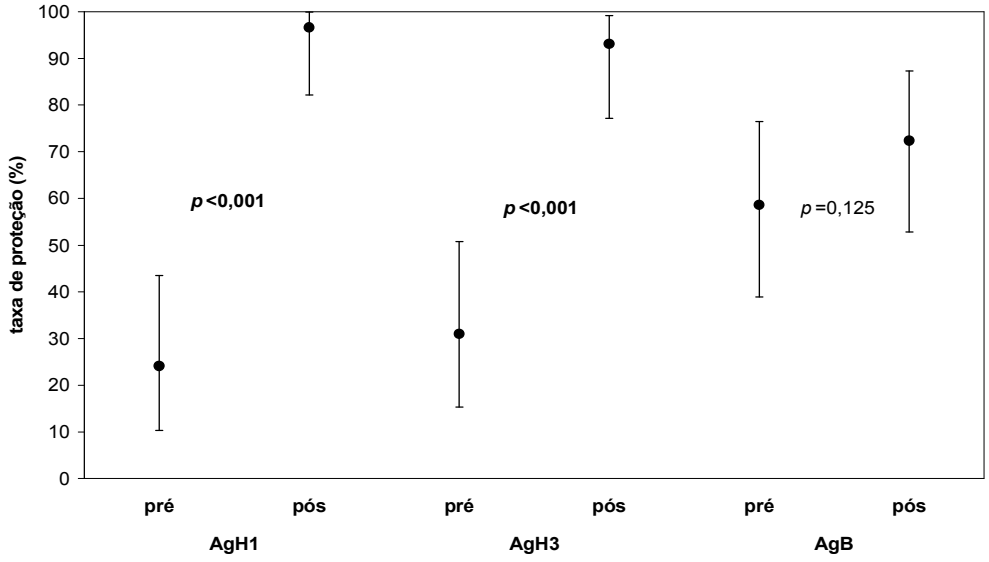


Figura 3 - Taxa de proteção [IC95%] de anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação nos não infectados pelo HIV

A imunogenicidade oferecida pela vacina contra o vírus da influenza não diferiu quanto ao sexo em nenhum dos antígenos avaliados, tanto no momento pré-vacina, assim como um mês após a vacinação (Tabela 17).

Tabela 17 - Número (%) de indivíduos protegidos para os antígenos H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação, segundo sexo

ANTÍGENO	Sexo		Valor de *p**
	feminino (n=33)	masculino (n=33)	
	nº(%)	nº(%)	
PRÉ vacina			
AgH1	8 (24,2)	11 (33,3)	0,587
AgH3	14 (42,4)	9 (27,3)	0,301
AgB	22 (66,7)	23 (69,7)	>0,999
PÓS vacina			
AgH1	27 (81,8)	26 (78,8)	>0,999
AgH3	27 (81,8)	28 (84,9)	>0,999
AgB	25 (75,8)	24 (72,3)	>0,999

*: Teste exato de Fisher

Paralelamente, observou-se que a taxa de soroconversão (aumento de 4x nos valores dos títulos) dos antígenos H1 e H3 foi maior entre os não infectados pelo HIV (*p*=0,003 e *p*=0,001, respectivamente) (Tabela 18 e Figura 4).

Tabela 18 - Taxa de soroconversão [IC95%] contra os antígenos H1, H3 e B nos instantes pré-vacina e 1 mês após a vacinação segundo exposição ao HIV

ANTÍGENO	HIV		valor de *p**
	POSITIVO	NEGATIVO	
	taxa [IC95%]	taxa [IC95%]	
AgH1	32,4 [18,0 - 49,8]	69,0 [49,2 – 84,7]	**0,006**
AgH3	45,9 [29,5 - 63,1]	86,2 [68,3 – 96,1]	**0,001**
AgB	16,2 [6,2 - 32,0]	24,1 [10,3 – 43,5]	0,537

*: Teste exato de Fisher

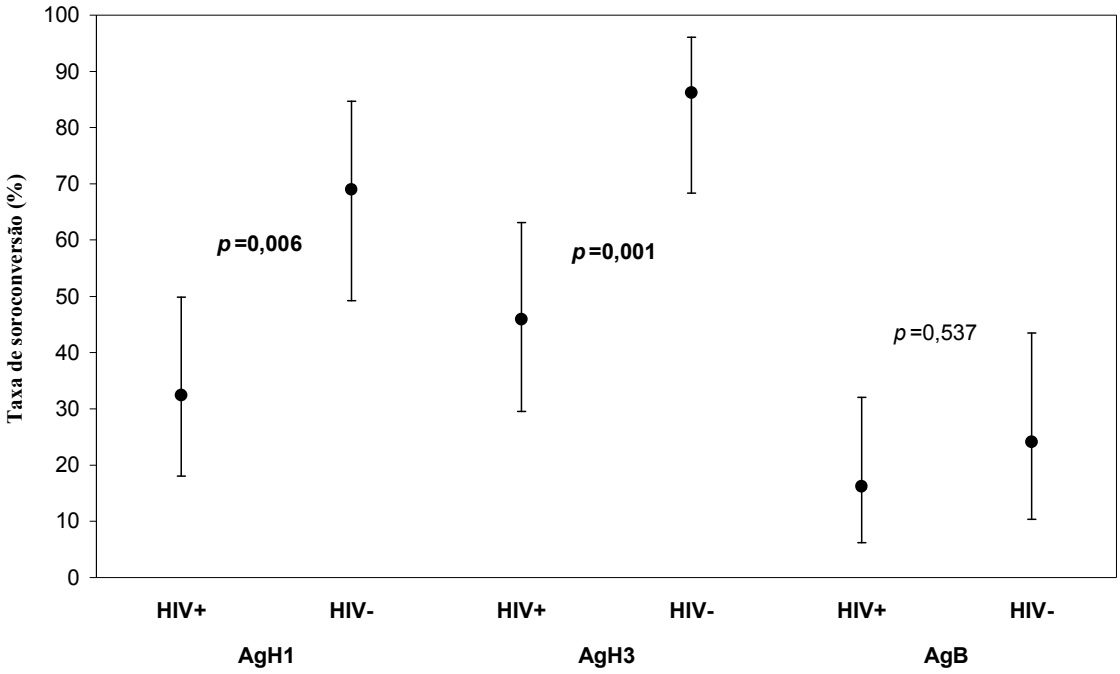


Figura 4 - Taxa de soroconversão [IC95%] de anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B segundo exposição ao HIV.

5.2 Viroses respiratórias

Durante o período de vigência do estudo, foram identificados 92 episódios de infecção respiratória referentes a 29 indivíduos infectados pelo HIV e 19 indivíduos não infectados pelo HIV.

A maioria dos sinais e sintomas relatados foi relacionada à infecções do trato respiratório superior. Tosse, coriza e congestão nasal foram as principais queixas.

Detectaram-se agentes virais em 39 dos 60 episódios de infecção respiratória presentes nos indivíduos infectados pelo HIV (65,0%) e, em 17 dos 32 episódios nos indivíduos não infectados pelo HIV (53,1%).

Nenhum caso de infecção por influenza A foi diagnosticado em ambos os grupos (Tabela 19).

Vale .a pena destacar que, entre os indivíduos não infectados pelo HIV, observou-se um caso de influenza B confirmado por IF e PCR e um episódio de co-infecção viral por Adenovírus e Metapneumovírus.

Os grupos não diferiam no número de episódios de infecção das vias respiratórias superiores (IVAS) (*p*=0,273) (Tabela 20).

Tabela 19. Freqüência dos agentes virais presentes nos episódios de infecção respiratória segundo infecção pelo HIV

Vírus respiratórios	**HIV**	
	POSITIVO	**NEGATIVO**
	n°(%)	**n°(%)**
Influenza A	–	–
Influenza B	–	1
Parainfluenza	–	–
Vírus sincicial respiratório	–	–
Adenovírus	8	6
Metapneumovírus	1	1
Adenovírus+Metapneumovírus	–	1
Rinovírus	16	8
Coronavírus	14	–
Bocavírus	–	–
Total	39	17

Tabela 20 Distribuição do número de episódios de infecção respiratória segundo infecção pelo HIV

nº episódios IVAS	HIV		valor de *p*
	POSITIVO (n=37) nº(%)	NEGATIVO (n=29) nº(%)	
0	8 (21,6)	10 (34,5)	0,273
1	12 (32,4)	12 (41,4)	
2	10 (27,1)	3 (10,3)	
≥3	7 (18,9)	4 (13,8)	
média (dp)	1,6 (1,4)	1,1 (1,2)	
mediana (mín-máx)	1 (0 - 6)	1 (0 - 4)	

5.3 Descrevendo as crianças e adolescentes infectados pelo HIV

A maioria das 37 crianças e adolescentes infectados pelo HIV era clinicamente classificada como B ou C (78,4%), imunologicamente 3 (51,4%) e a imunização em análise neste estudo era, no mínimo, a quinta que elas haviam recebido (59,5%) (Tabela 21).

Tabela 21 - Distribuição das crianças soropositivas para o HIV segundo classificação clínica e imunológica e número de vacinas contra influenza sazonal recebidas em anos anteriores

VARIÁVEIS	nº	%
Classificação (CDC1994)*		
Clínica		
N	3	8,1
A	5	13,5
B	16	43,2
C	13	35,2
Imunológica		
1	4	10,8
2	14	37,8
3	19	51,4
Nº imunizações contra influenza sazonal		
1	2	5,4
2	3	8,1
3	6	16,2
4	4	10,8
5	14	37,8
6	2	5,4
7	4	10,8
8	1	2,7
9	-	-
10	1	2,7

*Classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes, proposto pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)

Além disso, verificou-se que dentre as 36 crianças e adolescentes infectados pelo HIV com situação terapêutica conhecida, 34 (94,4%) encontrava-se em tratamento antiretroviral.

Após imunização não foi observada alteração com significância estatística (p=0,966) no número de células TCD4+ no sangue periférico

dessas crianças. Entretanto, houve diminuição no número de células TCD8+ (*p*=0,020) (Tabela 22).

Tabela 22 - Estatísticas descritivas dos resultados da determinação quantitativa de Linfócitos TCD4+ e TCD8+ no sangue periférico/mm^3 das crianças e adolescentes infectados pelo HIV antes e após a vacinação

VARIÁVEIS	n	média	dp	mediana	mín - máx	
CD4						0,966*
PRÉ	34	748,5	343,4	741,5	96 - 1410	
PÓS	34	746,3	394,3	701,5	67 - 1674	
CD8						**0,020****
PRÉ	33	1307,4	692,0	1201	201 - 3192	
PÓS	33	1161,4	618,6	1089	156 - 3053	

*: teste t-Student para dados pareados

**: teste de Wilcoxon para dados pareados

Carga viral à vacinação:

- ✓ 18 (50%) indetectáveis: 15 (83,3%) continuaram indetectáveis após vacinação

- ✓ 18 (50%) detectáveis: 2 (11,1%) ficaram indetectáveis após vacinação e para os 16 detectáveis que se mantiveram detectáveis não houve alteração com significância estatística (*p*=0,544) na carga viral após imunização (Tabela 23):

Tabela 23 Estatísticas descritivas da carga viral detectável das crianças e adolescentes infectados pelo HIV antes e após a última vacinação

carga viral	n	média	Dp	mediana	mín - máx	valor de *p*
						0,544*
PRÉ	16	3,38	0,92	3,34	2,89 - 3,87	
PÓS	16	3,45	0,91	3,51	2,96 - 3,93	

*: teste t-Student para dados pareados

Analisando-se os títulos médios geométricos de anticorpos seis meses após a imunização no grupo infectado pelo HIV, verificou-se que não houve alteração com significância estatística apenas contra o antígeno B (Tabela 24). Vale a pena destacar que para essa análise foram consideradas apenas as 33 crianças com valores de TGM conhecidos nos momentos pré e pós (6 meses) vacina.

Tabela 24 - Valores dos títulos médios geométricos [IC95%] de anticorpos para os antígenos vacinais H1, H3 e B em crianças HIV+ nos instantes pré-vacina e 6 meses após a vacinação

Antígeno	Momento		valor de *p*
	PRÉ	PÓS (6 meses)	
AgH1	20,0 [13,2 – 30,2]	33,1 [22,0 – 49,8]	**0,007***
AgH3	16,6 [11,8 – 23,2]	33,1 [20,1 – 54,6]	**0,001***
AgB	54,8 [34,9 – 86,1]	58,4 [38,1 – 89,4]	0,647**

*: teste de Wilcoxon para dados pareados

**: teste t-Student para dados pareados

Seis meses após a vacinação observou-se aumento nas taxas de proteção dos anticorpos contra os antígenos AgH1 e AgH3 dessas crianças e adolescentes (*p*=0,031 e *p*=0,021, respectivamente) (Tabela 25).

Tabela 25 - Taxa de proteção [IC95%] dos anticorpos contra os antígenos H1, H3 e B das crianças e adolescentes infectados pelo HIV nos instantes pré-vacina e seis meses após a vacinação

ANTÍGENO	Momento		valor de *p**
	PRÉ taxa [IC95%]	PÓS (6 meses) taxa [IC95%]	
AgH1	33,3 [18,0 – 51,8]	51,5 [33,5 – 69,2]	**0,031**
AgH3	33,3 [18,0 – 51,8]	57,6 [39,2 – 74,5]	**0,021**
AgB	72,7 [54,5 – 86,7]	81,8 [64,5 – 93,0]	0,375

*: teste de McNemar

Os valores das médias geométricas dos títulos de anticorpos para os antígenos AgH1, AgH3 e AgB não apresentaram diferença com significância estatística em relação ao número de vacinas recebidas (Tabela 26), tampouco no que tange ao número de células CD4+ à vacinação[6] (Tabela 27).

Tabela 26 - Valores dos títulos médios geométricos [IC95%] de anticorpos para os antígenos vacinais H1, H3 e B em crianças e adolescentes infectados pelo HIV seis meses após a vacinação segundo número de vacinas recebidas

ANTÍGENO	nº vacinas		valor de *p**
	< 5 (n=14)	≥ 5 (n=19)	
AgH1	26,9 [14,7 - 49,2]	38,6 [21,3 - 69,9]	0,384
AgH3	42,0 [13,8 - 128,2]	27,8 [18,2 - 42,4]	0,465
AgB	51,2 [22,5 - 145,6]	64,3 [39,0 - 105,8]	0,600

*: teste t-Student

Tabela 27 - Valores dos títulos médios geométricos [IC95%] de anticorpos para os antígenos vacinais AgH1, AgH3 e AgB em crianças e adolescentes infectados pelo HIV seis meses após a vacinação segundo CD4 à vacinação

ANTÍGENO	CD4		valor de *p*
	< 500 (n=11)	≥ 500 (n=21)	
AgH1	18,8 [7,9 - 44,8]	42,7 [27,1 - 67,4]	0,055*
AgH3	21,3 [7,2 - 63,4]	41,3 [22,8 - 74,9]	0,087**
AgB	40,0 [23,1 - 69,4]	72,5 [39,1 - 134,3]	0,154**

*: test t-Student
**: teste de Mann-Whitney

Entretanto, os TGMs do antígeno B foram maiores em crianças com carga viral abaixo de 400 cópias/mL (*p*=0,018) (Tabela 28).

Tabela 28 - Valores dos títulos médios geométricos [IC95%] de anticorpos para os antígenos vacinais AgH1, AgH3 e AgB em crianças e adolescentes infectados pelo HIV seis meses após a vacinação segundo carga viral à vacinação

ANTÍGENO	Carga Viral (cópias/mL)		valor de *p*
	< 400 (n=19)	≥ 400 (n=13)	
AgH1	41,5 [23,9 - 72,0]	22,3 [11,3 - 44,0]	0,138*
AgH3	41,5 [19,4 - 88,6]	23,5 [11,6 - 47,7]	0,554**
AgB	89,3 [49,9 - 159,6]	32,3 [17,7 - 59,0]	**0,018***

*: test t-Student
**: teste de Mann-Whitney

A análise das variáveis número de vacinas, CD4 e carga viral na forma quantitativa, verifica uma correlação moderada positiva entre o marcador de células CD4+ e a quantidade de anticorpos contra o antígeno AgH3 (*p*=0,028), ou seja, para valores aumentados de CD4, têm-se valores aumentados de antígenos AgH3. Já entre a carga viral do HIV e a quantidade de antígeno AgB observa-se correlação moderada negativa (*p*=0,003), para carga viral mais baixa, maior quantidade de anticorpos contra o antígeno AgB (Tabela 29).

Tabela 29 - Correlação entre os títulos médios geométricos de anticorpos para os antígenos vacinais H1, H3 e B e número de vacinas recebidas, Linfócitos TCD4+ à vacinação e carga viral do HIV à vacinação

VARIÁVEL	**AgH1**		**AgH3**		**AgB**	
	r	**valor de *p***	**r**	**valor de *p***	**r**	**valor de *p***
nº de vacinas	-0,115*	0,524	-0,043**	0,814	0,039*	0,829
CD4	0,269*	0,136	0,389**	**0,028**	0,253*	0,162
carga viral	-0,303**	0,092	-0,197**	0,279	-0,517**	**0,003**

*: correlação de Pearson

**: correlação de Spearman

6 Discussão

O presente estudo acompanhou longitudinalmente, durante um período de 24 semanas, crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo HIV, imunizados com solução injetável contendo diferentes cepas dos vírus da influenza sazonal, fragmentados e purificados, de acordo com as recomendações para a temporada de 2008 do hemisfério sul.

Em relação aos TMGs de anticorpos contra os antígenos vacinais, no momento pré-vacinação, não encontramos diferenças com significância estatística entre os grupos. Vale lembrar que a maioria dos indivíduos infectados pelo HIV (59,5%) apresentavam histórico de vacinação prévia de no mínimo 4 anos consecutivos, já os indivíduos não infectados pelo HIV foram imunizados contra influenza pela primeira vez.

O que provavelmente justifica a não diferenciação estatística dos grupos em relação aos TMGs para anticorpos, no momento pré-vacinação, é a baixa resposta humoral observada em indivíduos infectados pelo HIV, assim como perda rápida dos anticorpos após vacinação, fazendo com que, apesar de exposições anuais aos antígenos vacinais, apresentem títulos baixos de anticorpos na estação seguinte.

Kroon et al, ao avaliar a resposta de anticorpos depois da vacinação contra influenza em indivíduos infectados e não infectados pelo HIV, durante 3 anos consecutivos, observou aumento significativo dos títulos de anticorpos no momento pré-vacinação no grupo controle, com 2 ou 3 anos

de vacinação prévia. Porém, não verificou melhoras significativas na resposta imune presente no grupo HIV (Kroon et al., 2000).

Em nosso estudo, um mês depois da imunização, os TMGs de anticorpos contra os antígenos vacinais apresentaram aumentos significativos em ambos os grupos para todos os antígenos. Porém, o grupo controle demonstrou valores mais expressivos de anticorpos contra os antígenos H1 e H3 ($p=0,002$ e $p=0,001$, respectivamente).

Amendola et al, avaliando a resposta da vacina para influenza em indivíduos adultos infectados e não infectados pelo HIV, residindo em uma clínica de reabilitação, também notou que um mês após o procedimento, os TMGs de anticorpos vacinais elevaram-se de forma significativa para todos os antígenos, tanto nos infectados como nos não infectados pelo HIV ($p<0,05$), com maior média de aumento no grupo controle (2,6 a 6,1 no grupo infectado pelo HIV e 7,5 a 12,1 no grupo controle) (Amendola et al.,2001).

Contudo, outro estudo de Amendola et al, com crianças e adolescentes infectados e não infectados pelo HIV, imunizados com vacina virossomal contra influenza, verificou que um mês após a imunização, todos os indivíduos apresentaram TMGs significantemente aumentados, que persistiram durante toda a temporada de influenza. A porcentagem de anticorpos protetores alcançada nos indivíduos infectados pelo HIV variou entre 72,7% e 87,9% no início e chegou a 100% um mês após a vacinação. Resultados semelhantes foram observados entre os indivíduos não infectados pelo HIV. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$)

com relação aos níveis de proteção entre os dois grupos. Um mês depois da imunização, os TMGs de anticorpos contra todos os antígenos vacinais foi significantemente maior ($p<0,05$) do que aqueles medidos no início do estudo, em ambos os grupos. O autor relaciona o achado com o fato de que a maioria das crianças apresentava títulos protetores antes mesmo da administração da vacina (Amendola et al.,2010).

Quanto à taxa de soroconversão, verificamos em nosso estudo, maior aumento nos títulos de anticorpos contra os antígenos H1 e H3 no grupo controle. Contudo, a taxa de proteção foi maior apenas para o antígeno H1 nos indivíduos não infectados pelo HIV ($p=0,004$).

Estes dados sugerem que a perda da função imunológica causada pela infecção do HIV pode persistir, mesmo quando a viremia é suprimida e a recuperação imune parece ser alcançada (Viganò, et al.,2008).

Montoya et al., buscando analisar a qualidade da resposta imune proporcionada pela vacina contra gripe em indivíduos saudáveis e sob terapia antirretroviral, notou que a imunização induziu uma resposta humoral significativamente aumentada contra os três antígenos vacinais no grupo controle, e apenas contra o antígeno H3 nas crianças infectadas pelo HIV. A comparação dos títulos pós-vacinação entre os grupos mostrou valores mais elevados contra os três antígenos vacinais no grupo controle. Além disso, após a vacinação, os títulos protetores para os antígenos H3 e B apresentaram-se em menor proporção nas crianças infectadas pelo HIV que no grupo controle e uma proporção semelhante de indivíduos de ambos os

grupos adquiriram títulos protetores contra o antígeno H1 (Montoya et al, 2007)

Diferentes estudos relacionados à imunogenicidade oferecida por diversas vacinas, inclusas no calendário de crianças infectadas ou expostas ao HIV, já foram realizados no CEADIPe/UNIFESP – instituição escolhida para recrutamento das crianças e adolescentes infectados pelo HIV, incluídas em nosso trabalho. A variação na qualidade da resposta humoral é relatada em vários trabalhos: Zaccarelli-Filho. et al, ao estudar a resposta vacinal contra Tétano, Difteria, Sarampo e Hepatite B, percebeu níveis de anticorpos baixos para todos os antígenos nas crianças infectadas pelo HIV (Zaccarelli-Filho et al, 2007). Já Lima et al, em seu estudo sobre a imunogenicidade oferecida pela vacina contra Rubéola, verificou respostas inadequadas apenas nas categorias B/C e 2/3, mas adequadas nas categorias N/A e 1 (Lima et al., 2004). Pessoa et al, comparando a produção de Anti-HBs em adolescentes infectados e soro-revertidos para o HIV, notou aumento >/=10mIU/mL em apenas 18/40 (40,5%) dos adolescentes HIV+ e em 18/23 (78,3%) nos soro-revertidos (Pessoa et al., 2010). Contudo, Gouvêa et al, percebeu 100% de soroconversão na segunda dose da vacina contra Hepatite A em crianças infectadas pelo HIV e soro-revertidas (Gouvêa et al., 2005).

Além do tipo de vacina, deve ser levado em consideração o estado imunológico do indivíduo com HIV no momento pré-vacinação, pois a contagem do número de células TCD4+ e TCD8+, a quantificação de

partículas virais do HIV no sangue e os sintomas clínicos, podem refletir diretamente na qualidade da resposta vacinal.

Em nosso trabalho, a maioria das crianças infectadas pelo HIV era clinicamente classificada como B ou C (78,4%) e imunologicamente 3 (51,4%). Porém, com situação terapêutica estável e sob tratamento antirretroviral.

Alguns trabalhos relatam queda na contagem de células TCD4+/TCD8+ semanas após imunização contra influenza, bem como, elevação da carga viral do HIV (Fine et al., 2001; Vigano et al.,1998; Kroon FP, 1994).

Nosso trabalho não observou alteração com significância estatística (p=0,966) no número de células TCD4+ após a imunização. Contudo, houve diminuição na contagem de células TCD8+ (p=0,020).

Quanto à carga viral do HIV, 18 (50%) das crianças e adolescentes indetectáveis antes da vacinação, 15 (83,3%) continuaram indetectáveis. Dezoito (50%) dos pacientes detectáveis, ficaram indetectáveis após a vacinação, sendo que, para os 16 detectáveis que se mantiveram detectáveis, não houve alteração com significância estatística (p=0,544).

Quanto aos casos de infecções respiratórias observadas ao longo dos 6 meses de acompanhamento, encontramos 92 episódios referentes a 29 indivíduos infectados pelo HIV e 19 indivíduos não infectados pelo HIV. Foram detectados vírus respiratórios em 39 dos 60 episódios de infecção respiratória presentes nos indivíduos infectados pelo HIV (65,0%) e, em 17 dos 32 episódios nos indivíduos não HIV. Evidenciando uma discreta

elevação do número de episódios de infecção respiratória bem como de agentes virais em indivíduos infectados pelo HIV, embora as análises estatísticas não tenham encontrado diferenças significativas entre os grupos (p=0,273).

Sánchez et al., investigando a presença de vírus respiratórios através de técnica de imunofluorescência, em crianças menores ou iguais a 14 anos com diagnóstico de câncer ou infecção pelo HIV e sintomas de doença respiratória, encontraram apenas 20% (26/129) de positividade em pacientes com HIV e 12% (27/218) em pacientes com câncer, sendo 43% vírus sincicial respiratório, 26% influenza A, 13% adenovirus, 13% parainfluenza e 3,7% influenza B,em todos os casos (Sánchez et al., 2006).

A porcentagem elevada de vírus respiratórios encontrada em nosso estudo demonstra a importância da associação de técnicas, como a Imunofluorescência e PCR, para aumentar a sensibilidade do diagnóstico e obter resultados mais precisos com relação às infecções respiratórias virais.

Nenhum caso de influenza A pós-vacinação, foi confirmado em nosso estudo. Um único caso de influenza B foi detectado no grupo controle, contudo, um dia após a imunização, sugerindo quadro assintomático para influenza no momento pré-vacinação.

Isso reflete a importância das técnicas laboratoriais para confirmação da infecção por influenza, sendo o diagnóstico clínico de difícil conclusão devido às semelhanças das manifestações com outras viroses respiratórias.

Os episódios negativos para vírus respiratórios, sugerem a presença de agentes de outra etiologia, bem como inconsistência do material utilizado para análise ou sensibilidade insuficiente das técnicas utilizadas.

7 CONCLUSÕES

Entre os grupos estudados, no momento pré-vacinação, não houve diferença com significância estatística nos títulos médios geométricos de anticorpos para os três antígenos contidos na vacina contra influenza sazonal.

Após um mês da vacinação, houve aumento significativo dos títulos médios geométricos de anticorpos para os três antígenos vacinais em ambos os grupos.

O grupo controle apresentou aumento significantemente maior nos títulos médios geométricos de anticorpos para os antígenos H1 e H3 um mês após a imunização.

A taxa de soroproteção de anticorpos para o antígeno H1 um mês após a vacinação foi significantemente maior no grupo controle (96,6%) que no grupo infectado pelo HIV (67,6%) para o AgH1. Não houve diferença significante na taxa de soroproteção de anticorpos para os outros dois antígenos vacinais entre os grupos estudados.

A taxa de soroconversão de anticorpos para os antígenos H1 e H3 foi significantemente maior no grupo controle que no grupo infectado pelo HIV.

Não houve diferença significante na taxa de soroconversão de anticorpos para o antígeno B entre os grupos estudados.

Houve vários episódios de vírus respiratórios durante o seguimento. Rinovirus e coronavírus foram os agentes mais prevalentes identificados nas crianças e adolescentes infectados pelo HIV.

Nas crianças e adolescentes não infectados pelo HIV, os vírus mais freqüentemente encontrados foram rinovirus e adenovírus .

8 ANEXOS

VALORES DE SOROLOGIA ANTI HIV REALIZADO NO GRUPO CONTROLE

Paciente	Abs	c.off	Conclusão
1	0,085	0,161	NRT
2	0,055	0,161	NRT
3	0,053	0,161	NRT
4	0,042	0,161	NRT
5	0,049	0,161	NRT
6	0,044	0,161	NRT
7	0,053	0,161	NRT
8	0,045	0,161	NRT
9	0,049	0,161	NRT
10	0,047	0,161	NRT
11	0,046	0,161	NRT
12	0,044	0,161	NRT
13	0,045	0,161	NRT
14	0,046	0,161	NRT
15	0,045	0,161	NRT
16	0,049	0,161	NRT
17	0,051	0,161	NRT
18	0,043	0,161	NRT
19	0,051	0,161	NRT
20	0,119	0,161	NRT
21	0,041	0,161	NRT
22	0,043	0,161	NRT
23	0,052	0,161	NRT
24	0,049	0,161	NRT
25	0,053	0,161	NRT
26	0,052	0,161	NRT
27	0,049	0,161	NRT
28	0,051	0,161	NRT
29	0,057	0,161	NRT
30	0,054	0,161	NRT

CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV

Aids Pediátrica

Classificação da infecção pelo HIV

- A classificação da infecção pelo HIV utiliza sistema alfa-numérico, baseando-se em parâmetros clínicos e imunológicos, respectivamente, propostos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), em 1994.

Categorias clínicas

Categoria N – Assintomática

- Ausência de sinais e/ou sintomas; ou com apenas uma das condições da categoria A.

Categoria A – Sinais e/ou sintomas leves:

• linfadenopatia (>0,5 cm em mais de 2 cadeias diferentes);

• hepatomegalia;

• esplenomegalia;

• parotidite; e

• infecções persistentes ou recorrentes de vias aéreas superiores (otite média ou sinusite).

Presença de 2 ou mais das condições acima, porém sem nenhuma das condições das categorias B e C.

Categoria B – Sinais e/ou sintomas moderados:

• anemia (Hb < 8g/dl), neutropenia (< 1.000/mm3) ou trombocitopenia (< 100.000/mm3), por mais de 30 dias;

• meningite bacteriana, pneumonia ou sepse;

• candidíase oral persistindo por mais de 2 meses;

• miocardiopatia;

infecção por Citomegalovírus (CMV), antes de 1 mês de vida;

• diarréia recorrente ou crônica;

• hepatite;

• estomatite pelo vírus Herpes simplex (HSV) recorrente (mais do que 2 episódios/ano);

• pneumonite ou esofagite por HSV, com início antes de 1 mês de vida;

• herpes zoster, com 2 episódios ou mais de um dermátomo;

• pneumonia intersticial linfocítica (LIP);

• nefropatia;

• nocardiose;

• febre persistente (> 1 mês);

• toxoplasmose antes de 1 mês de vida; e

• varicela disseminada ou complicada.

Categoria C – Sinais e/ou sintomas graves. Crianças com quaisquer das condições listadas abaixo:

• infecções bacterianas graves, múltiplas ou recorrentes (confirmadas por cultura, 2 episódios em intervalo de 1 ano): septicemia, pneumonia, meningite, infecções osteo-articulares, abscessos de órgãos internos;

• candidíase esofágica ou pulmonar;

• coccidioidomicose disseminada;

• criptococose extrapulmonar;

• criptosporidíase ou isosporíase com diarréia (> 1 mês);

• CMV em locais além do fígado, baço ou linfonodos, a partir de 1 mês de vida;

• encefalopatia pelo HIV (achados que persistem por mais de 2 meses), em razão de:

a) déficit do desenvolvimento neuropsicomotor;

b) evidência de déficit do crescimento cerebral ou microcefalia adquirida identificada por medidas de perímetro específico ou atrofia cortical mantida em tomografia computadorizada ou ressonância magnética sucessiva de crânio; e

c) déficit motor simétrico com 2 ou mais dos seguintes achados: paresias, reflexos patológicos, ataxia e outros.

• infecção por HSV, úlceras mucocutâneas com duração maior do que 1 mês ou pneumonite ou esofagite (crianças > 1 mês de vida);

• histoplasmose disseminada;

• Mycobacterium tuberculosis disseminada ou extrapulmonar;

• Mycobacterium ou outras espécies disseminadas;

• Mycobacterium avium ou M. kansasii disseminados;

• pneumonia por Pneumocystis carinii;

• salmonelose disseminada recorrente;

• toxoplasmose cerebral com início após o 1.º mês de vida;

• síndrome da caquexia, manifestada por:

a) perda de peso > 10% do peso anterior; ou

b) queda de dois ou mais percentis nas tabelas de peso para a idade; ou

c) peso abaixo do percentil 5, em duas medidas sucessivas; e

d) diarréia crônica (duração maior que 30 dias); ou

e) febre por 30 dias ou mais, documentada.

• leucoencefalopatia multifocal progressiva;

• sarcoma de Kaposi; e

• linfoma primário do cérebro e outros linfomas.

Categorias imunológicas da classificação da infecção pelo HIV na criança (menores de 13 anos)

Alteração Imunológica	Contagem de LTCD4+		
	Idade		
	< 12 meses	1 a 5 anos	6 a 12 anos
Ausente (1)	≥ 1500 (> 25%)	≥ 1000 (> 25%)	≥ 500 (> 25%)
Moderada (2)	750 – 1499 (15-24%)	500-999 (15-24%)	200 - 499 (15-24%)
Grave(3)	< 750 (< 15%)	< 500 (<15%)	<200 (<15%)

Classificação da infecção pelo HIV na criança (menores de 13 anos)

Alteração Imunológica	N = Ausência de sinais e/ou sintomas clínicos	A = Sinais e/ ou sintomas clínicos leves	B = Sinais e/ou sintomas clínicos moderados	C = Sinais e/ou sintomas clínicos graves
Ausente (1)	N1	A1	B1	C1
Moderado (2)	N2	A2	B2	C2
Grave (3)	N3	A3	B3	C3

Quando iniciar o tratamento anti-retroviral

- Os parâmetros para indicação do início da terapia anti-retroviral baseiam-se na classificação da infecção pelo HIV em criança, conforme critério do CDC .
- Categorias N1 e A1, a recomendação é de acompanhamento clínico e laboratorial regulares, sem tratamento.
- Categorias N2 e B1, pode-se considerar que o tratamento e a introdução da terapia dependerá da evolução clínica e laboratorial. Portanto, recomenda-se o acompanhamento clínico-laboratorial em intervalos inferiores a 3 meses.
- Demais categorias, está indicado o início imediato da terapia.

- Um fator fundamental para a eficácia do esquema terapêutico é a adequada adesão ao tratamento por parte da criança e dos responsáveis.
- (1) disponibilidade e palatabilidade da formulação;
- (2) impacto do esquema terapêutico na qualidade de vida, incluindo número de medicamentos, freqüência de administração e necessidade de ingestão com ou sem alimentos;
- (3) habilidade dos responsáveis na administração de regimes complexos;
- (4) potencial de interação com outras drogas e
- (5) efeitos colaterais.

Adolescentes infectados pelo HIV

- O adolescente infectado pelo HIV através de transmissão sexual ou uso de drogas injetáveis, após a puberdade, parece ter curso clínico semelhante ao do adulto. Entretanto, um número crescente de crianças infectadas perinatalmente pelo HIV está atingindo a adolescência e apresenta curso clínico diferente dos adolescentes infectados mais tardiamente.

- A prescrição de medicação anti-retroviral para o tratamento de infecções oportunistas deve ser baseada no estadiamento da puberdade de Tanner e não na idade cronológica. O adolescente nas fases inicias da puberdade (Tanner I e II) deve ser tratado segundo as recomendações pediátricas, enquanto aquele em fase adiantada de maturação sexual (Tanner V) deve seguir as recomendações estabelecidas para os adultos

ESCOLA ESTADUAL PROFª. MARINA CINTRA
RUA DA CONSOLAÇÃO, 1289 – CONSOLAÇÃO – CEP 01301-100 – FONE/FAX 3258.9380 3237.0855 - SÃO PAULO – SP
E-mail: e003712a@see.sp.gov.br

São Paulo,___ de _____ de 2008.

A Escola Estadual Professora Marina Cintra, juntamente com o Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – IMTUSP convida os alunos e senhores pais e/ou responsáveis legais, para a palestra "**Vírus respiratórios – Como prevenir**", com a pediatra e infectologista Dra. Daisy Maria Machado.

Dia: __/__/__

Horário:__h

Local: _____

Atenciosamente,

_____

Diretor - Vladimir Teófilo Fragnan

ESCOLA ESTADUAL PROFª. MARINA CINTRA
RUA DA CONSOLAÇÃO, 1289 – CONSOLAÇÃO – CEP 01301-100 – FONE/FAX 3258.9380 3237.0866 - SÃO PAULO – SP
E-mail: e003712a@see.sp.gov.br

São Paulo, ___ de _____ de 2008.

A Escola Estadual Professora Marina Cintra, juntamente com o Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – IMTUSP convida os alunos acompanhados pelos pais e/ou responsáveis legais, interessados na vacinação contra o vírus da gripe, a comparecerem no dia __/__/__, às __:__hs, no salão nobre da escola, para vacinação.

Atenciosamente,

_____
Diretor - Vladimir Teófilo Fragnan

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 31 de Outubro de 2008.
CEP 0202/08
CONEP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) DAISY MARIA MACHADO
Disciplina/Departamento: Infectologia Pediátrica da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Imunogenicidade e eficácia da vacina contra o vírus da influenza em crianças e adolescentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)".**

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** **Adendo ao protocolo (versão de 08/out/2008) - inclusão de grupo controle** do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 0202/08

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

CÓPIA

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

Ao
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.12.10, tomou conhecimento da **alteração de título** do Protocolo de Pesquisa nº **1287/09** *"Imunogenicidade e eficácia da vacina contra o vírus da influenza em crianças e adolescentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)."* **para Imunogenicidade e eficácia da vacina contra o vírus da influenza em crianças e adolescentes sadios e infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)**", será **dissertação de mestrado** da aluna **Alessandra Aparecida Machado**, tendo como orientadora a **Dra. Daisy Maria Machado**, bem como aprovou **o Adendo e o novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

CAPPesq, 10 de Dezembro de 2010.

P/ Prof. Associado Aluísio Augusto Cotrim Segurado
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5° andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 27, Number 00, 2011
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2010.0306

Immunogenicity of an Inactivated Influenza Vaccine and Postvaccination Influenza Surveillance in HIV-Infected and Noninfected Children and Adolescents

Alessandra Aparecida Machado,[1] Clarissa Martins Machado,[1] Lucy Santos Vilas Boas,[1] Mariana Corriani Lopes,[1] Alda de Fátima Barbosa Gouvêa,[2] Regina Célia de Menezes Succi,[2] Tânia Regina Tozetto Mendoza,[1] Tatiana Mitiko Kanashiro,[1] and Daisy Maria Machado[1,2]

Abstract

Individuals infected with HIV are at higher risk for severe cases of seasonal influenza infection and should receive annual doses of vaccine. Our objectives were to evaluate the immunogenicity of an influenza vaccine in 37 HIV-infected patients (HIV group) compared to 29 uninfected individuals (control group) and to carry out a clinical and virological surveillance of influenza during a 6-month follow-up. Both groups received the vaccine recommended for the southern hemisphere in 2008. Antibody responses to antigens H1N1, H3N2, and B were measured in blood samples at vaccination (T0) and after 1 month (T1). Influenza surveillance was performed by weekly telephone calls for a follow-up period of 6 months. Nasal washes were taken from subjects with respiratory symptoms. The direct immunofluorescence assay in house polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR were used for the detection of different respiratory viruses. The median age of the participants was 13.3 years (sd = 2.2) and 12.1 years (sd = 1.3) for the HIV group and control group, respectively. One month after vaccination (T1), both groups showed significant increases in the antibody geometric mean titers (GMTs) for all antigens. However, healthy controls showed higher values for antigens A/H1N1 and A/H3N2 ($p = 0.002$ and 0.001, respectively). There was a higher increase in the percentage of HIV-uninfected subjects with protective A/H1N1 antibodies (96.6%) compared to HIV-infected vaccinees (67.6%) at T1 ($p = 0.004$). Rhinovirus (27.7%) and coronavirus (22.5%) were the most prevalent agents identified in HIV-infected individuals. In the control group, the viruses most frequently found were rhinovirus (24.2%) and adenovirus (21.2%). The seroprotection rate for the H1N1 antigen was higher in the control group, which also showed a greater increase in GMTs for H1N1 and H3N2 antigens after immunization. Viral agents were identified in 39/60 (65%) episodes of respiratory infections from the HIV-infected group and in 17/32 episodes (53.1%) from the control group ($p = 0.273$).

PATIENTS WITH IMMUNOSUPPRESSIVE DISEASES such as acquired immunodeficiency syndrome caused by infection with human immunodeficiency virus (HIV) are among the most vulnerable to severe forms of influenza virus infection. Those who are affected may have prolonged viral replication, an extended duration of influenza symptoms, and a high rate of influenza-related mortality.[1] Since the early 1990s, immunization guidelines have recommended yearly vaccination against influenza virus in HIV-infected patients as a priority prevention.[2] However, the capacity of individuals to respond to vaccines with protective titers of the requisite antibody depends on the degree of immune impairment at the time of immunization.[3,4]

Thus, people infected with HIV are potentially susceptible to influenza viruses even if properly vaccinated. Previous studies focused on the immunogenicity of influenza vaccines rather than on the close postvaccination influenza surveillance during seasonal epidemics.[5]

Taking into account the scarcity of data in the literature, this study followed up a cohort of HIV-infected children and adolescents who had been vaccinated with a single dose of influenza vaccine during the 2008 influenza season in São Paulo, Brazil. The aim was to evaluate the immunogenicity of the vaccine and to carry out clinical and virological surveillance of influenza in this population.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 6;102(36):12891-6. Epub 2005 Aug 23. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Oct 25;102(43):15712.

2- Alonso WJ, Viboud C, Simonsen L, Hirano EW, Daufenbach LZ, Miller MA. Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. Am J Epidemiol. 2007 Jun 15;165(12):1434-42.

3- Amendola A, Boschini A, Colzani D, Anselmi G, Oltolina A, Zucconi R, Begnini M, Besana S, Tanzi E, Zanetti AR. Influenza vaccination of HIV-1-positive and HIV-1-negative former intravenous drug users. J Med Virol. 2001 Dec;65(4):644-8.

4- Amendola A, Pariani E, Viganò A, Erba P, Zappa A, Giacomet V, Tanzi E, Zuccotti GV, Zanetti A. Influenza surveillance in a cohort of HIV-infected children and adolescents immunized against seasonal influenza. Vaccine. 2010 Mar 24;28(15):2700-4. Epub 2010 Jan 25.

5- American Academy of Pediatrics (AAP). Immunization in special clinical circumstances. In: Pickering LK, editor. 2003 Red Book. Report of the Committee on Infectious Diseases. 26th ed. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics; 2003. p. 54-81.

6- Andiman WA, Shearer WT. Lymphoid interstitial pneumonitis. In: Pizzo PA, Wilfert CM, editores. Pediatric AIDS, the challenge of HIV infection in infants, children, and adolescents. 3ª ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1998. 323-334.

7- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis Journal of Clinical Microbiology, February 2001, p. 498-505, Vol. 39, No. 2.

8- Arruda E, Hayden FG. Influenza virus, respiratory syncytial, parainfluenza viruses, rhinovirus, and respiratory adenoviruses. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editors. Tropical infections disease – principles, pathogens & practice. Philadelphia:Churchill Livingstone; 1999.p.1109-21.

9- Atashili J, Kalilani L, Adimora AA. Efficacy and clinical effectiveness of influenza vaccines in HIV-infected individuals: a meta-analysis. BMC Infect Dis. 2006 Sep 11;6:138.

10-Bergen R, Black S, Shinefield H, Lewis E, Ray P, Hansen J, Walker R, Hessel C, Cordova J, Mendelman PM. Safety of cold-adapted live attenuated influenza vaccine in a large cohort of children and adolescents. Pediatr Infect Dis J. 2004 Feb;23(2):138-44.

11-Belshe RB, Newman FK, Cannon J, Duane C, Treanor J, Van Hoecke C. Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. N Engl J Med. 2004b;351:2286-94.

12-Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA). Plano de preparação para pandemia de influenza do estado de São Paulo. Diretrizes Gerais. Secretaria de Estado de São Paulo. 2005; 1-39.

13-Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais. Imunobiológicos Especiais e suas Indicações. Brasília, 1999-2000.

14-Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Guia de tratamento Clínico da Infecção pelo HIV em Crianças. Série Manuais n°18. Brasília/DF-2004:1-107.

15-Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Campanha Nacional de Vacinação do Idoso. Edição – 3ª, SVS/MS. Brasil, 2008.

16-Bridges CB, Fukuda K, Cox NJ, Singleton JA: Advisory Committee on Immunization Practices. Prevention and control of influenza. Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2001, 50(RR-4):1.

17-Brydak LB, Machała M, Myśliwska J, Myśliwski A, Trzonkowski P. Immune response to influenza vaccination in an elderly population. J Clin Immunol. 2003 May;23(3):214-22.

18-Burns DN, Mofenson LM. Paediatric HIV-1 infection. Lancet. 1999; 354 suppl 2:SII1-6.

19-Carman WF, Elder AG, Wallace LA, McAulay K, Walker A, Murray GD, Stott DJ. Effects of influenza vaccination of health-care workers on mortality of elderly people in long-term care: a randomised controlled trial. Lancet. 2000 Jan 8;355(9198):93-7.

20-Carvalho AP, Dutra LC, Tonelli E. Influenza vaccination in HIV infected children: immunologic and viral load changes J Pediatr (Rio J). 2003 Jan-Feb;79(1):29-40.

21-Cavdar C, Sayan M, Sifil A, Artuk C, Yilmaz N, Bahar H, Camsari T. The comparison of antibody response to influenza vaccination in

continuous ambulatory peritoneal dialysis, hemodialysis and renal transplantation patients. Scand J Urol Nephrol. 2003;37(1):71-6.

22-Center Diseases Control. National Center for Immunization and Respiratory Disease (NCIRD). Flu Symptoms & Severity. March 13, 2009. Htp:// www.cdc.gov/flu/about/disease/symptoms.html.

23-Center for Disease Control and Prevention (US). Prevention and controlo f influenza: recommendations of the Advisory Committee on Imunization Practices (ACIP). MMWR 2006;55 (RR-10):1-42. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5510a1.htm.

24-Center for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS and FLU. Nov 8, 2004:1-2. http://www.cdc.gov/flu.

25-Centers for Disease Control and Prevention – CDC. 1994 Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. MMWR 1994;43(RR-12):12-19.

26-Cintra OAL, Rey LC. Safety, immunogenicity and efficacy of influenza vaccine in children. J Pediatr (Rio J). 2006 Jul;82(3 Suppl):S83-90. Epub 2006 Jun 21.

27-Cintra OAL, Feitosa MAI Paula FE, Silva ML, Cervi MC, Licio Je, et al. Impact of influenza (Flu) and respiratory syncytial viru (RSV) infections in pediatric hospitalizations in subtropical Brasil. In: XLIIIAnnual Meeting of Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediatric; 2005 Nov 6-10; Ribeirão Preto, Brazil. P.103.

28-Clover RD, Crawford S, Glezen WP, Taber LH, Matson CC, Couch RB. Comparison of heterotypic protection against influenza

A/Taiwan/86 (H1N1) by attenuated and inactivated vaccines to A/Chile/83-like viruses. J Infect Dis. 1991 Feb;163(2):300-4.

29-Commission of the European Communities The rules governing medicinal products in the European Community. Guidelines on the quality, safety and efficacy of medicinal products for human use 93-99, 1992. Vol. III (Addendum n°2).

30-Couceiro JNSS. Viroses respiratórias. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução à virologia humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 119-125.

31-Cox NJ, Subbarao K. Influenza. Lancet. 1999 Oct 9;354(9186):1277-82.

32-Cox NJ, Tamblyn SE, Tam T. Influenza pandemic planning. Vaccine. 2003 May 1;21(16):1801-3.

33-De Paiva TM, Ishida MA, Hanashiro KA, Scolaro RM, Golçalves MG, Benega, MA, et al. Outbreak of influenza type A (H1N1) in Iporanga, São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paul. 2001;43:311-5.

34-Deffernez C, Wunderli W, Thomas Y, Yerly S, Perrin L, Kaiser L. Amplicon sequencing and improved detection of human rhinovirus in respiratory samples.J Clin Microbiol. 2004 Jul;42(7):3212-8.

35-Englund JA, King. JC Jr. Respiratory viral infections in children infected whit HIV. In: Pizzo PA, Wilfert CM, editores. Pediatric AIDS, the challenge of HIV infection in infants, children, and adolescents. 3ª ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1998. 227-249.

36-Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract

disease in infants and young children. J Infect Dis. 2005 Feb 15;191(4):492-8. Epub 2005 Jan 14.

37-Farhat CK, Cintra OA, Tregnaghi MW. Vaccination and the respiratory tract--what should we know? J Pediatr (Rio J). 2002 Nov-Dec;78 Suppl 2:S195-204.

38-Fauci AS. HIV and AIDS: 20 years of Science. Nat Med. 2003; 9(7):839-843.

39-Fine AD, Bridges CB, De Guzman AM, Glover L, Zeller B, Wong SJ, Baker I, Regnery H, Fukuda K: Influenza A among patients whit human immunodeficiency virus: An outbreak of infection at a residential facility in New York city. Clin Infect Dis 2001, 32(12):1784-91.

40-Foster DA, Talsma A, Furumoto-Dawson A, Ohmit SE, Margulies JR, Arden NA, et al. Influenza vaccine effectiveness in preventing hospitalizations for pneumonia in the elderly. Am J Epidemiol 1992; 136:296-307.

41-Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. Vaccine. 2005 Dec 30;23(50):5708-24.

42-Glezen WP. The Pediatricians's role in influenza control. Pediatr Infect Dis. 1986 5: 615-8.

43-Gorse GL, Otto EE, Daughaday CC, Newman FK, Eickhoff CS, Powers DC, et al. Influenza virus of patients whit chronic lung disease. Chest 1997;112:1221-33.

44-Gougeon ML, Lecoeur H, Sasaki Y. Apoptosis and the CD95 system in HIV disease: impacto f highly active antiretroviral therapy (HAART). Immunol Lett 1999;66(1-3):97-103.

45-Gouvea AF, De Moraes-Pinto MI, Ono E, Dinelli MI, Machado DM, Weckx LY, Succi RC. Immunogenicity and tolerability of hepatitis A vaccine in HIV-infected children. Clin Infect Dis. 2005 Aug 15;41(4):544-8. Epub 2005 Jul 14.

46-Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Levandowski PA. The efficacy of influenza vaccine in elderly person. A meta-analisys and review of the literarure. Ann Intern Med 1995; 123:518-527.

47-Gruber WC, Taber LH, Glezen WP, Clover RD, Abell TD, Demmler RW, Couch RB. Live attenuated and inactivated influenza vaccine in school-age children. Am J Dis Child. 1990 May;144(5):595-600.

48-Herzog C, Metcalfe IC, Schaad UB. Virosome influenza vaccine in children. 2002 Dec 20;20 Suppl 5:B24-8.

49-Hirst GK. The agglutination of red cells by allantoic fluido f chick embryos infected whit influeza virus. Science. 1941 Jul 4;94(2427):22-23.

50-Huckried A, Bungener L, Stegmann T, Daemen T, Medema J, Palache AM, Wilschut J. The virosome concept for influenza vaccines. Vaccine. 2005 Jul 8;23 Suppl 1:S26-38.

51-Jackson CR, Vavro CL, Valentine ME, Pennington KN, Lanier ER, Katz SL, Diliberti JH, Mckinney RE, Wilfert CM, St Clair MH: Effect of influenza immunization on immunologic and virologic characteristics of

pediatric patients infected whit human immunodeficiency virus. Pediatr Infect Dis J 1997, 16(2):200-4.

52-Jofre M., Leonor; Perret P, Cecilia; Dabanch P., Jeannette; Abarca V., Katia; Olivares C., Roberto; Luchsinger F., Vivian; Aguilera S., Ximena; Sotomayor P., Viviana; Olea N., Andrea. Influenza: the reemergence of an ancient disease and its risk of pandemia. Rev. chil. infectol;22(1):75-88, mar. 2005.

53-Kanra G, Marchisio P, Feiterna-Sperling C, Gaedicke G, Lazar H, Durrer P, Kürsteiner O, Herzog C, Kara A, Principi N. Comparison of immunogenicity and tolerability of a virosome-adjuvanted and a split influenza vaccine in children. Pediatr Infect Dis J. 2004 Apr;23(4):300-6.

54-Kroon FP, van Dissel JT, de Jong JC, van Furth R: Antibody response to influenza, tetanus and pneumococcal vaccines in HIV-seropositive individuals in relation to the number of CD4+ lymphocytes. AIDS 1994, 8(4):469-76.

55-Kroon FP, van Dissel JT, de Jong JC, Zwinderman K, van Furth R. Antibody response after influenza vaccination in HIV-infected individuals: a consecutive 3-year study. Vaccine. 2000 Jul 1;18(26):3040-9.

56-Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, Perl TM, Nelson KE, Cummings DA. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. Lancet Infect Dis. 2009 May;9(5):291-300.

57-Lima M, De Menezes Succi RC, Nunes Dos Santos AM, Weckx LY, De Moraes-Pinto MI. Rubella immunization in human

immunodeficiency virus type 1-infected children: cause for concern in vaccination strategies. Pediatr Infect Dis J. 2004 Jul;23(7):604-7.

58-Lino VTS. Estudo da resposta immune humoral e da ocorrência de episódos de gripe após a vacinação contra influenza em idosos. Tese (Mestrado). Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública; 2001.

59-Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, et al. Influenza: emergence and control. J Virol 2004;78(17):8951-9.

60-Mendoza Sanchez MC, Ruiz-Contreras J, Vivanco JL, Fernandez-Carrion F, Baro Fernandez M, Ramos JT, Otero JR, Folgueira D. Respiratory virus infections in children with cancer or HIV infection. J Pediatr Hematol Oncol. 2006 Mar;28(3):154-9.

61-Moorman J. Viral characteristics of influenza. South Med J 2003; 96; 758-61.

62-Montoya CJ, Toro MF, Aguirre C, Bustamante A, Hernandez M, Arango LP, Echeverry M, Arango AE, Prada MC, Alarcon Hdel P, Rojas M. Abnormal humoral immune response to influenza vaccination in pediatric type-1 human immunodeficiency virus infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Jun;102(4):501-8.

63-Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Virology. 3rd Ed. Philadelphia, USA: Raven Pub;1996.

64-Neuzil KM, Edwards KM. Influenza vaccines in children. Semin Pediatr Infect Dis. 2002 Jul;13(3):174-81. Review.

65-Nicholson KG, Kent J, Hammersley V, Cancio E. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease burden. BMJ. 1997 Oct 25;315(7115):1060-4.

66-Oliveira R, Machado A, Tateno A, Boas LV, Pannuti C, Machado C. Frequency of human metapneumovirus infection in hematopoietic SCT recipients during 3 consecutive years. Bone Marrow Transplant. 2008 Aug;42(4):265-9.

67-Palese P, Shaw ML. In: Fields BN, KnipeDM, Howley PM, editors. Virology. 5th Ed. Philadelphia , USA: Raven Pub; 2007.1647-1680.

68-Pessoa SD, Miyamoto M, Ono E, Gouvêa AF, de Moraes-Pinto MI, Succi RC. Persistence of vaccine immunity against hepatitis B virus and response to revaccination in vertically HIV-infected adolescents on HAART. Vaccine. 2010 Feb 10;28(6):1606-12. Epub 2009 Dec 2.

69-Piedra PA, Glaglani MJ, Riggs M, Herscler G, Fewlass C, Watts M. Live attenuated influenza vaccine, trivalent, is safe in healthy children 18 months to 4 years, 5 to 9 years, and 10 to 18 years of age in a commmunity-based, nonrandomize, open-label Trial. Pediatrics. 2005;116:e397-407.

70-Plana M, Ferrer E, Martínez C, Podzamczer D, García F, Maleno MJ, Barceló JJ, García A, Barberá MJ, Lacarcel M, Miró JM, Gallart T, Gatell JM. Immune restoration in HIV-positive, antiretroviral-naive patients after 1 year of zidovudine/lamivudine plus nelfinavir or nevirapine. Antivir Ther. 2004 Apr;9(2):197-204.

71-Plana M, Martinez C, Garcia F, Maleno MJ, Barceló JJ, Garcia A, Lejeune M, Vidal C, Cruceta A, Miró JM, Pumarola T, Gallart T, Gatell

Jm. Immunologic reconstitution after, year of highly active antiretroviral therapy, whit or without protease inhibitors. J Acquir Immune Defic Syndr. 2002; 29(5):429-34.

72-Ruben FL. Inactivated influenza virus vaccines in children. Clin Infect Dis. 2004;38:678-88.

73-Safety, efficacy, and effectiveness of live, attenuated, cold-adapted influenza vaccine in an indicated population aged 5-49 years.Belshe RB, Nichol KL, Black SB, Shinefield H, Cordova J, Walker R, Hessel C, Cho I, Mendelman PM. Clin Infect Dis. 2004 Oct 1;39(7):920-7. Epub 2004 Sep 7.

74-Salk, JE. Simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and corresponding antibody. J. Immunol., 49:87-98,1944.

75-Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? Beyer WE, Palache AM, Lüchters G, Nauta J, Osterhaus AD. Virus Res. 2004 Jul;103(1-2):125-32.

76-Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghwani J, Bhatt S, Peiris JS, Guan Y, Rambaut A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature. 2009 Jun 25;459(7250):1122-5.

77-Sociedade Brasileira de Imunizações (SBIM). 1 Série Ocupacional. Vacinação. Regional Rio de Janeiro (SBIm-RJ). 2008. http://www.sbim.org.br.

78-Succi RC, Farhat CK. Vaccination in special situations. J Pediatr (Rio J). 2006;82(3 Suppl):S91-100.

79-Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA. 2009 H1N1 influenza. Mayo Clin Proc. 2010 Jan;85(1):64-76. Epub 2009 Dec 10. Review.

80-Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, et al. Mortality associated whit influenza an respiratory syncytial virus in the United States. JAMA. 2003;289:179-86.

81-Treanor J, Glezen W, Reisinger K. Influenza: new options for prevention and treatmente. Infect Med 2002:19:66-71.

82-UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: December 2009 http://www.unaids.org.

83-Van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. J Clin Microbiol. 2001 Jan;39(1):196-200.

84-Vigano A, Bricalli D, Trabattoni D, Salvaggio A, Ruzzante S, Barbi M, Di Sanzo G, Principi N, Clerici M: Immunization whit both T cell-dependent and cell-independent vaccines augments HIV viral load secondarily to stimulation of tumor necrosis factor alpha. AIDS Res Hum Retroviruses 1998, 14(9):727-34.

85-Viganò A, Zuccotti GV, Pacei M, Erba P, Castelletti E, Giacomet V, Amendola A, Pariani E, Tanzi E, Clerici M. Humoral and cellular response to influenza vaccine in HIV-infected children with full viroimmunologic response to antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr. 2008 Jul 1;48(3):289-96.

86-Wigg MD. Vírus da Imunodeficiência Humana. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução à virologia humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 119-125.

87-World Health Organization. World now at the start of 2009 influenza pandemic.Jun11,2009.http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html.

88-Wright PT, Neumann G, Kawaoka K.Orthomyxoviruses. In: Fields BN, KnipeDM, Howley PM, editors. Virology. 5th Ed. Philadelphia , USA: Raven Pub; 2007. 1691-1732.

89-Zaccarelli-Filho CA, Ono E, Machado DM, Brunialti M, Succi RC, Salomão R, Kallás EG, de Moraes-Pinto MI. HIV-1-infected children on HAART: immunologic features of three different levels of viral suppression. Cytometry B Clin Cytom. 2007 Jan 15;72(1):14-21.

90-Zambon M. The pathogenesis of influenza in humans. Ver Med Virol 2001;11:227-241.

91-Zanetti AR, Amendola A, Besana S, Boschini A, Tanzi E. Safety and immunogenicity of influenza vaccination in individuals infected with HIV. Vaccine. 2002 Dec 20;20 Suppl 5:B29-32.