IVAN LEONARDO AVELINO FRANÇA E SILVA

**Imunogenicidade e segurança da vacina contra
influenza A H1N1/2009 em pacientes com doenças
reumáticas em uso de terapia anti-TNF alfa**

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

Programa: Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e Infeciosos

Orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Marli Christovam Sartori

São Paulo

2014

DEDICATÓRIA

À minha esposa Christine, pelo seu apoio incondicional, compreensão, carinho, amor, incentivo e principalmente por acreditar em nossas conquistas e me fazer feliz.

Às minhas filhas Gabriela e Sofia, por tornarem intensos todos os nossos momentos, por me motivarem todos os dias, me ensinarem a toda hora, me fazerem feliz a cada sorriso.

Aos meus pais, Ivan e Artêmia, por toda a dedicação, carinho, amor, apoio, e ensinamentos e por serem exemplos de retidão de caráter e de amor ao próximo.

Aos meus Irmãos Élio e Fábio pela amizade e por serem exemplos de dedicação e generosidade.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades e dádivas que tem me dado, a principal delas a de tentar ajudar aos meus semelhantes através da minha profissão e por poder sentir sua presença em todos os momentos de minha vida.

Ao meu orientador Professor Dr. Clovis Artur Almeida da Silva, pelo seu entusiasmo contagiante, sempre brilhante em sua vida acadêmica e pela sua generosidade em iluminar a todos a sua volta. Agradeço a oportunidade de aprender com a sua experiência, seus exemplos, sua visão crítica e vasto conhecimento científico, pela compreensão e paciência com as minhas dificuldades e pelo privilégio da sua amizade.

À Professora Dra. Ana Marli Christovam Sartori pelo seu exemplo e brilhantismo, pelas idéias e ideais, senso de coletividade, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo e por despertar em mim a paixão pelos benefícios da imunização.

À Professora Dra. Eloisa Bonfá, idealizadora do projeto temático do qual este estudo faz parte, e grande incentivadora do meu crescimento acadêmico. Pelas oportunidades na disciplina de Reumatologia,

orientações e apoio técnico em todas as fases da realização e conclusão deste trabalho.

À Professora Dra. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, por acreditar no meu trabalho e pelas oportunidades oferecidas na divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias e por todo o incentivo e empreendedorismo à frente grupo de infecção em imunodeprimidos.

À todos os assistentes, e colaboradores do Centro de Dispensação de Medicamentos de Alto Custo (CEDMAC) que contribuíram ativamente em diversas etapas deste projeto. Obrigado pelo acolhimento, pelas oportunidades e pelo espírito inovador que caracteriza este grupo.

Aos colegas Dra. Carla Goncalves Schain Saad, Dr. Julio Cesar Bertacine Moraes e em especial à Dra. Ana Cristina Medeiros Ribeiro e Dra. Nádia Emi Aikawa que colaboraram ativamente e entusiasticamente em todas as fases desse projeto, por toda a ajuda, ideias, ensinamentos e generosidade.

Ao Dr. Alexander Roberto Precioso por todo o apoio ao estudo, junto ao Instituto Butantan.

À Profa. Dra. Maria Akiko Ishida pelo apoio e colaboração junto ao Instituto Adolfo Lutz.

À Prof. Dra. Marta Heloísa Lopes e todos os colegas e colaboradores do CRIE – Centro de Referência para

Imunobiológicos Especiais do Hospital das Clínicas pela dedicação, apoio, colaboração.

Aos Colegas e amigos da MI em especial ao Dr. Karim Yaqub Ibrahon, Dra. Ho Yeh Li, Dra. Karina Takesaki Miyaji e Dra. Marjorie Vieira Batista pelas idéias, contribuições e incentivo ao trabalho.

Aos pacientes e seus familiares que tornaram possível este estudo.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	4
3 MÉTODO.....	6
3.1. População de Estudo.....	7
3.2. Pacientes.....	7
3.3. Controles Saudáveis.....	9
3.4. Vacina.....	9
3.5. Procedimentos do Estudo.....	10
3.6. Avaliação da Segurança Vacinal.....	10
3.7. Ensaios de Laboratório.....	11
3.8. Ensaio de Inibição da Hemaglutinação.....	12
3.9. Análise Estatística.....	12
4 RESULTADOS.....	14
4.1. Dados Demográficos.....	15
4.2. Padrão de Resposta à Imunização na Artrite Reumatoide.....	17
4.3. Padrão de Resposta à Imunização nas Espondiloartrites.....	18
4.4. Eventos Adversos.....	22
5 DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÕES.....	29
7 REFERÊNCIAS.....	31

ANEXOS

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE=	Antiinflamatório não hormonal
ANOVA=	<i>Analysis of variance</i>
AP=	Artrite psoriática
AR=	Artrite reumatoide
CAPPesq=	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
CDC=	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
DMARDs=	Drogas anti-reumáticas modificadoras de doença
EA=	Espondilite anquilosante
ESa=	Espondiloartrites
EULAR=	Liga Européia Contra o Reumatismo
FA=	Fator de aumento
FAPESP=	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
H1N1=	Influenza A
IC=	Intervalos de confiança
MGTs=	Média geométrica dos títulos
MTX=	Metotrexate
SC=	Soroconversão
SP=	Percentagens de soroprotecção

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados demográficos, distribuição e tratamento das doenças em pacientes que utilizaram terapia anti-TNF, utilizaram DMARDs e controles saudáveis antes da vacinação contra influenza A H1N1 pandêmica de 2009.....	16
Tabela 2-	Dados sorológicos antes e após a vacina contra influenza A H1N1 pandêmica 2009, em pacientes com artrite reumatóide (AR) e controles saudáveis.....	18
Tabela 3-	Dados sorológicos antes e após a vacina contra influenza A H1N1 pandêmica 2009 em pacientes com espondiloartrites (ESa) e controles saudáveis.....	20
Tabela 4-	Comparação dos dados demográficos e tratamentos atuais segundo a soroconversão da vacina Influenza A H1N1 pandêmica 2009 em pacientes com espondiloartrites (ESa).....	21
Tabela 5-	Eventos adversos à vacina contra influenza A H1N1 pandêmica 2009, em pacientes com artrite inflamatória em terapia com anti-TNF, utilizando DMARDs e controle saudável.....	23

RESUMO

França e Silva ILA. Imunogenicidade e segurança da vacina contra influenza A H1N1/2009 em pacientes com doenças reumáticas em uso de terapia anti-TNF alfa [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2014.

OBJETIVOS: Avaliar a imunogenicidade e a segurança a curto prazo da vacina H1N1 pandêmica em pacientes com artrite reumatóide (AR) e espondiloartrites [ESa – artrite psoriática (AP) e espondilite anquilosante (EA)] recebendo classes distintas de terapia anti-TNF, assim como comparação com pacientes que receberam drogas modificadoras de doenças reumáticas (DMARDs) e controles saudáveis.

MÉTODOS: Cento e vinte pacientes (AR, n=41; EA, n=57 e artrite psoriática - AP, n=22) em uso de agentes anti-TNF (monoclonal, n=94 e receptor solúvel, n=26) foram comparados com 116 pacientes com artrite inflamatórias em uso de DMARDs e 117 controles saudáveis. Soroproteção (SP), soroconversão (SC), médias geométricas dos títulos (MGTs), fator de aumento (FI) das MGT e eventos adversos foram avaliados 21 dias após a vacinação.

RESULTADOS: Após a imunização, as taxas de SC (58,2% vs 74,3%, $p=0,017$) foram significativamente menores nos pacientes com espondiloartrites que receberam a terapia anti-TNF, enquanto nenhuma diferença foi observada em pacientes com AR que recebem esta terapia, em comparação com controles saudáveis ($p=0,067$). Pacientes com espondiloartrites que receberam anticorpos monoclonais (infiximabe/adalimumabe) tiveram uma taxa de SC significativamente menor em comparação com controles saudáveis (51,6% vs. 74,3%, $p=0,002$) ou para aqueles em uso de DMARDs (51,6% vs. 74,7%, $p=0,005$), por sua vez não houve diferença para pacientes em uso de etanercepte (86,7% vs. 74,3%, $p=0,091$). Uma análise dos pacientes com espondiloartrites que apresentaram SC e os que não apresentaram SC revelou que o primeiro grupo teve maior média de idade ($p=0,003$), maior frequência de anti-TNF ($p=0,031$) e anticorpos monoclonais ($p=0,001$), e uma menor frequência de metotrexate ($p=0,028$). Na regressão logística multivariada, apenas a idade avançada ($p=0,015$) e tratamento anticorpos monoclonais ($p=0,023$) permaneceram fatores importantes para a não SC em pacientes com espondiloartrites.

CONCLUSÕES: Este estudo mostrou um padrão distinto da resposta imune à vacina contra a gripe pandêmica em pacientes com artrite inflamatória que receberam agentes anti-TNF, com uma imunogenicidade reduzida apenas em pacientes com espondiloartrites usando anticorpos monoclonais.

Descritores: Vacinas contra influenza; Segurança; Formação de anticorpos/Imunologia; Vírus da influenza A subtipo H1N1; Pandemias; Agentes biológicos; Doenças reumáticas; Fator de necrose tumoral alfa

SUMMARY

França e Silva ILA. Immunogenicity and safety of influenza A H1N1/2009 vaccine in rheumatic diseases patients under anti-TNF therapy [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

OBJECTIVES: To evaluate the immunogenicity of the anti-influenza A H1N1/2009 vaccine in rheumatoid arthritis (RA) and spondyloarthritis patients receiving distinct classes of anti-TNF agents compared with patients receiving DMARDs and healthy controls.

METHODS: One hundred and twenty patients (RA, n=41; ankylosing spondylitis - AS, n=57 and psoriatic arthritis - PsA, n=22) under anti-TNF agents (monoclonal, n=94 and soluble receptor, n=26) were compared to 116 inflammatory arthritis patients under DMARDs and 117 healthy controls. Seroprotection (SP), seroconversion (SC), geometric mean titre (GMT), factor increase (FI) in GMT and adverse events were evaluated 21 days after vaccination.

RESULTS: After immunisation, SC rates (58.2% vs. 74.3%, $p=0.017$) were significantly lower in spondyloarthritis patients receiving anti-TNF therapy, whereas no difference was observed in RA patients receiving this therapy compared to healthy controls ($p=0.067$). Spondyloarthritis patients receiving monoclonal antibodies (infliximab/adalimumab) had a significantly lower seroconversion rate compared to healthy controls (51.6% vs. 74.3%, $p=0.002$) or to those under DMARDs (51.6% vs. 74.7%, $p=0.005$), whereas no difference was observed for patients under etanercept (86.7% vs. 74.3%, $p=0.091$). Further analysis of non-seroconverting and seroconverting spondyloarthritis patients revealed that the former group had a higher mean age ($p=0.003$), a higher frequency of anti-TNF ($p=0.031$) and monoclonal antibodies ($p=0.001$), and a lower frequency of methotrexate ($p=0.028$). In multivariate logistic regression, only older age ($p=0.015$) and monoclonal antibodies treatment ($p=0.023$) remained significant factors for non-seroconversion in spondyloarthritis patients.

CONCLUSIONS: This study revealed a distinct disease pattern of immune response to the pandemic influenza vaccine in inflammatory arthritis patients receiving anti-TNF agents, illustrated by a reduced immunogenicity solely in spondyloarthritis patients using monoclonal antibodies.

Descriptors: Influenza vaccines; Safety; Antibody formation/immunology; Influenza A virus, H1N1 subtype; Pandemics; Biological factors; Rheumatic diseases; Tumor necrosis factor-alpha

1 INTRODUÇÃO

Pessoas que apresentam doenças reumáticas autoimunes que são tratados com medicamentos modificadores da doença reumática (DMARDs) [1-3] e agentes biológicos têm sabidamente maior risco de infecção [4]. Essa percepção foi particularmente relevante na recente pandemia de influenza A H1N1 em 2009, o que determinou uma alta frequência de hospitalização e de mortalidade neste grupo específico de pacientes [5].

Após a pandemia de gripe A H1N1/Califórnia/2009, a vacina foi produzida em grande escala por meio de programas de imunização [5,6], e a Liga Européia Contra o Reumatismo (EULAR) [4] e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) [5] ambos recomendaram fortemente que a vacinação contra influenza pandêmica inativada deveria ser indicada para os pacientes com doenças reumáticas autoimunes.

O nosso grupo recentemente avaliou a imunogenicidade e a segurança da vacina contra a gripe pandemia A H1N1 2009 sem adjuvante em 1664 pacientes com doenças reumáticas autoimunes e 234 controles saudáveis, evidenciando uma redução da resposta imune geral [7]. Observamos, também, que as taxas de soroconversão foram reduzidas na artrite reumatoide (AR) que receberam terapia com metotrexate e sem relação com atividade da doença [8]. Simultaneamente, foram publicados dois estudos com a vacina contra a influenza A H1N1 2009 pandêmica com adjuvante: um estudo associou aumento da idade em pacientes com doenças reumáticas autoimunes que usaram terapia DMARDs, mas não com os bloqueadores anti-TNF, e com baixa imunogenicidade vacinal [9]; o segundo estudo encontrou imunogenicidade reduzida em pacientes com AR

ou artrite psoriática (AP) e naqueles que estavam em uso de infliximabe ou leflunomida [10].

No entanto, o número limitado de indivíduos que receberam diferentes bloqueadores de TNF e a inclusão de diversas doenças podem dificultar a interpretação destes resultados, porque a resposta de anticorpos à vacina varia entre as doenças reumáticas autoimunes [7]. Além disso, a discriminação dos possíveis efeitos deletérios da terapia biológica sobre a resposta imune à vacina requer a avaliação de pacientes que utilizam unicamente DMARDs, devido ao uso generalizado e concomitante dessas drogas com a terapia biológica [11].

2 OBJETIVOS

-
1. Avaliar a imunogenicidade e a segurança em curto prazo da vacina contra a gripe A H1N1 pandêmica 2009 em pacientes com AR e espondiloartrites que receberam classes distintas de agentes anti-TNF em comparação com pacientes com as mesmas doenças que receberam DMARDs e controles saudáveis.
 2. Avaliar possível associação entre soroconversão e: dados demográficos, parâmetros pré-vacinais, doenças e tratamentos.

3.1. População de Estudo

Este estudo incluiu 120 pacientes com artrite inflamatória que receberam terapia anti-TNF e 116 pacientes que receberam DMARDs. Estes pacientes foram selecionados de uma população de pacientes com doenças reumáticas autoimunes vacinados e acompanhados em um único centro, em São Paulo, Brasil (Divisão de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), entre março 2010 e abril de 2010 [7].

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq)

Todos os pacientes e controles saudáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi também registrado no clinicaltrials.gov (NCT01151644). Esta pesquisa foi financiada pelos projetos temático e regular da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2009/51897-5 e 2010/10749-0, respectivamente).

3.2. Pacientes

Todos os pacientes preencheram os respectivos critérios de classificação diagnóstica para: AR [12], espondilite anquilosante (EA) [13], ou AP [14]. Estes pacientes foram inicialmente recrutados por carta para

participar da campanha de vacinação contra a influenza AH1N1/2009 do Ministério da Saúde no centro de imunização de nosso hospital. Amostra de sangue foi obtida de cada participante, imediatamente antes da vacinação e 21 dias após a vacinação.

O grupo anti-TNF foi composto de 41 pacientes com AR e 79 com espondiloartrites (EA n=57 e AP n=22). Os respectivos medicamentos anti-TNF e as doses no momento da vacinação foram: 54 receberam infliximabe (3-5 mg/kg/peso administrados em 2 e 6 semanas e após a cada 6-8 semanas), 40 receberam adalimumabe (40 mg a cada duas semanas) e 26 recebem etanercepte (50 mg por semana).

Além disto, foram também estudados 116 pacientes com artrite inflamatória (41 com AR, 53 com SA e 22 com APs) que usaram DMARDs tradicionais (metotrexate, leflonomida, cloroquina ou sulfassalazina) com distribuições similares de doença ($p>0,05$). Estes pacientes foram randomicamente selecionados do estudo original, que incluía uma população de 462 pacientes com artrite inflamatória [7].

Os critérios de exclusão foram:

1. Infecção prévia pelo vírus influenza A H1N1/2009, confirmada por sorologia.
2. Alergia a componentes vacinais ou a ovo.
3. Doença infecciosa aguda com febre acima de 38°C no momento da vacinação.
4. Síndrome de Guillain-Barré ou síndromes desmielinizantes.

5. Imunização com vacina de vírus vivo até 4 semanas antes, vacina de vírus vivo até 2 semanas ou vacina anti-influenza até 6 meses antes da inclusão neste estudo.
6. Hospitalização no momento da inclusão do estudo.
7. Transfusão com hemoderivados até 6 meses antes do estudo.
8. Incapacidade de completar o protocolo.

3.3. Controles Saudáveis

Cento e dezessete indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo que vieram ao centro a procura de vacinação, em resposta a uma Campanha Nacional de Saúde Pública, foram convidados a participar como grupo controle, com os mesmos critérios de exclusão. Estes indivíduos foram randomicamente selecionados a partir do estudo anteriormente descrito [7].

3.4. Vacina

A vacina contra influenza AH1N1, de vírus inativado e sem adjuvante foi produzido pelo Instituto Butantan/Sanofi Pasteur (São Paulo, Brasil). Esta vacina continha 15 µg do antígeno hemaglutinina equivalente à cepa

A/California/7/2009 (H1N1) (NYMC X-179A) do vírus influenza, fragmentada e inativada, sendo o vírus da vacina recombinante recomendado pela Organização Mundial de Saúde. A vacina foi preparada em ovos embrionados de galinha, com as mesmas técnicas padrão que são usados para a produção de vacinas inativadas sazonais trivalentes. Esta vacina foi preparada em frascos de 5 ml de multidose, com timerosal adicionado como conservante (45 µg/0,5ml dose).

3.5. Procedimentos do Estudo

Todos os indivíduos foram vacinados com a vacina contra a influenza pandêmica H1N1 (A/California/7/2009/Butantan Institute / Sanofi Pasteur). Uma única dose intramuscular (0,5 ml) de 15 mg foi administrada [7,8].

3.6. Avaliação da Segurança Vacinal

No dia da vacinação, os pacientes ou responsáveis receberam um diário pessoal de 21 dias contendo a seguinte lista pré-definida de eventos adversos: reações locais (prurido, dor, eritema e edema) e eventos adversos

sistêmicos (cefaléia, mialgia, artralgia, febre, diarreia, tosse, dor de garganta, rinorréia e congestão nasal).

Os participantes foram orientados a marcar "sim" ou "não" em cada um dos eventos adversos listados e a devolver os seus diários no segundo dia de avaliação (21 dias após a vacinação). Os eventos adversos que não constassem na lista também poderiam ser relatados. Todas as reações locais foram consideradas como relacionadas à vacina anti-influenza A H1N1/2009, enquanto os eventos adversos sistêmicos foram analisados pelos pesquisadores para determinar a sua causalidade. Eventos adversos graves foram definidos como aqueles que resultassem em hospitalização ou em óbito.

3.7. Ensaios de Laboratório

Amostras de sangue foram coletadas no início e três semanas após a vacinação e os soros foram armazenados a -70°C. As duas amostras de cada paciente ou controle foram testadas em paralelo e na mesma placa para todas as determinações de laboratório. A imunogenicidade da vacina contra o vírus H1N1 A/California/7/2009-like foi avaliada com o uso de um ensaio de inibição da hemaglutinação no Instituto Adolfo Lutz.

3.8. Ensaio de Inibição da Hemaglutinação

O antígeno do vírus da gripe utilizado neste estudo foi o H1N1 A/California/7/2009, fornecido pelo Instituto Butantan. Concentrações de vírus foram determinados por titulação do antígeno hemaglutinina e o ensaio de inibição da hemaglutinação foi realizado após a remoção dos inibidores inespecíficos do soro [15].

A resposta imune à vacinação anti-H1N1 foi avaliada pela determinação dos níveis de anticorpos por inibição da hemaglutinação. As percentagens de soroproteção (SP) ($\geq 1:40$) e soroconversão (SC) (título de pré-vacinação $<1:10$ e uma pós-vacinação HIA $\geq 1:40$ ou pré-vacinação títulos $\geq 1:10$ e um aumento ≥ 4 vezes após a vacinação), média geométrica dos títulos (MGTs) e fator de aumento (FA) das MGTs foram calculados.

3.9. Análise Estatística

Seleção de pacientes com artrite inflamatórias em uso de DMARDs e controles saudáveis foi randomicamente realizada usando *SPSS Statistics* versão 15.0 (SPSS Inc., Armonk, NY, USA). Intervalos de confiança (IC) de 95% foram calculados assumindo distribuições binomial para variáveis dicotômicas e uma distribuição log-normal para os títulos de inibição da

hemaglutinação. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher ou teste t de Student. As variáveis com distribuição normal ou anormal foram comparadas usando teste t ou teste de Wilcoxon, respectivamente. Quando comparações de variáveis contínuas foram realizadas entre mais que dois grupos, *one-way analysis of variance* (ANOVA) ou ANOVA Kruskal-Wallis foram aplicados. Um modelo de regressão logística múltipla foi obtido para analisar possíveis fatores que influenciaram a SC. Todos os testes foram bicaudados com um nível de significância de 0,05.

4.1. Dados Demográficos

Os pacientes com artrite inflamatória em uso de terapia anti-TNF e controles saudáveis tinham idades semelhantes ($45,1 \pm 11,8$ vs. $44,3 \pm 12,4$ anos, $p=0,61$), assim como também observado na comparação entre as idades dos pacientes com artrite inflamatória em uso de anti-TNF *versus* em uso de DMARDs ($45,1 \pm 11,8$ vs. $46,5 \pm 10,6$ anos, $p=0,44$).

A frequência do sexo feminino foi significativamente menor no grupo anti-TNF *versus* grupo controle saudável (50% vs. 68%, $p=0,0004$) e semelhante ao grupo DMARDs (50% vs. 55,7%, $p=0,43$). A média de duração da doença foi significativamente maior no grupo anti-TNF *versus* DMARDs ($18,4 \pm 10,1$ vs. $15,6 \pm 10,4$ anos, $p=0,02$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos, distribuição e tratamento das doenças em pacientes que utilizaram terapia anti-TNF, utilizaram DMARDs e controles saudáveis antes da vacinação contra influenza A H1N1 pandêmica de 2009.

Variáveis	Anti-TNF (n=120)	DMARDs (n=116)	Controles saudáveis (n=117)
Dados Demográficos			
Sexo feminino	60 (50)*	67 (55,7)**	79 (68)
Idade	45,1 ± 11,8	46,5 ± 10,6	44,3 ± 12,4
Duração da doença, anos	18,4 ± 10,1 [†]	15,6 ± 10,4	-
Doenças			
Artrite reumatóide	41 (34,2)	41 (35,3)	-
Espondiloartrites	79 (63,8)	75 (64,7)	-
Espondilite anquilosante	57 (47,5)	53 (45,7)	-
Artrite psoriática	22 (18,3)	22 (19,0)	-
Tratamento			
Anti-TNF			
Anticorpos monoclonais	94 (78,3)	-	-
Infliximabe	54 (45,0)	-	-
Adalimumabe	40 (33,3)	-	-
Receptor solúvel			
Etanercepte	26 (21,7)	-	-
Glicocorticosteróides	49 (40,8)	45 (38,8)	-
Dose atual, mg/dia	7,3 ± 3,2	9,6 ± 5,4	-
DMARDs			
Metotrexate	43 (35,8) [†]	62 (53,4)	-
Dose atual, mg/semana	18,4 ± 6,3	19,2 ± 5,1	-
Sulfassalazina	18 (15,0) [†]	46 (39,7)	-
Leflunomida	16 (13,3)	18 (15,5)	-
Cloroquina	11 (9,2)	18 (15,5)	-
Outras drogas			
Azatioprina	3 (2,5)	5 (4,3)	-
Ciclosporina	1 (0,8)	2 (1,7)	-
Micofenolato mofetil	0	2 (1,7)	-
AINH	36 (30,1)	41 (35,3)	-

Dados expressos em n (%) e média ± desvio padrão, DMARDs = drogas anti-reumáticas modificadoras de doença, AINE = antiinflamatório não hormonal, * p <0,05 (anti-TNF em comparação com controles saudáveis da mesma idade e selecionados aleatoriamente), ** p <0,05 (DMARDs em comparação com controles saudáveis selecionados aleatoriamente), † p <0,05 (anti-TNF em comparação com pacientes selecionados aleatoriamente em uso de DMARDs tradicionais).

Como esperado, as frequências da utilização de metotrexate (35,8% vs. 53,4%, $p=0,007$) e de sulfassalazina (15% vs. 39,7%, $p=0,0001$) foram significativamente menores nos pacientes em uso de terapia anti-TNF quando comparado ao grupo DMARDs. Não foram observadas diferenças nas frequências e nas doses atuais dos outros DMARDs, antiinflamatórios não hormonais e imunossupressores em ambos os grupos ($p>0,05$, Tabela 1).

4.2. Padrão de Resposta à Imunização na Artrite Reumatoide

Análises da resposta imune em pacientes com AR evidenciaram que antes da imunização, a taxa de SP e as MGTs foram semelhantes nos pacientes com AR que recebiam terapia anti-TNF, nos pacientes que recebiam DMARDs e no grupo de controles saudáveis ($p=0,05$). Após a imunização, as MGTs foram significativamente menores nos pacientes em uso de DMARDs ($p=0,011$) *versus* controles. Os pacientes em uso de metotrexate apresentaram uma redução significativa das MGTs ($p=0,006$), do FA das MGTs ($p=0,047$) e da SP ($p=0,018$) comparados ao grupo controle, enquanto que a redução na SC não atingiu significância estatística ($p=0,066$, Tabela 2).

Tabela 2 - Dados sorológicos antes e após a vacina contra influenza A H1N1 pandêmica 2009, em pacientes com artrite reumatóide (AR) e controles saudáveis.

Variáveis	Pré-vacinação		Pós-vacinação			
	MGTs	SP	MGTs	SP	FA	SC
Controles saudáveis (n=117)	9,1 (7,8-10,7)	11,1 (5,4-16,8)	107,6 (83,6-138,5)	78,6 (71,2-86,1)	11,8 (9,3-14,9)	74,3 (66,4-82,3)
AR DMARDs (n=41)	6,8 (5,7-8,1)	4,9 (1,7-11,5)	56,1* (36,6-86,0)	63,4 (48,7-78,2)	8,3 (5,4-12,7)	61,9 (47,2-76,6)
AR MTX (n=25)	6,8 (5,5-8,3)	0	43,5* (26,1-72,5)	56,0* (36,5-75,5)	6,4* (3,8-10,8)	56,0 (36,5-75,5)
AR anti-TNF (n=41)	7,4 (5,9-9,2)	7,3 (0,6-15,3)	66,4 (41,6-106,1)	65,9 (51,3-80,4)	9,0 (5,9-13,7)	65,9 (51,3-80,4)
Anticorpos monoclonais (n=30)	7,5 (5,7-9,9)	6,7 (0-15,6)	66,1 (36,1-120,8)	66,7 (49,8-83,5)	8,8 (5,1-15,1)	66,7 (49,8-83,5)
Etanercepte (n=11)	7,5 (5,1-10,5)	9,1 (7,9-26,1)	58,4 (30,1-113,2)	63,6 (35,2-92,1)	8,0 (4,6-13,9)	63,6 (35,2-92,1)

Os dados são expressos em % ou valores (intervalo de confiança de 95%), DMARDs = drogas anti-reumáticas modificadoras de doença, MTX = metotrexate, MGTs = médias geométricas dos títulos; SP = soroproteção; FA = fator de aumento das MGT após a vacinação; SC = soroconversão; * p < 0,05 (AR em uso de DMARDs, AR em uso de MTX ou AR em uso de anti-TNF em comparação com controles saudáveis selecionados aleatoriamente).

4.3. Padrão de Resposta à Imunização nas Espondiloartrites

Análises das resposta imune em pacientes com espondiloartrites antes da imunização evidenciaram taxas de SP semelhantes nos pacientes em uso de terapia anti-TNF, nos pacientes em uso de DMARDs e no grupo controle saudável (p>0,05). Após a imunização, a SC (p=0,018), SP (p=0,03), MGTs (p=0,005) e FA das MGTs (p=0,001) foram

significativamente menores nos pacientes em uso de anti-TNF quando comparados aos controles saudáveis. A comparação entre pacientes com espondiloartrites em uso de anti-TNF e em uso de DMARDs também revelou redução na SC ($p=0,031$), MGTs ($p=0,024$) e FA das MGTs ($p<0,001$) no primeiro grupo. Além disso, a SP também foi menor, mas não atingiu significância estatística ($p=0,053$, Tabela 3). Após a imunização, SC ($p=0,002$), SP ($p=0,006$) MGTs ($p=0,002$) e o FA das MGTs ($p<0,001$) foram significativamente menores nos pacientes com EA em uso de terapia com anticorpos monoclonais (adalimumabe ou infliximabe) *versus* controles saudáveis. Estes mesmos parâmetros também foram significativamente menores quando comparados aos pacientes em uso de DMARDs ($p=0,005$; $p=0,014$; $p=0,009$; $p=0,001$, respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados sorológicos antes e após a vacina contra influenza A H1N1 pandêmica 2009 em pacientes com espondiloartrites (ESa) e controles saudáveis.

Variáveis	Pré-vacinação		Pós-vacinação			
	MGTs	SP	MGTs	SP	FA	SC
Controles saudáveis (n=117)	9,1 (7,8-10,7)	11,1 (5,4-16,8)	107,6 (83,6-138,5)	78,6 (71,2-86,1)	11,8 (9,3-14,9)	74,3 (66,4-82,3)
ESa DMARDs (n=75)	7,6 (6,4-9,0)	6,7 (1,0-12,4)	107,5 (74,3-115,6)	78,7 (69,3-88,0)	14,2 (10,1-19,9)	74,7 (64,8-84,6)
ESa MTX (n=35)	8,2 (6,1-11,1)	8,6 (0-17,8)	176,7 (102,3-305,1)	88,6 (78,0-99,1)	21,5 (12,4-37,4)	80,0 (66,7-93,3)
ESa a-TNF (n=79)	9,2 (7,5-11,4)	11,4 (4,3-18,4)	57,3*†‡ (41,5-79,2)	64,6*† (53,9-75,2)	6,2*†‡ (4,6-8,3)	58,2*†‡ (47,3-69,2)
Anticorpos monoclonais (n=64)	9,0 (7,0-11,5)	14,1 (5,5-22,6)	50,2*†‡ (34,4-73,4)	59,4*†‡ (47,2-71,5)	5,6*†‡ (4,0-7,8)	51,6*†‡ (39,2-63,9)
Etanercepte (n=15)	10,5 (7,5-14,7)	0	100,8 (64,1-158,5)	86,7 (68,9-100,0)	9,6 (6,9-10,4)	86,7 (68,9-100,0)

Os dados são expressos em % ou valores (intervalo de confiança de 95%), DMARDs = drogas anti-reumáticas modificadoras de doença, MTX = metotrexate, MGT = médias geométricas dos títulos; SP = soroproteção; FA = fator de aumento das MGTs após a vacinação; SC = soroconversão; * p <0,05 (ESa em uso de DMARDs ou ESa em uso de anti-TNF em comparação com controles saudáveis selecionados aleatoriamente), † p <0,05 (ESa em uso de anti-TNF em comparação com pacientes com ESa selecionados aleatoriamente em uso de DMARDs), ‡ p <0,05 (ESa em uso de anti-TNF em comparação com pacientes com ESa em uso de MTX selecionados aleatoriamente).

Os dados demográficos, parâmetros pré-vacinais, doenças (EA e AP) e tratamento dos pacientes que não soroconverteram (n=52) *versus* os que soroconverteram (n=102) estão representados na Tabela 4. A média da idade atual foi significativamente maior no grupo de pacientes com espondiloartrites que não apresentaram soroconversão em comparação ao grupo que soroconverteu ($45,0 \pm 11,3$ vs. $41,5 \pm 10,3$ anos, $p=0,003$). As frequências de tratamento com anti-TNF ($p=0,031$) e tratamento com anticorpos monoclonais ($p=0,001$) foram significativamente maiores em

pacientes que não soroconverteram quando comparados aos que soroconverteram, enquanto a frequência do uso de metotrexate foi menor nos pacientes que não soroconverteram quando comparados aos que soroconverteram ($p=0,028$, Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação dos dados demográficos e tratamentos atuais segundo a soroconversão da vacina Influenza A H1N1 pandêmica 2009 em pacientes com espondiloartrites (ESa).

Variáveis	Sem soroconversão (n=52)	Com soroconversão (n=102)
Dados demográficos		
Sexo feminino	17 (32,7)	31 (30,4)
Idade atual, anos	45,0 $\pm$ 11,3 *	41,5 $\pm$ 10,3
Duração da doença, anos	20,8 $\pm$ 12,6	16,7 $\pm$ 9,4
Parâmetros pré-vacinais		
Soroproteção	6 (11,5)	8 (7,8)
Médias geométricas dos títulos	8,0 (IC 95% 6,0-10,6)	8,6 (IC 95% 7,4-10,0)
Doenças		
Espondilite anquilosante	35 (67,3)	75 (73,5)
Artrite psoriática	17 (32,7)	27 (26,5)
Tratamento		
Anti-TNF	33 (63,4) *	46 (49,7)
Anticorpos monoclonais	31 (59,6) *	33 (32,4)
Etanercepte	2 (3,8)	13 (12,7)
Glicocorticosteróides	8 (15,4)	15 (14,7)
Dose atual, mg/dia	9,1 $\pm$ 5,0	7,8 $\pm$ 4,1
DMARDs		
Metotrexate	13 (25,0) *	44 (43,1)
Dose atual, mg/semana	16,3 $\pm$ 3,6	18,3 $\pm$ 6,5
Sulfassalazina	17 (32,7)	42 (42,2)
Leflunomida	4 (7,7)	2 (2,0)

Os dados são expressos em n (%) e média $\pm$ desvio padrão, * $p < 0,05$ (comparação de pacientes com e sem soroconversão), IC = intervalo de confiança.

Regressões logísticas multivariadas foram realizadas incluindo variáveis com $p \leq 0,2$ [idade atual, MGTs pré vacinal, metotrexate, leflunomida, doenças (AP ou SA), anticorpos monoclonais e etanercepte] e revelaram que apenas idade avançada ($p=0,015$) e tratamento com

anticorpos monoclonais ($p=0,023$) permaneceram significantes para ausência de SC.

4.4. Eventos Adversos

Apenas reações sistêmicas leves foram observadas com maior frequência em pacientes em uso de terapia anti-TNF *versus* controles saudáveis: febre (8,3% vs. 0,9%, $p=0,01$), artralgia (12,5% vs. 4,3%, $p=0,03$) e congestão nasal (13,3% vs. 4,3% $p=0,014$). Não foram observadas diferenças nas frequências das reações adversas em pacientes do grupo anti-TNF *versus* grupo DMARDs ($p>0,05$, Tabela 5). Nenhum grupo apresentou evento adverso grave após 3 semanas de seguimento.

Tabela 5 - Eventos adversos à vacina contra influenza A H1N1 pandêmica 2009, em pacientes com artrite inflamatória em terapia com anti-TNF, utilizando DMARDs e controle saudável.

Variáveis	Anti-TNF (n=120)	DMARDs (n=116)	Controles saudáveis (n=117)
Reações locais	8 (6,7)	12 (10,3)	16 (13,7)
Dor	6 (5,0)	6 (7,9)	14 (12,0)
Vermelhidão	0 (0)	0 (0)	4 (3,4)
Edema	2 (1,7)	2 (1,8)	6 (5,1)
Prurido	1 (0,8)	2 (1,8)	1 (0,9)
Reações sistêmicas	43 (35,8)	33 (28,4)	32 (27,4)
Febre	10 (8,3) *	4 (3,5)	1 (0,9)
Tremores	10 (8,3)	9 (7,9)	3 (2,6)
Artralgia	15 (12,5) *	9 (7,9)	5 (4,3)
Cefaleia	19 (15,8)	18 (15,8)	17 (14,5)
Mialgia	14 (11,7)	19 (16,7)	14 (12)
Diarréia	5 (4,2)	6 (5,7)	10 (8,5)
Odinofagia	8 (6,7)	11 (9,6)	10 (8,5)
Tosse	12 (10)	12 (10,5)	5 (4,3)
Rinorreia	15 (12,5)	11 (9,6)	7 (6)
Congestão nasal	16 (13,3) *	12 (10,5)	5 (4,3)

Os dados são expressos em n (%), DMARDs = drogas anti-reumáticas modificadoras de doença, * p <0,05 (anti-TNF em comparação com controles saudáveis selecionados aleatoriamente).

Para o nosso conhecimento, este foi o estudo com maior população avaliando a resposta à vacina contra Influenza A H1N1 pandêmica em pacientes com artrites inflamatórias em uso de diferentes classes de anti-TNF e claramente mostrou imunogenicidade reduzida em pacientes com espondiloartrites em uso de anticorpos monoclonais.

A maior vantagem desse estudo foi a inclusão de dois grupos controles selecionados randomicamente. A ausência destes grupos controles, especialmente para o grupo anti-TNF nos dois estudos publicados anteriormente e que avaliaram a resposta imune à vacina contra influenza pandêmica, impediu previamente uma conclusão definitiva sobre a possível influência de outros DMARDs [9,10]. Além disso, a avaliação de pacientes com AR e espondiloartrites foi essencial no nosso estudo para definir mais precisamente a influência de um agente biológico na resposta imune à vacina, pois tem sido relatado um perfil distinto de imunogenicidade em diversas doenças reumatológicas [7]. Escolhemos a vacina sem adjuvante para evitar uma possível reativação da doença autoimune [16-18], ainda que estudos recentes têm reforçado a segurança da vacina H1N1 com adjuvante nas doenças reumatológicas [19]. Por outro lado, o curto período de observação pós vacinal é uma limitação do nosso estudo, pois não avaliou os eventos adversos a longo prazo [20]. Além disso, a influência da atividade da doença não foi incluída no nosso estudo e deve ser estudada em pesquisas futuras.

Agentes biológicos podem afetar a produção de anticorpos e a imunogenicidade da vacina [1,2]. No entanto, existem resultados

controversos sobre a resposta imune humoral após vacinação contra a gripe sazonal em pacientes com doença reumática autoimune. Alguns não mostraram influência [21-23], enquanto outros estudos evidenciaram imunogenicidade reduzida [24-27].

Em relação à vacina contra a gripe pandêmica, mostramos pela primeira vez uma resposta imune distinta não só entre os pacientes com AR e espondiloartrite, mas também entre os pacientes em uso de diferentes terapias anti-TNF. Nos pacientes com AR confirmamos a observação anterior que o metotrexate [8,9,27], mas não a terapia com agentes anti-TNF [8], teve um efeito deletério sobre a resposta à vacinação contra influenza.

A avaliação do grupo de pacientes com espondiloartrites permitiu também uma melhor definição dos efeitos dos anticorpos monoclonais sobre a resposta à vacina nesses pacientes. De fato, uso de anticorpos monoclonais anti-TNF parece predispor a um maior risco de infecção pelo vírus herpes zoster e tuberculose do que os bloqueadores solúveis de receptor TNF [28,29]. Estudos adicionais são necessários para determinar se as diferenças estruturais e funcionais entre os bloqueadores de TNF podem afetar a resposta de anticorpos à vacina em relação à: farmacocinética, interferência na ligação cruzada com o TNF transmembrana, avidéz da ligação, inibição da ativação celular e expressão de citocinas [28,30]. Além disso, a menor taxa de SC nos pacientes tratados com anticorpos monoclonais não foi relacionada com doses mais elevadas, pois apenas os pacientes em uso de doses e intervalos de administração conhecidos para cada terapia anti-TNF foram incluídos.

A SP pré-vacinação uniformemente baixa em todos os grupos e ausente em pacientes com espondiloartrite em uso de etanercepte pode refletir a possibilidade de adquirir uma imunização natural, uma vez que a vacina não estava disponível no ano anterior. No entanto, a imunogenicidade após a vacinação em pacientes com espondiloartrite em uso de etanercepte foi adequada. A persistência da resposta de anticorpos para o ano seguinte após a vacinação deverá ser priorizada em estudos futuros.

Apesar das idades semelhantes nos três grupos estudados (anti-TNF, DMARDs e controles saudáveis), uma análise mais aprofundada e confirmada pela análise multivariada dos pacientes com espondiloartrite que soroconverteram e os que não soroconverteram, mostrou que a idade influenciou a resposta imunológica à vacinação contra a gripe pandêmica [9, 31]. No entanto, a pequena diferença observada no presente estudo e dentro de uma faixa etária restrita, pode não ter relevância clínica, apesar da significância estatística.

A corticoterapia não parece influenciar na imunogenicidade em pacientes com artrites inflamatórias, como já evidenciado em pacientes com AR, EA [10] e lúpus eritematoso sistêmico [32] que receberam a vacina contra a gripe pandêmica. Em contraste, o uso atual de glicocorticóide [33] foi o principal fator associado à diminuição da imunogenicidade após a vacina contra influenza, em nossa população pediátrica com doenças reumatológicas autoimunes. Notadamente, o uso de DMARDs não foi um fator preditivo de uma resposta humoral reduzida em espondiloartrites, um padrão diferente do observado em pacientes com AR.

A vacina contra a influenza A (H1N1) foi segura em pacientes com artrite inflamatória que utilizaram terapias anti-TNF, com reações sistêmicas predominantemente leves. A curto prazo foram observados eventos adversos de menor gravidade, como relatado anteriormente em pacientes com doenças reumáticas autoimunes que receberam a vacina contra a influenza sazonal [21-25,27] e a vacina contra a influenza pandêmica [8,9,17-19,32,34,35].

O Comitê Europeu de Avaliação de Medicamentos para Uso Humano tem sugerido três critérios que devem ser atendidos para considerar uma adequada imogenicidade de uma vacina [36]: SP > 70%, SC > 40% e FA das MGTs > 2.5 [37]. Apesar de uma taxa de SC menor nos pacientes que receberam terapia anti-TNF, a maioria dos pacientes obteve uma resposta adequada, reforçando a recomendação desta vacina. No entanto, já foi demonstrado que uma segunda dose da vacina contra a gripe A pandêmica aumentou a imunogenicidade em pacientes com doenças reumáticas [9,17], indicando que uma dose de reforço da vacina pode melhorar a resposta em pacientes com espondiloartrites que utilizam anticorpos monoclonais.

Assim sendo, este estudo evidenciou um padrão de resposta imune distinto em pacientes com artrite inflamatória que receberam terapias anti-TNF, com imunogenicidade reduzida somente em pacientes com espondiloartrites em uso anticorpos monoclonais.

6 CONCLUSÕES

-
1. A imunogenicidade da vacina contra Influenza A H1N1 pandêmica foi reduzida nos pacientes com espondiloartrites em uso de terapia anti-TNF com anticorpos monoclonais. Eventos adversos sistêmicos leves e à curto prazo foram observados em pacientes que receberam terapia anti-TNF.
 2. Idade mais avançada e uso de terapia anti-TNF com anticorpos monoclonais resultaram em menor soroconversão.

7 REFERÊNCIAS

1. Silva CA, Terreri MT, Aikawa NE, et al. Vaccination practice in children with rheumatic disease. *Rev Bras Reumatol* 2010;50:351-61.
2. Rahier JF, Moutschen M, Van Gompel A, et al. Vaccinations in patients with immune-mediated inflammatory diseases. *Rheumatology* 2010;49:1815-27.
3. Furst DE. The risk of infections with biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:327-46.
4. Van Assen S, Agon-Levin N, Elkayam O, et al. EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2011;70:414-22.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). 2010. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr59e0729a1.htm> (19 March 2012, date last accessed).
6. Estratégia Nacional De Vacinação—Ministério Da Saúde—Brasil. [National vaccination strategy—The Ministry of Health—Brazil]. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ppt_gripe_final_com_faixa250210.pdf (19 March 2012, date last accessed).
7. Saad CG, Borba EF, Aikawa Ne, et al. Immunogenicity and safety of the 2009 non-adjuvanted influenza A/H1N1 vaccine in a large cohort of autoimmune rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1068-73.

-
8. Ribeiro AC, Guedes LK, Moraes JC, et al. Reduced seroprotection after pandemic H1N1 influenza adjuvant-free vaccination in patients with rheumatoid arthritis: implications for clinical practice. *Ann Rheum Dis* 2011;70:2144-47.
 9. Gabay C, Bel M, Combescure C, et al. Impact of synthetic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs on antibody responses to the AS03-adjuvanted pandemic influenza vaccine: a prospective, open-label, parallel-cohort, single-center study. *Arthritis Rheum* 2011;63:1486-96.
 10. Elkayam O, Amir S, Mendelson E, et al. Efficacy and safety of vaccination against pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus among patients with rheumatic diseases. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:1062-7.
 11. Haraoui B, Pope J. Treatment of early rheumatoid arthritis: concepts in management. *Semin Arthritis Rheum* 2011;40:371-88.
 12. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
 13. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984;27:361-8.
 14. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, et al. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006;54:2665-73.

-
15. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ, editors. Concepts and procedures from laboratory-based influenza surveillance. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1982.
 16. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun* 2011;36:4-8.
 17. Mathian A, Devilliers H, Krivine A, et al. Factors influencing the efficacy of two injections of a pandemic 2009 influenza A (H1N1) nonadjuvanted vaccine in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011;63:3502-11.
 18. Lu CC, Wang YC, Lai JH, et al. A/H1N1 influenza vaccination in patients with systemic lupus erythematosus. safety and immunity. *Vaccine* 2011;29:444-50.
 19. Urowitz MB, Anton A, Ibanez D, Gladman DD. Autoantibody response to adjuvant and nonadjuvant H1N1 vaccination in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:1517-20.
 20. Lertdumrongluk P, Changsirikulchai S, Limkunakul C, et al. Safety and immunogenicity of a 2009 influenza A (H1N1) vaccine in hemodialysis patients. *Vaccine* 2012;30:1108-14.
 21. Fomin I, Caspi D, Levy V, et al. Vaccination against influenza in rheumatoid arthritis: the effect of disease modifying drugs, including TNF alpha blockers. *Ann Rheum Dis* 2006;65:191-4.
 22. Kubota T, Nii T, Nanki T, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy does not diminish the immune response to influenza vaccine in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007;17:531-3.

23. Elkayam O, Bashkin A, Mandelboim M, et al. The effect of infliximab and timing of vaccination on the humoral response to influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:442-7.
24. Kapetanovic MC, Saxne T, Nilsson JA, Geborek P. Influenza vaccination as model for testing immune modulation induced by anti-TNF and methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 2007;46:608-11.
25. Gelinck LB, Van Der Bijl AE, Beyer WE, et al. The effect of anti-tumour necrosis factor alpha treatment on the antibody response to influenza vaccination. *Ann Rheum Dis* 2008;67:713-6.
26. Salemi S, Picchianti-Diamanti A, Germano V, et al. Influenza vaccine administration in rheumatoid arthritis patients under treatment with TNF alpha blockers: safety and immunogenicity. *Clin Immunol* 2010;134:113-20.
27. Kaine JL, Kivitz AJ, Birbara C, Luo AY. Immune responses following administration of influenza and pneumococcal vaccines to patients with rheumatoid arthritis receiving adalimumab. *J Rheumatol* 2007;34:272-9.
28. Strangfeld A, Listing J, Herzer P, et al. Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. *JAMA* 2009;301:737-44.
29. Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis* 2008;8:601-11.

-
30. Scallan B, Cai A, Solowski N, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:418-26.
 31. Young F, Marra F. A systematic review of intradermal influenza vaccines. *Vaccine* 2001;29:8788-801.
 32. Borba EF, Saad CG, Pasoto SG, et al. Antimalarials: a window of opportunity to improve the influenza A/H1N1 vaccine response in lupus patients under immunosuppressive agents. *Rheumatology* 2011;51:1061-9.
 33. Aikawa NE, Campos LM, Silva CA, et al. Glucocorticoid: major factor for reduced immunogenicity of 2009 influenza a (H1N1) vaccine in patients with juvenile autoimmune rheumatic disease. *J Rheumatol* 2012;39:167-73.
 34. Rahier JF, Papay P, Salleron J, et al. H1N1 vaccines in a large observational cohort of patients with inflammatory bowel disease treated with immunomodulators and biological therapy. *Gut* 2011;60:456-62.
 35. Crowe SR, Merrill JT, Vista E S, et al. Influenza vaccination responses in human systemic lupus erythematosus: impact of clinical and demographic features. *Arthritis Rheum* 2011;63:2396-406.
 36. European Committee for Medicinal Products for Human Use. London: European Medicines Agency; 2004. Guideline on dossier structure and content for pandemic influenza vaccine marketing authorisation application. Publication no. EMEA/CPMP/VEG/4717/2003-Rev.1.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/

[document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003869.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003869.pdf) (19

March 2012, date last accessed).

37. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry: clinical data needed to support the licensure of pandemic influenza vaccines. May 2007. <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm091985.pdf>.

Original article

TNF blockers show distinct patterns of immune response to the pandemic influenza A H1N1 vaccine in inflammatory arthritis patients

Ivan Leonardo Avelino França¹, Ana Cristina Medeiros Ribeiro², Nádia Emi Aikawa^{2,3}, Carla Gonçalves Schain Saad², Julio Cesar Bertacine Moraes², Cláudia Goldstein-Schainberg², Ieda Maria Magalhães Laurindo², Alexander Roberto Precioso⁴, Maria Akiko Ishida⁵, Ana Marli Christovam Sartori¹, Clovis Artur Silva^{2,3} and Eloisa Bonfa²

Abstract

Objective. To evaluate the immunogenicity of the anti-influenza A H1N1/2009 vaccine in RA and spondyloarthritis (SpA) patients receiving distinct classes of anti-TNF agents compared with patients receiving DMARDs and healthy controls.

Methods. One hundred and twenty patients (RA, $n=41$; AS, $n=57$; PsA, $n=22$) on anti-TNF agents (monoclonal, $n=94$; soluble receptor, $n=26$) were compared with 116 inflammatory arthritis patients under DMARDs and 117 healthy controls. Seroprotection, seroconversion (SC), geometric mean titre, factor increase in geometric mean titre and adverse events were evaluated 21 days after vaccination.

Results. After immunization, SC rates (58.2% vs 74.3%, $P=0.017$) were significantly lower in SpA patients receiving anti-TNF therapy, whereas no difference was observed in RA patients receiving this therapy compared with healthy controls ($P=0.067$). SpA patients receiving mAbs (infliximab/adalimumab) had a significantly lower SC rate compared with healthy controls (51.6% vs 74.3%, $P=0.002$) or those on DMARDs (51.6% vs 74.7%, $P=0.005$), whereas no difference was observed for patients on etanercept (86.7% vs 74.3%, $P=0.091$). Further analysis of non-seroconverting and seroconverting SpA patients revealed that the former group had a higher mean age ($P=0.003$), a higher frequency of anti-TNF ($P=0.031$) and mAbs ($P=0.001$) and a lower frequency of MTX ($P=0.028$). In multivariate logistic regression, only older age ($P=0.015$) and mAb treatment ($P=0.023$) remained significant factors for non-SC in SpA patients.

Conclusion. This study revealed a distinct disease pattern of immune response to the pandemic influenza vaccine in inflammatory arthritis patients receiving anti-TNF agents, illustrated by a reduced immunogenicity solely in SpA patients using mAbs.

Trial Registration: ClinicalTrials.gov, www.clinicaltrials.gov, NCT01151644.

Key words: vaccine, safety, immunogenicity, pandemic influenza A (H1N1), biologic agents, rheumatic disease, TNF blockers.

¹Division of Infectious Disease, ²Division of Rheumatology, ³Pediatric Rheumatology Unit, ⁴Instituto Butantan, and ⁵Instituto Adolfo Lutz, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Submitted 29 December 2011; revised version accepted 18 June 2012.

Correspondence to: Eloisa Bonfá, Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, n° 455, 3° andar, sala 3190, Cerqueira César São Paulo, 05403-010, São Paulo, Brazil. E-mail: ebonfa@lim17.fm.usp.br

*Clovis Artur Silva and Eloisa Bonfa contributed equally to this study.

Introduction

People suffering with autoimmune rheumatic diseases (ARDs) who are treated with DMARDs [1–3] and biologic agents are recognized to be at increased risk of infection [4]. This insight was particularly relevant for the recent 2009 influenza A H1N1 pandemic, which led to a high frequency of hospitalization and death in this particular group of patients [5].

After the H1N1 A/California/7/2009 influenza pandemic, the vaccine was largely produced through immunization programs [5, 6], and both the European League Against Rheumatism [4] and the Centers for Disease Control and Prevention [5] strongly recommended that inactivated pandemic influenza vaccination should be indicated for ARD patients.

We recently studied the immunogenicity and safety of a non-adjuvanted pandemic 2009 influenza A H1N1 vaccine in 1664 ARD patients and 234 healthy controls, showing an overall reduced immune response [7]. We also observed reduced seroconversion (SC) rates in RA patients linked to MTX therapy and unrelated to disease activity [8]. Simultaneously, two studies with an adjuvanted pandemic 2009 influenza A H1N1 vaccine were published: one associated increasing age with DMARD therapy but not with anti-TNF blockers, which were associated with a low antibody response in ARD patients [9]; the second study found reduced immunogenicity in patients with RA or PsA and those on infliximab or LEF [10].

However, the limited number of subjects receiving different TNF blockers and the inclusion of diverse diseases may hamper the interpretation of these study findings because vaccine antibody response varies among the rheumatic diseases [7]. Moreover, the discrimination of the possible deleterious effects of biologic therapy on the vaccine immune response requires an evaluation of patients solely on DMARDs due to the widespread concomitant use of these drugs with biologic therapy [11].

Therefore the objective of the present study was to evaluate the immunogenicity and short-term safety of the anti-pandemic 2009 influenza A H1N1 vaccine in RA and spondyloarthritis (SpA) receiving distinct classes of anti-TNF agents compared with patients receiving DMARDs and healthy controls.

Methods

This study included 120 inflammatory arthritis patients receiving anti-TNF therapy and 116 patients on DMARDs in a large ($n=1668$), prospective, rheumatic disease cohort conducted at a single site in São Paulo, Brazil (Rheumatology Division, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo), between March 2010 and April 2010, described in detail elsewhere [7]. The study was approved by the local Institutional Review Board (Comissão de Pesquisa e Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), and all participants signed the informed

consent. The trial was registered at clinicaltrials.gov under NCT01151644.

Patients

All patients fulfilled their respective disease classification criteria for RA [12], AS [13] or PsA [14]. Patients were initially invited by letter to participate in the public health influenza A H1N1/2009 vaccine campaign at the immunization centre of our hospital. Blood samples were obtained from each participant immediately before and 21 days after vaccination.

The anti-TNF group included 41 RA and 79 SpA patients (57 AS and 22 PsA). The anti-TNF agents and dosage at vaccination were as follows: 54 infliximab (3–5 mg/kg body weight at 2 and 6 weeks and thereafter as recommended, every 6–8 weeks), 40 adalimumab (40 mg every other week) and 26 etanercept (50 mg/week). In addition, 116 inflammatory arthritis (41 RA, 75 SpA, 53 AS and 22 PsA) patients on traditional DMARD therapy (MTX, LEF, chloroquine or SSZ) with similar disease distribution ($P > 0.05$) were randomly selected from the 462 inflammatory arthritis group patients of the large study [7].

Exclusion criteria were: previous known infection with pandemic 2009 influenza A H1N1, anaphylactic response to vaccine components or to eggs, acute infection resulting in a fever $>38^{\circ}\text{C}$ at the time of vaccination, history of Guillain-Barré syndrome or other demyelination syndromes, previous vaccination with any live vaccine 4 weeks before the study or any inactivated vaccine 2 weeks before the study, previous vaccination with a 2010 seasonal influenza vaccine, a blood transfusion within the past 6 months, less than 8 weeks of anti-TNF therapy, hospitalization or failure to complete the protocol.

Healthy controls

One hundred and seventeen healthy subjects who came to this centre seeking vaccination in response to a Public Health National Campaign were invited to participate under the same exclusion criteria; these subjects were randomly selected from 234 healthy controls from the large study [7].

Vaccine

The H1N1 vaccine, a novel, monovalent, non-adjuvanted, inactivated, split-virus vaccine was produced by Butantan Institute/Sanofi Pasteur (São Paulo, Brazil). The active substance is a split, inactivated influenza virus containing antigens equivalent to the A/California/7/2009 (H1N1) virus-like strain (NYMCx-179A), one of the candidate reassortant vaccine viruses recommended by the World Health Organization. The vaccine was prepared in embryonated chicken eggs with the same standard techniques that are used for the production of seasonal trivalent inactivated vaccines, and it was presented in 5-ml multi-dose vials, with thimerosal added as a preservative (45 $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$ dose).

Study procedures

All subjects were vaccinated with the pandemic 2009 influenza vaccine (A/California/7/2009/Butantan Institute/Sanofi Pasteur). A single i.m. dose (0.5 ml) of 15-µg haemagglutinin antigen, specific for the H1N1 A/California/7/2009-like virus, was administered [7, 8].

Safety assessments

A 21-day diary card was given to each participant at entry with 13 (Yes or No) established reactions. This card included local reactions (pain, redness, swelling and itching) and systemic adverse events, such as arthralgia, fever, headache, myalgia, sore throat, cough, diarrhoea, rhinorrhoea and nasal congestion. Participants were required to return their diary cards at the end of the follow-up period (21 days after vaccination). All local reactions were considered to be related to the H1N1 vaccine. Recorded symptoms were checked by the investigators to determine the causality of solicited systemic adverse events, and unsolicited adverse events were also assessed. Severe side effects were defined as those requiring hospitalization or leading to death.

Laboratory assays

Blood samples were collected at baseline and 3 weeks after vaccination, and sera were stored at -70°C . The two samples from each patient or control were tested in parallel in the same plate for all laboratory determinations. The immunogenicity of the H1N1 A/California/7/2009-like virus vaccine was evaluated with the use of a haemagglutination inhibition assay (HIA) at the Adolfo Lutz Institute.

HIA

The influenza virus antigen used in this study was the H1N1 A/California/7/2009, supplied by the Butantan Institute. Virus concentrations were determined by haemagglutinin antigen titration, and the HIA test was performed after removing naturally occurring, non-specific inhibitors from the sera, as previously described [15]. The H1N1 vaccination immune response was evaluated by determining the levels of antibodies by HIA. Anti-H1N1 titre was determined by influenza HIA. The percentages of seroprotection (SP) (titre $\geq 1:40$) and SC (pre-vaccination titre $< 1:10$ and a post-vaccination HIA titre $\geq 1:40$ or pre-vaccination titre $\geq 1:10$ and a ≥ 4 -fold increase post-vaccination), geometric mean titre (GMT) and the factor increase in GMT were calculated.

Statistical analysis

Selection of inflammatory arthritis patients on DMARDs and healthy controls was randomly carried out using SPSS Statistics v 15.0 (SPSS Inc., Armonk, NY, USA). Two-sided 95% CIs were calculated assuming binomial distributions for dichotomous variables and a log-normal distribution for HIA titres. Every subgroup had its HIA GMT calculated before vaccination and 21 days after vaccination. The factor increase in GMT (i.e. the ratio of the titre after vaccination to the titre before vaccination) was also obtained and log-transformed. Categorical variables were

compared by Fisher's exact test or the chi-squared test. Normally or non-normally distributed variables were compared using the *t*-test or Wilcoxon rank-sum test, respectively. When comparisons of continuous variables were performed among more than two groups, one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis ANOVA was used. Multiple logistic regression modelling was applied to analyse the interaction between demographic characteristics, pre-vaccination status, medications and SC. All tests were two-sided, with a 0.05 significance level.

Results

Demographic data and current treatment

Inflammatory arthritis patients on anti-TNF therapy and healthy controls were of similar current age (45.1 ± 11.8 vs 44.3 ± 12.4 years, $P=0.61$), a finding also observed for the comparison between inflammatory arthritis patients on anti-TNF and those on DMARDs (45.1 ± 11.8 vs 46.5 ± 10.6 years, $P=0.44$). The frequency of female gender was significantly lower in anti-TNF compared with controls (50% vs 68%, $P=0.0004$) and similar to DMARDs (50% vs 55.7%, $P=0.43$). Mean disease duration was significantly higher in anti-TNF vs DMARD patients (18.4 ± 10.1 vs 15.6 ± 10.4 , $P=0.02$) (Table 1).

As expected, the frequencies of MTX (35.8% vs 53.4%, $P=0.007$) and SSZ (15% vs 39.7%, $P=0.0001$) use were significantly lower in patients under anti-TNF therapy compared with the DMARD group. No differences were observed in the frequencies and current doses of the other DMARDs, NSAIDs and immunosuppressive drugs in both groups ($P > 0.05$; Table 1).

Immunization response pattern in RA

Analysis of the immune response in RA patients revealed that before immunization the SP rate and GMTs were comparable in RA patients receiving anti-TNF therapy, those receiving DMARDs and healthy controls ($P > 0.05$). After immunization, the GMTs were significantly lower in patients on DMARDs ($P=0.011$) compared with controls. Those using MTX showed a significant reduction in GMT ($P=0.006$), factor increase in GMT ($P=0.047$) and SP ($P=0.018$) compared with controls, whereas reduced SC did not reach statistical significance ($P=0.066$; Table 2). No differences in any parameters were evidenced in patients on mAbs and etanercept compared with healthy controls or those on DMARDs ($P > 0.05$; Table 2).

Immunization response pattern in SpA

Analysis of the immune response in SpA patients before immunization revealed comparable SP rates and GMTs in patients receiving anti-TNF therapy, those receiving DMARDs and healthy controls ($P > 0.05$). After immunization, SC ($P=0.018$), SP ($P=0.03$), GMT ($P=0.005$) and factor increase in GMT ($P=0.001$) were significantly lower in patients receiving anti-TNF therapy compared with healthy controls. The comparison of SpA patients receiving anti-TNF with those receiving DMARDs also

TABLE 1 Demographic data, disease distribution and treatment in patients on anti-TNF therapy, patients on DMARDs and healthy controls before pandemic 2009 influenza A H1N1 vaccination

Variable	Anti-TNF (n = 120)	DMARDs (n = 116)	Healthy controls (n = 117)
Demographic data			
Female gender	60 (50)*	67 (55.7)**	79 (68)
Current age, years	45.1 ± 11.8	46.5 ± 10.6	44.3 ± 12.4
Disease duration, years	18.4 ± 10.1***	15.6 ± 10.4	–
Diseases			
RA	41 (34.2)	41 (35.3)	–
SpA	79 (63.8)	75 (64.7)	–
AS	57 (47.5)	53 (45.7)	–
PsA	22 (18.3)	22 (19.0)	–
Treatment			
Anti-TNF			
mAbs	94 (78.3)	–	–
Infliximab	54 (45.0)	–	–
Adalimumab	40 (33.3)	–	–
Soluble receptor			
Etanercept	26 (21.7)	–	–
Glucocorticosteroid	49 (40.8)	45 (38.8)	–
Current dose, mg/day	7.3 ± 3.2	9.6 ± 5.4	–
DMARDs			
MTX	43 (35.8)***	62 (53.4)	–
Current dose, mg/week	18.4 ± 6.3	19.2 ± 5.1	–
SSZ	18 (15.0)***	46 (39.7)	–
LEF	16 (13.3)	18 (15.5)	–
Chloroquine	11 (9.2)	18 (15.5)	–
Other drugs			
AZA	3 (2.5)	5 (4.3)	–
Ciclosporin	1 (0.8)	2 (1.7)	–
MMF	0	2 (1.7)	–
NSAID	36 (30.1)	41 (35.3)	–

Data are expressed as *n* (%) or mean (s.d.). **P* < 0.05 (anti-TNF compared with age-matched randomly selected healthy controls), ***P* < 0.05 (DMARDs compared with randomly selected healthy controls), ****P* < 0.05 (anti-TNF compared with randomly selected patients on traditional DMARDs).

revealed reduced SC (*P* = 0.031), GMT (*P* = 0.024) and factor increase in GMT (*P* < 0.001) in the former group. In addition, SP was also reduced but did not reach statistical significance (*P* = 0.053; Table 3). After immunization, the SC (*P* = 0.002), SP (*P* = 0.006), GMT (*P* = 0.002) and factor increase in GMT (*P* < 0.001) were significantly lower in SpA patients on mAb therapies (adalimumab or infliximab) compared with healthy controls. These same parameters were also significantly lower compared with those of patients receiving DMARDs (*P* = 0.005; *P* = 0.014; *P* = 0.009; *P* < 0.001, respectively) (Table 3).

Demographic data, pre-vaccination parameters, diseases (AS and PsA) and treatment of non-seroconverted (*n* = 52) vs seroconverted (*n* = 102) patients are illustrated in Table 4. The mean current age was significantly higher in non-seroconverted SpA patients compared with those who seroconverted (45.0 ± 11.3 vs 41.5 ± 10.3 years, *P* = 0.003). The frequency of anti-TNF (*P* = 0.031) and mAbs (*P* = 0.001) was significantly higher in patients who did not seroconvert compared with those who seroconverted, whereas the frequency of MTX use was lower in patients who did not seroconvert compared with those who seroconverted (*P* = 0.028; Table 4).

Multivariate logistic regressions were performed, including variables with *P* ≤ 0.2 [current age, pre-vaccination GMT, MTX, LEF, disease (PsA or AS), mAbs and etanercept] and revealed that only older age (*P* = 0.015) and mAb treatment (*P* = 0.023) remained significant for non-SC.

Adverse events

Only mild systemic reactions were more often observed in patients on anti-TNF compared with healthy controls: fever (8.3% vs 0.9%, *P* = 0.01), arthralgia (12.5% vs 4.3%, *P* = 0.03) and nasal congestion (13.3% vs 4.3%, *P* = 0.014). No differences were observed in the frequency of adverse events in patients on anti-TNF compared with the DMARDs group (*P* > 0.05; Table 5). No severe adverse event was reported in any group after 3 weeks of follow-up.

Discussion

To our knowledge, this study was the largest analysis in inflammatory arthritis patients on distinct anti-TNF

TABLE 2 Serological data before and after pandemic 2009 influenza A H1N1 vaccine in RA patients and healthy controls

Variable	Pre-vaccination		Post-vaccination		FI	SC
	GMT	SP	GMT	SP		
Healthy controls (n = 117)	9.1 (7.8, 10.7)	11.1 (5.4, 16.8)	107.6 (83.6, 138.5)	78.6 (71.2, 86.1)	11.8 (9.3, 14.9)	74.3 (66.4, 82.3)
RA DMARD (n = 41)	6.8 (5.7, 8.1)	4.9 (1.7, 11.5)	56.1 (36.6, 86.0)*	63.4 (48.7, 78.2)	8.3 (5.4, 12.7)	61.9 (47.2, 76.6)
RA MTX (n = 25)	6.8 (5.5, 8.3)	0	43.5 (26.1, 72.5)*	56.0 (36.5, 75.5)*	6.4 (3.8, 10.8)*	56.0 (36.5, 75.5)
RA anti-TNF (n = 41)	7.4 (5.9, 9.2)	7.3 (0.6, 15.3)	66.4 (41.6, 106.1)	65.9 (51.3, 80.4)	9.0 (5.9, 13.7)	65.9 (51.3, 80.4)
mAbs (n = 30)	7.5 (5.7, 9.9)	6.7 (0, 15.6)	66.1 (36.1, 120.8)	66.7 (49.8, 83.5)	8.8 (5.1, 15.1)	66.7 (49.8, 83.5)
Etanercept (n = 11)	7.3 (5.1, 10.5)	9.1 (7.9, 26.1)	58.4 (30.1, 113.2)	63.6 (35.2, 92.1)	8.0 (4.6, 13.9)	63.6 (35.2, 92.1)

Data are expressed as percentage or value (95% CI). * $P < 0.05$ (RA DMARDs, RA MTX or RA anti-TNF compared with randomly selected healthy controls). FI: factor increase in GMT.

TABLE 3 Serological data before and after pandemic 2009 influenza A H1N1 vaccine in SpA patients and healthy controls

Variable	Pre-vaccination		Post-vaccination		FI	SC
	GMT	SP	GMT	SP		
Healthy controls (n = 117)	9.1 (7.8, 10.7)	11.1 (5.4, 16.8)	107.6 (83.6, 138.5)	78.6 (71.2, 86.1)	11.8 (9.3, 14.9)	74.3 (66.4, 82.3)
SpA DMARD (n = 75)	7.6 (6.4, 9.0)	6.7 (1.0, 12.4)	107.5 (74.3, 115.6)	78.7 (69.3, 88.0)	14.2 (10.1, 19.9)	74.7 (64.8, 84.6)
SpA MTX (n = 35)	8.2 (6.1, 11.1)	8.6 (0, 17.8)	176.7 (102.3, 305.1)	88.6 (78.0, 99.1)	21.5 (12.4, 37.4)	80.0 (66.7, 93.3)
SpA a-TNF (n = 79)	9.2 (7.5, 11.4)	11.4 (4.3, 18.4)	57.3 (41.5, 79.2)*****	64.6 (53.9, 75.2)*****	6.2 (4.6, 8.3)*****	58.2 (47.3, 69.2)*****
mAbs (n = 64)	9.0 (7.0, 11.5)	14.1 (5.5, 22.6)	50.2 (34.4, 73.4)*****	59.4 (47.2, 71.5)*****	5.6 (4.0, 7.8)*****	51.6 (39.2, 63.9)*****
Etanercept (n = 15)	10.5 (7.5, 14.7)	0	100.8 (64.1, 158.5)	86.7 (68.9, 100.0)	9.6 (6.9, 10.4)	86.7 (68.9, 100.0)

Data are expressed as percentage or value (95% CI). * $P < 0.05$ (SpA DMARDs or SpA anti-TNF compared with randomly selected healthy controls), ** $P < 0.05$ (SpA anti-TNF compared with randomly selected SpA patients on DMARDs), *** $P < 0.05$ (SpA anti-TNF compared with randomly selected SpA patients on MTX). FI: factor increase in GMT.

classes, and clearly showed reduced immunogenicity in SpA patients on mAb therapies.

The major strength of this study was the inclusion of two randomly selected control groups. The absence of these control groups, specifically for the anti-TNF group, in the two previous studies evaluating pandemic influenza vaccine immune response precludes a definitive conclusion about the possible influence of other DMARDs [9, 10]. In addition, the separate evaluation of RA and SpA was an essential parameter to define more precisely the influence of a biologic agent on the immune response because a diverse pandemic vaccine immunogenicity profile in distinct autoimmune rheumatic diseases has been reported [7]. Moreover, the use of non-adjuvant vaccine was chosen to avoid autoimmune disease [16–18], although recent studies have reinforced the safety of adjuvanted influenza vaccine in rheumatic diseases [19]. On the other hand, the short observation period of the present study is a limitation and does not exclude long-term adverse events [20]. Furthermore, the influence of disease activity was not evaluated herein and must be clarified in future studies.

Biologic drugs may affect antibody production and vaccine immunogenicity [1, 2]. There are, however, controversial results regarding the humoral immune response after seasonal influenza immunization in patients with autoimmune rheumatic disease with either unaffected [21–23] or reduced immunogenicity [24–27].

Concerning the pandemic influenza vaccine, we have shown for the first time a distinctive immune response not only among RA and SpA patients but also between different anti-TNF agents. We have confirmed a previous observation that MTX [8, 9, 27] but not TNF blockage [8] therapy had a deleterious effect on influenza vaccination in RA patients.

The separate evaluation of the SpA group allowed for a more accurate definition of the effects of anti-TNF mAbs on the vaccine response in these diseases. In fact, mAbs seem to incur a higher risk for herpes zoster virus infection and tuberculosis than do soluble receptor TNF blockers [28, 29]. Additional studies are necessary to determine whether reported structural and functional differences among TNF blockers regarding pharmacokinetics, ability to cross-link transmembrane TNF, binding avidity and

TABLE 4 Comparison of pandemic 2009 influenza A H1N1 vaccine non-seroconverter SpA patients and seroconverters

Variable	Non-seroconverters (n = 52)	Seroconverters (n = 102)
Demographic data		
Female gender	17 (32.7)	31 (30.4)
Current age, years	45.0 ± 11.3*	41.5 ± 10.3
Disease duration, years	20.8 ± 12.6	16.7 ± 9.4
Pre-vaccination parameters		
SP	6 (11.5)	8 (7.8)
GMT	8.0 (95% CI 6.0, 10.6)	8.6 (95% CI 7.4, 10.0)
Diseases		
AS	35 (67.3)	75 (73.5)
PsA	17 (32.7)	27 (26.5)
Treatment		
Anti-TNF		
mAbs	33 (63.4)*	46 (49.7)
Etanercept	31 (59.6)*	33 (32.4)
Etanercept	2 (3.8)	13 (12.7)
Glucocorticosteroid	8 (15.4)	15 (14.7)
Current dose, mg/day	9.1 ± 5.0	7.8 ± 4.1
DMARDs		
MTX	13 (25.0)*	44 (43.1)
Current dose, mg/week	16.3 ± 3.6	18.3 ± 6.5
SSZ	17 (32.7)	42 (42.2)
LEF	4 (7.7)	2 (2.0)

Data are expressed as *n* (%) and mean (s.d.). **P* < 0.05 (non-seroconverters compared with seroconverters).

TABLE 5 Adverse events of pandemic 2009 influenza A vaccine in inflammatory arthritis patients on anti-TNF therapy, patients on DMARDs and healthy controls

Variable	Anti-TNF (n = 120)	DMARDs (n = 116)	Healthy controls (n = 117)
Local reactions	8 (6.7)	12 (10.3)	16 (13.7)
Pain	6 (5.0)	6 (7.9)	14 (12.0)
Redness	0 (0)	0 (0)	4 (3.4)
Swelling	2 (1.7)	2 (1.8)	6 (5.1)
Itching	1 (0.8)	2 (1.8)	1 (0.9)
Systemic reactions	43 (35.8)	33 (28.4)	32 (27.4)
Fever	10 (8.3)*	4 (3.5)	1 (0.9)
Tremor	10 (8.3)	9 (7.9)	3 (2.6)
Arthralgia	15 (12.5)*	9 (7.9)	5 (4.3)
Headache	19 (15.8)	18 (15.8)	17 (14.5)
Myalgia	14 (11.7)	19 (16.7)	14 (12)
Diarrhoea	5 (4.2)	6 (5.7)	10 (8.5)
Sore throat	8 (6.7)	11 (9.6)	10 (8.5)
Cough	12 (10)	12 (10.5)	5 (4.3)
Rhinorrhoea	15 (12.5)	11 (9.6)	7 (6)
Nasal congestion	16 (13.3)*	12 (10.5)	5 (4.3)

Data are expressed as *n* (%). **P* < 0.05 (anti-TNF compared with randomly selected healthy controls).

inhibition of cell activation and cytokine expression could ultimately affect vaccine antibody response [28, 30]. Moreover, the lower SC rate in patients treated with mAbs was not related to higher doses because only patients with the recommended standard dosage and interval for each TNF antagonist were included.

The uniformly low pre-vaccine SP in all groups, and absence in SpA patients under etanercept, may reflect the chance of acquiring a natural immunization, since the vaccine was not available in the previous year. However, post-vaccination immunogenicity in SpA patients on etanercept was adequate. The persistence of this antibody response for the next year needs to be evaluated in further studies.

Despite the similar ages in the three groups (anti-TNF, DMARDs and healthy controls), further analysis of non-seroconverting and seroconverting SpA patients confirmed on multivariate analysis that age influenced the pandemic influenza vaccination immune response [9, 31]. However, the small difference observed in the present study within a restricted age bracket may have no clinical relevance, despite the statistical significance.

Glucocorticoid therapy did not seem to influence immunogenicity in inflammatory arthritis patients, as also evidenced in RA and AS [10] and in SLE patients [32] who received the pandemic influenza vaccine. In contrast, current glucocorticoid [33] use was the major factor associated with decreased antibody production in a paediatric rheumatic disease population. Remarkably, the use of

DMARDs was not a predictive factor for a reduced humoral response in SpA, a pattern different from that observed in RA patients.

Of note, the influenza A (H1N1) vaccine was safe in inflammatory arthritis patients on anti-TNF therapies with predominantly mild systemic reactions. No serious short-term adverse event was observed, a finding reported previously in autoimmune rheumatic patients who received the seasonal influenza [21–25, 27] and pandemic vaccines [8, 9, 17–19, 32, 34, 35].

The European Committee for Medicinal Products for Human Use has suggested that all three criteria for vaccine immunogenicity should be met for pandemic vaccines [36]: SP >70%, SC >40% and factor increase in GMT >2.5 [37]. Despite a lower SC rate in patients receiving anti-TNF drugs, the majority achieved an adequate response, supporting the recommendation of this vaccine. Nevertheless, the second pandemic influenza A vaccination injection increased the immunogenicity of the rheumatic diseases [9, 17], supporting the notion that a booster may improve vaccine response in SpA patients on anti-TNF mAb therapy. In conclusion, this study revealed a distinct disease pattern of immune response in inflammatory arthritis patients receiving anti-TNF agents, with reduced immunogenicity solely in SpA patients using mAbs.

Rheumatology key messages

- Older age and anti-TNF mAbs reduced immunogenicity to pandemic 2009 influenza A H1N1 vaccine in SpA patients.
- Short-term safety after pandemic influenza vaccination was observed in inflammatory arthritis patients on anti-TNF treatment.

Funding: This study was sponsored by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2009/51897-5 and 2010/10749-0 to E.B.), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ 302724/2011-7 to C.A.S. and 301411/2009-3 to E.B.), the Federico Foundation (to C.A.S. and E.B.) and the Butantan Foundation.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

References

- 1 Silva CA, Terreri MT, Aikawa NE *et al.* Vaccination practice in children with rheumatic disease. *Rev Bras Reumatol* 2010;50:351–61.
- 2 Rahier JF, Moutschen M, Van Gompel A *et al.* Vaccinations in patients with immune-mediated inflammatory diseases. *Rheumatology* 2010;49:1815–27.
- 3 Furst DE. The risk of infections with biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:327–46.
- 4 Van Assen S, Agon-Levin N, Elkayam O *et al.* EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2011;70:414–22.
- 5 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr59e0729a1.htm> (19 March 2012, date last accessed).
- 6 Estratégia Nacional De Vacinação—Ministério Da Saúde—Brasil [National vaccination strategy—The Ministry of Health—Brazil]. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ppt_gripe_final_com_faixa250210.pdf (19 March 2012, date last accessed).
- 7 Saad CG, Borba EF, Aikawa NE *et al.* Immunogenicity and safety of the 2009 non-adjuvanted influenza A/H1N1 vaccine in a large cohort of autoimmune rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1068–73.
- 8 Ribeiro AC, Guedes LK, Moraes JC *et al.* Reduced seroprotection after pandemic H1N1 influenza adjuvant-free vaccination in patients with rheumatoid arthritis: implications for clinical practice. *Ann Rheum Dis* 2011;70:2144–47.
- 9 Gabay C, Bel M, Combescore C *et al.* Impact of synthetic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs on antibody responses to the AS03-adjuvanted pandemic influenza vaccine: a prospective, open-label, parallel-cohort, single-center study. *Arthritis Rheum* 2011;63:1486–96.
- 10 Elkayam O, Amir S, Mendelson E *et al.* Efficacy and safety of vaccination against pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus among patients with rheumatic diseases. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:1062–7.
- 11 Haraoui B, Pope J. Treatment of early rheumatoid arthritis: concepts in management. *Semin Arthritis Rheum* 2011;40:371–88.
- 12 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
- 13 van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984;27:361–8.
- 14 Taylor W, Gladman D, Helliwell P *et al.* Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006;54:2665–73.
- 15 Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ, eds., Concepts and procedures from laboratory-based influenza surveillance. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1982.
- 16 Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun* 2011;36:4–8.
- 17 Mathian A, Devilliers H, Krivine A *et al.* Factors influencing the efficacy of two injections of a pandemic 2009 influenza A (H1N1) nonadjuvanted vaccine in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011;63:3502–11.
- 18 Lu CC, Wang YC, Lai JH *et al.* A/H1N1 influenza vaccination in patients with systemic lupus erythematosus. safety and immunity. *Vaccine* 2011;29:444–50.

- 19 Urowitz MB, Anton A, Ibanez D, Gladman DD. Autoantibody response to adjuvant and nonadjuvant H1N1 vaccination in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:1517–20.
- 20 Lertdumrongluk P, Changsirikulchai S, Limkunakul C *et al.* Safety and immunogenicity of a 2009 influenza A (H1N1) vaccine in hemodialysis patients. *Vaccine* 2012;30: 1108–14.
- 21 Fomin I, Caspi D, Levy V *et al.* Vaccination against influenza in rheumatoid arthritis: the effect of disease modifying drugs, including TNF alpha blockers. *Ann Rheum Dis* 2006;65:191–4.
- 22 Kubota T, Nii T, Nanki T *et al.* Anti-tumor necrosis factor therapy does not diminish the immune response to influenza vaccine in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007;17:531–3.
- 23 Elkayam O, Bashkin A, Mandelboim M *et al.* The effect of infliximab and timing of vaccination on the humoral response to influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:442–7.
- 24 Kapetanovic MC, Saxne T, Nilsson JA, Geborek P. Influenza vaccination as model for testing immune modulation induced by anti-TNF and methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 2007; 46:608–11.
- 25 Gelinck LB, Van Der Bijl AE, Beyer WE *et al.* The effect of anti-tumour necrosis factor alpha treatment on the antibody response to influenza vaccination. *Ann Rheum Dis* 2008;67:713–6.
- 26 Salemi S, Picchianti-Diamanti A, Germano V *et al.* Influenza vaccine administration in rheumatoid arthritis patients under treatment with TNF alpha blockers: safety and immunogenicity. *Clin Immunol* 2010;134: 113–20.
- 27 Kaine JL, Kivitz AJ, Birbara C, Luo AY. Immune responses following administration of influenza and pneumococcal vaccines to patients with rheumatoid arthritis receiving adalimumab. *J Rheumatol* 2007;34:272–9.
- 28 Strangfeld A, Listing J, Herzer P *et al.* Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. *JAMA* 2009;301:737–44.
- 29 Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis* 2008;8: 601–11.
- 30 Scallon B, Cai A, Solowski N *et al.* Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301: 418–26.
- 31 Young F, Marra F. A systematic review of intradermal influenza vaccines. *Vaccine* 2001;29:8788–801.
- 32 Borba EF, Saad CG, Pasoto SG *et al.* Antimalarials: a window of opportunity to improve the influenza A/H1N1 vaccine response in lupus patients under immunosuppressive agents. *Rheumatology* 2011;51: 1061–9.
- 33 Aikawa NE, Campos LM, Silva CA *et al.* Glucocorticoid: major factor for reduced immunogenicity of 2009 influenza a (H1N1) vaccine in patients with juvenile autoimmune rheumatic disease. *J Rheumatol* 2012;39:167–73.
- 34 Rahier JF, Papay P, Salleron J *et al.* H1N1 vaccines in a large observational cohort of patients with inflammatory bowel disease treated with immunomodulators and biological therapy. *Gut* 2011;60:456–62.
- 35 Crowe SR, Merrill JT, Vista E S *et al.* Influenza vaccination responses in human systemic lupus erythematosus: impact of clinical and demographic features. *Arthritis Rheum* 2011;63:2396–406.
- 36 European Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on dossier structure and content for pandemic influenza vaccine marketing authorisation application. London: European Medicines Agency, 2004. Publication no. EMEA/CPMP/VEG/4717/2003-Rev.1. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003869.pdf (19 March 2012, date last accessed).
- 37 Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry: clinical data needed to support the licensure of pandemic influenza vaccines. May 2007. <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm091985.pdf>.