

VANESSA RAMOS GUISSA

**Imunogenicidade e segurança da vacina contra influenza
A H1N1/2009 em pacientes com dermatomiosite juvenil**

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

Programa de Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Guisa, Vanessa Ramos

Imunogenicidade e segurança da vacina contra influenza A H1N1/2009 em
pacientes com dermatomiosite juvenil / Vanessa Ramos Guissa. -- São Paulo,
2013.

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

Orientador: Clovis Artur Almeida da Silva.

Descritores: 1.Vírus da influenza A subtipo H1N1 2.Dermatomiosite
3.Vacinação 4.Criança 5.Adolescente 6.Imunidade humoral

USP/FM/DBD-234/13

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração,
dedicar-se a ele.”

Buda

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minha eterna gratidão pelo dom da criação, da doação e do amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e familiares, que tornaram possível este estudo.

Ao meu marido Luiz Guilherme, fonte repleta de amor, amizade, generosidade e tolerância.

Ao Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva, a quem tenho admiração e gratidão. Obrigada pelo acolhimento familiar na Reumatologia Pediátrica do Instituto da Criança, pela orientação, amizade, ensinamentos, incentivo aos estudos e realização deste projeto.

À Profa. Eloisa Bonfá, pela oportunidade de participação neste estudo.

À assistente Dra. Nádia Aikawa, pela amizade e importantes contribuições em todas as etapas deste trabalho. Agrega inteligência, dedicação e generosidade em todas as suas realizações.

Às assistentes Dra. Adriana Maluf, Dra. Lucia Campos e Dra. Ana Paola Lotito, pelos ensinamentos, carinho e amizade. Mulheres e doutoras admiráveis, que apesar de suas inúmeras responsabilidades, se doam e se dedicam com inquestionável competência à Reumatologia Pediátrica.

À assistente Dra. Adriana de Jesus, sempre brilhante em todos os desafios profissionais. Integra a equipe da Reumatologia Pediátrica do Instituto da

Criança com profundo conhecimento, profissionalismo, ética e sensibilidade.

Ao amigo João Carlos Diniz, pela amizade, ensinamentos práticos e humanos a cada atendimento que realizamos juntos. Exemplo de profissionalismo e generosidade.

Aos amigos Clarissa Omori, Roberta Tavares, Cíntia Michelin, Erica Gomes e Guilherme Trudes, que fizeram da complementação em Reumatologia Pediátrica um período intenso, repleto de aprendizado e companheirismo.

A todos os assistentes, complementandos, residentes e pós-graduandos da Unidade de Reumatologia Pediátrica do Instituto da Criança, que realizaram uma força-tarefa para a coleta de dados deste projeto.

Aos mais recentes complementandos, residentes e pós-graduandos, que fortalecem a cada dia os laços de amizade e compromisso entre todos os membros da Reumatologia Pediátrica do Instituto da Criança.

Ao SAME, pela disponibilidade de acesso aos prontuários médicos, fundamentais para o estudo.

À Mariza Yoshikawa, pelas contribuições na pesquisa bibliográfica.

Ao amigo Nivaldo Rocha, pela amizade espontânea e todas as contribuições

ao longo da residência em Pediatria, complementação em Reumatologia
Pediátrica e na Pós- Graduação no Instituto da Criança.

Aos funcionários de todos os laboratórios participantes do projeto, pela
importante contribuição.

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. 2ª 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

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Métodos.....	7
4. Resultados.....	15
4.1 Dados demográficos.....	16
4.2 Imunogenicidade da vacina.....	16
4.3 Resposta vacinal e parâmetros da doença em pacientes com DMJ.....	18
4.4 Segurança da doença.....	20
4.5 Segurança da vacina.....	20
5. Discussão.....	22
6. Conclusões.....	27
7. Referências.....	29

Anexos

LISTAS

ABREVIATURAS

DMJ	Dermatomiosite juvenil
MGT	Média geométrica dos títulos
FA da MGT	Fator de aumento da média geométrica dos títulos
IH	Inibição da hemaglutinação
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
DHL	Desidrogenase láctica
CPK	Creatinofosfoquinase
DAS	Disease Activity Score
CMAS	Childhood Myositis Assessment Scale
MMT	Manual Muscle testing
EAs	Eventos adversos

TABELAS

Tabela 1 – Soroproteção(SP), soroconversão (SC), média geométrica de títulos (MGT) e fator de aumento na média geométrica de títulos (FA GMT) em pacientes com dermatomiosite juvenil (DMJ) e controles saudáveis pré e pós-vacina anti-influenza A H1N1/2009.....	17
Tabela 2 – Dados demográficos, enzimas musculares, curso clínico, escores da doença, linfopenia e tratamento de acordo a presença ou ausência de soroconversão em pacientes com dermatomiosite juvenil (DMJ) após a vacina anti-influenza A H1N1/2009.....	19
Tabela 3 – Eventos adversos da vacina anti-influenza A H1N1/2009 em pacientes com dermatomiosite juvenil (DMJ) e controles.....	21

RESUMO

Guisa VR. Imunogenicidade e segurança da vacina contra influenza A H1N1/2009 em pacientes com dermatomiosite juvenil [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Objetivos: Avaliar a imunogenicidade e segurança da vacina anti-influenza A/H1N1 2009 em pacientes com dermatomiosite juvenil (DMJ) comparados com controles saudáveis e a possível associação entre taxas de soroconversão com dados demográficos, enzimas musculares, escores da DMJ, linfopenia e tratamento nos pacientes com DMJ atendidos em dois serviços de Reumatologia Pediátrica. **Métodos:** Trinta pacientes com DMJ entre 9 e 21 anos e 81 controles saudáveis foram imunizados com a vacina anti-influenza A H1N1/2009 sem adjuvante. Todos foram avaliados pré e 21 dias após a vacinação. As taxas de soroproteção e soroconversão, a média geométrica dos títulos de anticorpos (MGT) e o fator de aumento (FA) na MGT foram calculados. Foram analisados os eventos adversos (EAs), assim como: enzimas musculares, instrumentos de força muscular, presença de linfopenia e tratamento atual da DMJ. **Resultados:** Pacientes com DMJ e controles foram comparáveis em relação à mediana de idade atual [15,5 (9-21) vs. 15 (9-21) anos, $p=0,511$] e frequência do sexo feminino (63% vs. 51%, $p=0,286$). A mediana do tempo de duração da DMJ foi de 5,5 (2-17) anos. Após a imunização, as taxas de soroconversão foram significativamente menores em pacientes com DMJ comparados com controles saudáveis (86,7% vs. 97,5%, $p=0,044$), enquanto soroproteção ($p=0,121$), MGT ($p=0,992$) e FA na MGT ($p=0,827$) foram semelhantes entre os grupos. As avaliações clínicas e laboratoriais na DMJ mostraram que as medianas dos escores de avaliação da atividade doença e enzimas musculares permaneceram estáveis no período do estudo ($p>0,05$). Uma alta frequência de curso clínico crônico da doença foi observada em pacientes que não apresentaram soroconversão em comparação aos pacientes soroconvertidos (100% vs. 27%, $p=0,012$). Em relação à influência do tratamento, baixas taxas de soroconversão foram observadas em pacientes em uso de metotrexate (100% vs. 38%, $p=0,036$) e associação de

prednisona, metotrexate e ciclosporina (50% vs. 4%, $p=0,039$). EAs locais e/ou sistêmicos foram leves e similares entre pacientes e controles ($p>0,05$).

Conclusão: Este foi o primeiro estudo que avaliou a vacina anti-influenza A H1N1/2009 na DMJ, identificando que o curso crônico da doença e a terapia imunossupressora são fatores que podem prejudicar a resposta humoral nos pacientes. Uma única dose da vacina foi soroprotetora nos pacientes avaliados, sem evidências de efeitos deletérios na atividade da doença.

Descritores: 1.Vírus da influenza A subtipo H1N1 2.Dermatomiosite
3.Vacinação 4.Criança 5.Adolescente 6. Imunidade humoral

SUMMARY

Guisa VR. Immunogenicity and safety of the influenza A H1N1/2009 vaccine in juvenile dermatomyositis patients [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Objectives: To assess the immunogenicity and safety of influenza A H1N1/2009 vaccine in juvenile dermatomyositis (JDM) patients compared to age-matched controls and the possible association of seroconversion rates with demographic, muscle enzymes, JDM scores, lymphopenia and treatment in JDM patients routinely followed at two Pediatric Rheumatology Units. **Methods:** Thirty JDM patients between 9 and 21 years old and 81 healthy age-matched controls were vaccinated with non-adjuvanted influenza A H1N1/2009 vaccine. All participants were evaluated pre- and 21 days post-vaccination. Seroconversion and seroprotection rates, geometric mean titres (GMT) and factor increase (FI) in GMT were assessed. Adverse events, as well as muscle enzymes, JDM scores, lymphopenia and current treatment in JDM were also evaluated. **Results:** JDM patients and healthy controls had similar median of current age [15.5 (9-21) vs. 15 (9-21) years, $p=0.511$] and frequencies of female gender (63% vs. 51%, $p=0.286$). The median disease duration of JDM was 5.5 (2-17) years. After immunization, seroconversion rate was significantly lower in JDM patients compared to age-matched controls (86.7 vs. 97.5%, $p=0.044$), whereas seroprotection ($p=0.121$), GMT ($p=0.992$) and FI in GMT ($p=0.827$) were similar in both groups. Clinical and laboratorial evaluations revealed that JDM scores and muscle enzymes remained stable throughout the study ($p>0.05$). A higher frequency of chronic course was observed in non-seroconvert compared to seroconverted (100% vs. 27%, $p=0.012$). Regarding treatment, a lower rate of seroconversion was observed in patients treated with methotrexate (100% vs. 38%, $p=0.036$) and in those with a combination of prednisone, methotrexate and cyclosporine (50% vs. 4%, $p=0.039$). Local and systemic adverse events were mild and similar in JDM patients and controls ($p>0.05$). **Conclusions:** This was the first study that evaluated the influenza A H1N1/2009 vaccine in JDM, identified that chronic course and immunosuppressive therapy were factors

hampering immune response in patients. A single dose of non-adjuvanted influenza A/H1N1 2009 vaccine was seroprotective in assessed patients with no evident deleterious effect in disease itself.

Descriptors: 1. Influenza A Virus, H1N1 Subtype 2. Dermatomyositis
3. Vaccination 4. Child 5. Adolescent 6. Humoral immunity

1 INTRODUÇÃO

A dermatomiosite juvenil (DMJ) é uma doença autoimune caracterizada por vasculopatia sistêmica de pequenos vasos que acomete tipicamente os músculos estriados e a pele, podendo também comprometer outros órgãos e sistemas.¹⁻⁴ Trata-se de uma doença rara, com incidência entre 2-3 casos/milhão de crianças/ano e de predominância no sexo feminino. O padrão de acometimento da doença é bimodal, com maiores incidências entre crianças ao redor dos 7 anos e na adolescência, sendo que 25% dos casos iniciam em crianças menores de 4 anos de idade.⁴

Melhorias no diagnóstico e manejo dos pacientes com DMJ têm aumentado significativamente a sua sobrevida ao longo das últimas décadas.^{1,5-7} Entretanto, o tratamento com imunossupressores e fatores associados à própria doença podem tornar esses pacientes vulneráveis às infecções.⁸⁻¹⁰ Portanto, a vacinação emerge como uma ferramenta essencial na prevenção de morbidades e redução da mortalidade em pacientes com DMJ.

Recentemente, o *European League Against Rheumatism* (EULAR) reforçou a importância da vacinação em pacientes pediátricos imunossuprimidos com doenças reumatológicas, devido ao alto risco de infecções potencialmente graves.¹¹ Em decorrência da elevada incidência de hospitalização e morte relatada nesse grupo específico de pacientes durante a pandemia de gripe suína em 2009,¹² a vacina anti-influenza A H1N1/2009 foi recomendada para todos os pacientes imunossuprimidos.¹³

Há poucos dados na literatura sobre a vacina anti-influenza sazonal e anti-influenza A H1N1/2009 em pacientes com DMJ e todos os dados

publicados estão restritos a imunogenicidade global e segurança vacinal.¹⁴

¹⁶ *Ogimi et al* avaliaram a resposta imune da vacina anti-influenza sazonal em uma pequena população de pacientes pediátricos com doenças reumatológicas autoimunes, incluindo apenas seis pacientes com DMJ, relatando resposta imune comparável ao grupo controle.¹⁴ Além disso, 70 pacientes com doenças reumatológicas juvenis em terapia imunossupressora foram estudados por *Kanakoudi-Tsakalidou et al*, incluindo apenas três pacientes com DMJ, o que impede uma conclusão definitiva sobre os seus resultados.¹⁵

Recentemente, a Unidade de Reumatologia Pediátrica e a Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) realizaram um amplo estudo prospectivo sobre a imunogenicidade e a segurança da vacina anti-influenza A H1N1/2009 em 237 pacientes com doenças reumáticas autoimunes juvenis, demonstrando a segurança global a curto prazo, com reduzida resposta imune associada ao uso de glicocorticoides.¹⁶ Porém, apenas 18 pacientes com DMJ foram incluídos nessa população.

Além disso, o possível papel de fatores demográficos, atividade da doença e terapia na resposta humoral à vacina anti-influenza A H1N1/2009 em pacientes com DMJ, assim como o potencial impacto da vacina nos parâmetros de atividade da doença não foram determinados. De fato, o gênero e a idade são fatores relevantes na imunogenicidade a vacinas, uma vez que pacientes do sexo feminino apresentam títulos de anticorpos mais altos para um grande número de vacinas virais¹⁷ e pacientes menores

de 9 anos podem apresentar menor resposta humoral à vacina anti-influenza A H1N1.^{18,19} O tratamento também já foi identificado como fator que pode interferir na resposta vacinal em pacientes adultos com lúpus eritematoso sistêmico²⁰ e há relatos sugerindo que vacinas podem induzir atividade da doença nesse grupo de pacientes.²¹

2 OBJETIVOS

1. Avaliar a imunogenicidade e a segurança da vacina anti-influenza A H1N1/2009 em pacientes com DMJ comparados com controles saudáveis.
2. Avaliar a possível associação entre soroconversão e: dados demográficos, enzimas musculares, escores da DMJ, linfopenia e tratamento nos pacientes com DMJ.
3. Avaliar os possíveis efeitos deletérios da vacina anti-influenza A H1N1/2009 sem adjuvante nos parâmetros de atividade da DMJ.

3 MÉTODOS

População de estudo

No período de março a abril de 2010, 71 pacientes com diagnóstico de DMJ, segundo os critérios internacionais de classificação,²² atendidos na Unidade de Reumatologia Pediátrica do Instituto da Criança (50 pacientes) e na Divisão de Reumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (21 pacientes) foram convidados por carta e/ou por telefone para participar da campanha nacional de imunização com a vacina contra influenza A H1N1/2009 nos respectivos centros de imunizações referenciados das unidades de atendimento. Cinco pacientes apresentavam idades acima de 21 anos e 5 pacientes, abaixo de 9 anos, sendo excluídos. Um paciente faltou no segundo período de avaliação e três pacientes não realizaram os exames laboratoriais. Vinte e sete pacientes faltaram à campanha vacinal, resultando em 30 pacientes com DMJ entre 9 e 21 anos incluídos no estudo. O grupo controle incluiu 81 crianças, adolescentes e jovens saudáveis voluntários com idades variando entre 9 e 21 anos e que procuraram os centros de imunizações durante a referida campanha.

Todos os pacientes e controles saudáveis e seus respectivos responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) (número 0114/10) e recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São

Paulo (2010/10749-0). Além disso, este estudo foi registrado no *clinicaltrials.gov* (NCT01151644).

Critérios de inclusão

1. Diagnóstico de DMJ segundo os critérios de Bohan e Peter ²²

Critérios de exclusão:

1. Infecção prévia pelo vírus influenza A H1N1/2009, confirmada por sorologia
2. Idade inferior a 9 anos ou superior a 21 anos
3. Participantes que não compareceram aos períodos de avaliação e coleta de exames laboratoriais
4. Resposta anafilática a componentes vacinais ou à proteína de ovo
5. Doença infecciosa aguda com febre acima de 38°C no momento da vacinação
6. Síndrome de Guillain-Barré ou síndromes desmielinizantes
7. Imunização com vacina de vírus vivo até 4 semanas antes da vacina anti- influenza A H1N1, vacina de vírus inativado até 2 semanas antes do estudo, ou vacina anti-influenza sazonal em 2010
8. Hospitalização no momento da inclusão no estudo
9. Transfusão com hemoderivados até 6 meses antes do estudo

Vacina anti-influenza A H1N1/2009

Todos os pacientes com DMJ e controles saudáveis receberam uma dose única intramuscular (0,5 mL) da vacina monovalente anti-influenza A H1N1/2009 (A/California/7/2009/Instituto Butantan/Sanofi Pasteur). A 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. Esta cepa foi propagada em ovos embrionados de galinha, utilizando as mesmas técnicas padronizadas para a produção da vacina sazonal. A vacina foi apresentada em frascos de 5 mL, utilizando timerosal como conservante (45 µg por dose de 0,5 mL).

Avaliação da imunogenicidade da vacina anti-influenza A H1N1/2009

Pacientes e controles foram avaliados no dia da vacinação (22 de março a 2 de abril) e três semanas após. Amostras de sangue foram obtidas de cada participante imediatamente antes e 21 dias após a vacinação. Os níveis de anticorpos contra o vírus H1N1 A/California/7/2009 foram determinados através do teste de inibição da hemaglutinação (IH) no Instituto Adolfo Lutz. As concentrações de vírus foram previamente determinadas por titulação do antígeno hemaglutinina e o teste de IH foi realizado após a remoção de inibidores não específicos do soro.²³ Os

estoques de vírus foram aliquotados e armazenados a -70 ° C até sua utilização.

Os soros foram testados para anticorpos contra a cepa do vírus influenza H1N1 A/California/7/2009 fornecido pelo Instituto Butantan a uma diluição inicial de 1:10 e uma diluição final de 1:2560. Para fins de cálculo, um valor de 1:5 foi atribuído para títulos negativos, e um valor de 1:2560 para títulos superiores a 1:2560. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

Os seguintes parâmetros da imunogenicidade após a vacinação foram avaliados: taxas de soroproteção (títulos de anticorpos \geq 1:40), soroconversão (títulos pré-vacinais $<$ 1:10 e pós-vacinais \geq 1:40 ou títulos pré-vacinais \geq 1:10 e pós-vacinais com aumento \geq 4 vezes), média geométrica dos títulos (MGT) e fator de aumento (FA) na MGT (MGT da relação entre os títulos pós e pré-vacinais).²⁴

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, diarréia, 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 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.

Curso clínico, atividade da doença, força muscular e tratamento nos pacientes com DMJ

O curso clínico da DMJ foi classificado em monofásico (completa recuperação dentro de dois anos, sem recidivas, independentemente do uso de glicocorticóides), recorrente (doença prolongada ou curso recorrente com uma ou mais recidivas após a suspensão do glicocorticóide) e crônico (doença persistente por mais de dois anos apesar do uso contínuo de glicocorticoides e recidivas em vigência de corticoterapia).²⁵

A avaliação da atividade clínica da doença, assim como os marcadores de atividade laboratorial e o tratamento utilizado pelos pacientes durante o período do estudo foram realizados no dia (imediatamente antes da vacinação) e 21 dias após a vacinação.

A atividade clínica da DMJ foi avaliada pelo *Disease Activity Score* (DAS) ²⁶ e a força muscular pelo *Childhood Myositis Assessment Scale* (CMAS) ²⁷ e *Manual Muscle Testing* (MMT) ²⁸

Os níveis séricos de enzimas musculares avaliados de acordo com o método cinético foram: aspartato aminotransferase (AST) (valor normal <41 UI/L), alanina aminotransferase (ALT) (valor normal <37 UI/L), desidrogenase láctica (DHL) (variação normal 240-480 UI/L), creatinofosfoquinase (CPK) (variação normal 39-308 UI/L) e aldolase (valor normal <7, 6 UI/L). Dados sobre o tratamento atual da DMJ incluíram o uso de: prednisona, metotrexate, azatioprina, cloroquina, ciclosporina, ciclofosfamida, micofenolato mofetil, gamaglobulina e rituximabe.

Análise estatística

As análises de imunogenicidade e de segurança foram descritivas, e intervalos de confiança de 95% (IC) bicaudais foram calculados assumindo distribuições binomiais para variáveis dicotômicas e distribuição em log-normal para os títulos de anticorpos por IH. A análise das variáveis contínuas foi baseada no padrão de distribuição. As MGTs e FA na MGT foram comparadas entre pacientes com DMJ e controles saudáveis utilizando o teste t de Student bicaudal ou o teste de Mann-Whitney sobre os títulos transformados em log₁₀. O teste de Mann-Whitney também foi utilizado para comparação de dados demográficos, enzimas musculares, escores de DMJ e dose atual de prednisona entre pacientes com e sem soroconversão. As variáveis categóricas (taxas de soroproteção e

soroconversão, uso de prednisona e drogas imunossupressoras e os efeitos adversos) foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher. Em todos os testes a significância estatística foi fixada em um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos

Pacientes com DMJ e controles foram comparáveis em relação à mediana de idade atual [15,5 (9-21) vs. 15 (9-21) anos, $p=0,511$] e frequência do sexo feminino (63% vs. 51%, $p=0,286$). A mediana do tempo de duração da DMJ foi de 5,5 (2-17) anos.

4.2 Imunogenicidade da vacina em pacientes com DMJ e controles

A Tabela 1 ilustra as taxas de soroproteção, soroconversão, MGT e FA na MGT em pacientes com DMJ e controles antes e após a vacina anti-influenza A H1N1/2009. No início do estudo, as taxas de soroproteção ($p=0,457$) e a MGT ($p=0,817$) foram comparáveis entre pacientes com DMJ e controles.

Após 21 dias, a taxa de soroconversão foi significativamente menor nos pacientes com DMJ *versus* controles saudáveis [86,7% (IC95% 74,9%-99,3%) vs. 97,5% (IC95% 94,1%-100,9%), $p=0,044$], enquanto as taxas de soroproteção foram semelhantes nos dois grupos [90% (IC95% 79,6%-101,1%) vs. 97,5% (CI 94,1%-100,9%), $p=0,121$]. Além disso, a MGT pós-vacinal ($p=0,992$) e o FA na MGT ($p=0,827$) também foram semelhantes nos dois grupos.

Tabela 1 – Soroproteção (SP), soroconversão (SC), média geométrica de títulos (MGT) e fator de aumento na média geométrica de títulos (FA GMT) em pacientes com dermatomiosite juvenil (DMJ) e controles saudáveis pré e pós-vacina anti-influenza A H1N1/2009

Variáveis	DMJ (n=30)	Controles (n=81)	p
Soroproteção pré-vacinal, %	30 (12,5 - 45,5)	22,2 (13,1 - 31,3)	0,457
Soroproteção pós-vacinal, %	90 (79,6 - 101,1)	97,5 (94,1 - 100,9)	0,121
Soroconversão, %	86,7 (74,9 - 99,3)	97,5 (94,1 - 100,9)	0,044
MGT pré-vacinal	13,8 (9,1 - 21)	13 (10,1 - 16,9)	0,817
MGT pós-vacinal	259,9 (155,5 - 434,4)	260,6 (204,4 - 332,2)	0,992
FA MGT	18,8 (11,4 - 31,1)	20 (15,2 - 26,3)	0,827

Os resultados estão expressos em % ou valor de MGT (intervalo de confiança 95%).

4.3 Resposta vacinal e parâmetros da doença em pacientes com DMJ

Dados demográficos, enzimas musculares, escores de DMJ, linfopenia e tratamento atual, de acordo com a presença ou ausência de soroconversão em pacientes com DMJ após a vacinação anti-influenza A H1N1/2009, estão demonstrados na Tabela 2. A análise dos dados demográficos foram comparáveis em pacientes com e sem soroconversão ($p>0,05$) (Tabela 2). Os cursos clínicos dos 19 pacientes em uso de qualquer medicamento imunossupressor foram monofásico em 3 (16%), recorrente em 7 (37%) e crônico em 9 (47%). Uma alta frequência de curso crônico foi observada nos pacientes que não apresentaram soroconversão comparados aos pacientes que soroconverteram (100% vs. 27%, $p=0,012$). Pacientes que soroconverteram e que não soroconverteram tiveram níveis comparáveis de escores da DMJ, incluindo DAS, CMAS e MMT ($p>0,05$). Linfopenia não foi observada em pacientes que não apresentaram soroconversão. Enzimas musculares foram também semelhantes nos dois grupos, exceto por maior mediana no nível de aldolase nos pacientes não soroconvertidos [7,4 (4,9–9,1) vs. 4,4 (2,1–7,2) UI/L, $p=0,026$]. Em relação ao tratamento, os quatro pacientes que não soroconverteram apresentavam curso crônico da doença e foram mais frequentemente submetidos ao uso de metotrexate (100% vs. 38%, $p=0,036$) e combinação de prednisona, metotrexate e ciclosporina (50% vs. 4%, $p=0,039$) comparados aqueles que soroconverteram (Tabela 2).

Tabela 2 – Dados demográficos, enzimas musculares, curso clínico, escores da doença, linfopenia e tratamento de acordo a presença ou ausência de soroconversão em pacientes com dermatomiosite juvenil (DMJ) após a vacina anti-influenza A H1N1/2009

Variáveis	Sem Soroconversão (n=4)	Com Soroconversão (n=26)	P
Dados demográficos			
Idade atual, anos	15 (12-16)	15,5 (9-21)	0,646
Tempo de doença, anos	4,9 (4-12)	7,2 (2-17)	0,806
Sexo feminino, n (%)	2 (50)	17 (65)	0,611
Enzimas musculares			
AST, U/L (<41)	26 (10-35)	19 (10-45)	0,471
ALT, U/L (<37)	41 (32-57)	31 (12-72)	0,155
DHL, U/L (240-480)	196 (168-211)	183 (93-469)	0,858
CPK, U/L (39-308)	223 (65-533)	124 (49-387)	0,647
Aldolase, U/L (<7,6)	7,4 (4,9-9,1)	4,4 (2,1-7,2)	0,026
Curso clínico DMJ			
Monofásico	0 (0)	11 (42)	0,267
Recorrente	0 (0)	8 (31)	0,550
Crônico	4 (100)	7 (27)	0,012
Escores			
DAS (0-20)	3 (0-11)	0 (0-7)	0,126
CMAS (0-52)	51,5 (48-52)	52 (45-52)	0,894
MMT (0-80)	80 (80-80)	80 (74-80)	0,621
Linfopenia (<1000/mm³)	0 (0)	2 (7,7)	1,0
Tratamento			
Prednisona, n (%)	4 (100)	11 (42)	0,097
Dose atual, mg	5,8 (2,5-12,5)	4 (1-35)	0,646
Imunossupressor, n (%)	4 (100)	15 (58)	0,267
MTX, n (%)	4 (100)	10 (38)	0,036
Ciclosporina, n (%)	2 (50)	4 (15)	0,169
Prednisona, MTX e ciclosporina, n (%)	2 (50)	1 (4)	0,039
Azatioprina, n (%)	0 (0)	2 (8)	1,0
Cloroquina, n (%)	3 (75)	4 (15)	0,169

Dados expressos em n (%) ou mediana (variação), AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase, CPK – creatinofosfoquinase, DHL – desidrogenase láctica, DAS - *Disease Activity Score*, CMAS - *Childhood Myositis Assessment Scale*, MMT - *Manual Muscle Testing*. MTX – metotrexate.

4.4 Segurança da doença

A análise dos possíveis efeitos da vacina nos parâmetros de atividade da doença revelou que as medianas do DAS pré e pós-vacinais [0 (0–11) vs. 0 (0–14), $p=0,954$], CMAS [52 (45–52) vs. 52(41–52), $p=0,803$] e MMT [80 (74–80) vs. 80 (79–80), $p=0,987$] permaneceram estáveis. De maneira semelhante, nenhuma diferença significativa foi observada no nível de enzimas musculares antes e após a imunização: AST [20 (10–45) vs. 23 (11–36) U/L, $p=0,246$], ALT [32,5 (12–72) vs. 31 (11–63) U/L, $p=0,825$], DHL [187 (93–469) vs. 179 (83–446) U/L, $p=0,906$], CK [124 (49–533) vs. 102 (33–481) U/L, $p=0,339$] e aldolase [4,8 (2,1–9,1) vs. 4,8 (0–7,5) U/L, $p=0,333$]. Além disso, a terapia manteve-se estável durante o período de estudo em todos os pacientes.

4.5 Segurança da vacina

Eventos adversos locais e sistêmicos foram leves e tiveram frequência semelhante nos pacientes com DMJ e controles ($p>0,05$) (Tabela 3). Nenhum evento adverso grave foi relatado durante as três semanas de acompanhamento.

Tabela 3 – Eventos adversos da vacina anti-influenza A H1N1/2009 em pacientes com dermatomiosite juvenil (DMJ) e controles

Variáveis	DMJ (n=30)	Controles (n=81)	P
Reações locais			
Dor	9 (30)	19 (23)	0,472
Eritema	0	2 (2)	1,0
Edema	0	2 (2)	1,0
Prurido	0	1 (1)	1,0
Reações sistêmicas			
Artralgia	1 (3)	2 (2)	1,0
Febre	1 (3)	3 (4)	1,0
Cefaléia	5 (17)	18 (22)	0,606
Mialgia	1 (3)	6 (7)	0,671
Dor de garganta	0	5 (6)	0,321
Tosse	0	5 (6)	0,321
Diarréia	0	2 (2)	1,0
Coriza	4 (13)	3 (4)	0,083
Congestão nasal	0	3 (4)	0,561

Dados expressos em n (%)

5 DISCUSSÃO

Este estudo revelou que a vacina anti-influenza A H1N1/2009 sem adjuvante foi efetiva em pacientes com DMJ e identificou que o curso crônico da DMJ e a terapia imunossupressora podem prejudicar a produção de anticorpos induzida pela vacina.

A vantagem do presente estudo foi a inclusão de um grupo homogêneo de pacientes que preencheram os critérios de classificação para DMJ²² e a comparação com um grupo controle saudável com idade comparável, uma vez que a resposta vacinal tem um padrão distinto na população pediátrica.¹⁸ Nós também incluímos apenas os pacientes com idade igual ou superior a 9 anos de idade, excluindo o grupo de lactentes e crianças menores que apresentam resposta humoral reduzida à vacina anti-influenza A H1N1/2009 e requerem duas doses desta vacina.^{18,19} O uso da vacina sem adjuvante foi escolhido para evitar doença autoimune e reação de gatilho com reativação de doença autoimune relacionados ao uso desse componente.²⁹ Além disso, estudos recentes mostraram melhor resposta imune e menores taxas de efeitos adversos em pacientes maiores de 9 anos que receberam a vacina contra influenza A H1N1 sem adjuvante em comparação a mesma vacina com adjuvante.^{18,19}

Assim como a idade, outros fatores limitantes do nosso estudo foram o número da amostra final de pacientes com DMJ e a pequena representação de pacientes com atividade moderada ou grave da doença, prejudicando a avaliação da relevância da atividade da doença na resposta vacinal dos pacientes. Porém, para o nosso conhecimento, o desenho de

estudo prospectivo desta rara vasculopatia autoimune abrangeu a maior população de DMJ que recebeu a vacina anti-influenza.¹⁴⁻¹⁶

Após a imunização com a vacina anti-influenza A H1N1/2009, a soroconversão dos pacientes foi reduzida nos pacientes com DMJ em comparação aos controles, porém com adequada taxa de soroproteção. Em nosso recente estudo para a mesma vacina em 45 pacientes adultos com dermatomiosite, a soroproteção foi significativamente menor em relação aos controles.³⁰ Da mesma forma, evidenciamos reduzida taxa de soroconversão para a mesma vacina em um estudo de 99 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e 95 pacientes com artrite idiopática juvenil.^{16, 31,32} Em contrapartida, estudos prévios com doenças reumáticas juvenis,³³ incluindo um número muito limitado de pacientes com DMJ,¹⁴⁻¹⁵ demonstraram adequada imunogenicidade às vacinas contra influenza sazonal. Além disso, as baixas taxas de soroconversão em pacientes com DMJ não podem ser explicadas pela imunização prévia com a vacina anti-influenza sazonal, pois nenhum dos pacientes com DMJ e três controles saudáveis (3,7%) haviam recebido imunização prévia contra influenza sazonal 2008/2009 ($p=0,562$).

Nós também identificamos que a terapia imunossupressora pode prejudicar a resposta humoral em pacientes com DMJ. Os quatro pacientes com DMJ que não apresentaram soroconversão tinham curso crônico da doença e, portanto, estavam em uso de imunossupressores, apesar de leves parâmetros de atividade da doença no momento do estudo. Por outro lado, em nosso estudo anterior, incluindo várias doenças reumatológicas

pediátricas autoimunes, imunossupressores não influenciaram na soroconversão contra a mesma vacina.¹⁶ Da mesma forma, estudos prévios relataram ausência de efeito dos imunossupressores na imunogenicidade da vacina anti-influenza sazonal em pacientes com doenças reumáticas.^{14,15}

Em relação à possível influência de outros parâmetros clínicos e laboratoriais, linfopenia não foi um achado relevante nestes pacientes e parece não interferir na resposta imunológica a esta vacina na DMJ. Por outro lado, no lúpus, a falha na resposta à vacina pandêmica foi associada com a redução do número de linfócitos.³⁷

A segurança vacinal em relação à doença foi reforçada pelos resultados que demonstraram escores de atividade da doença e de parâmetros laboratoriais estáveis durante o estudo, com níveis de aldolase discretamente maiores no grupo de pacientes que não apresentaram soroconversão. A este respeito, um estudo em pacientes adultos lúpicos demonstrou a ausência de efeito da imunização com a vacina anti-influenza sazonal sobre atividade da doença.²¹

De fato, a vacina anti-influenza A H1N1/2009 foi bem tolerada e segura em pacientes com DMJ e sem evento adverso grave relatado, assim como demonstrado previamente em um pequeno número de pacientes com DMJ que receberam a vacina anti-influenza.^{14,15} Em nosso grande estudo com 237 pacientes pediátricos com doenças reumatológicas autoimunes, somente artralgia foi mais frequentemente observada, comparando pacientes a controles saudáveis.¹⁶

Notavelmente, para que as vacinas de gripe pandêmica possam ser licenciadas, todas as crianças, adolescentes e adultos devem atender aos três padrões imunológicos atualmente estabelecidos: uma porcentagem de soroproteção >70%, soroconversão >40% e fator de aumento na MGT >2,5.³⁸⁻⁴⁰ Pacientes com DMJ e controles saudáveis avaliados no nosso estudo preencheram estes critérios, indicando que a vacina, embora menos imunogênica, foi efetiva e apresentou adequada soroconversão. Vacinas pandêmicas e sazonais devem ser recomendadas para esta população.

Por fim, neste grupo de crianças e adolescentes com esta rara miopatia inflamatória, futuros estudos avaliando imunogenicidade e segurança de outras vacinas (por exemplo, anti-pneumocócica, anti-meningocócica e contra papilomavírus humano) serão necessários.

6 CONCLUSÕES

1. A vacina anti-influenza A H1N1/2009 foi bem tolerada e com padrões imunológicos adequados, de acordo aos parâmetros estabelecidos para o licenciamento de vacina pandêmica, em pacientes com DMJ.
2. A imunogenicidade à vacina anti-influenza A H1N1/2009 foi influenciada pelo curso crônico da doença, associado ao uso de terapia imunossupressora combinada em pacientes com DMJ.
3. A vacina não induziu piora clínica, laboratorial ou reativação da doença durante o período do estudo.

7 REFERÊNCIAS

1. Sato JO, Sallum AM, Ferriani VP et al. A Brazilian registry of juvenile dermatomyositis: onset features and classification of 189 cases. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27: 1031-8.
2. Gonçalves FG, Chimelli L, Sallum AM, Marie SK, Kiss MH, Ferriani VP. Immunohistological analysis of CD59 and membrane attack complex of complement in muscle in juvenile dermatomyositis. *J Rheumatol* 2002; 29: 1301-7.
3. Sallum AM, Marie SK, Wakamatsu A et al. Immunohistochemical analysis of adhesion molecule expression on muscle biopsy specimens from patients with juvenile dermatomyositis. *J Rheumatol* 2004; 31: 801-7.
4. Wedderburn LR, Rider LG. Juvenile dermatomyositis: new developments in pathogenesis, assessment and treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009; 23: 665-78.
5. Guseinova D, Consolaro A, Trail L et al. Comparison of clinical features and drug therapies among European and Latin American patients with juvenile dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: 117-24.
6. Ravelli A, Lattanzi B, Consolaro A, Martini A: Glucocorticoides in paediatric rheumatology. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: 148-52.

7. Gutiérrez-Suárez R, Burgos-Vargas R: The use of methotrexate in children with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 122-7.
8. Silva CA, Terreri MT, Aikawa NE et al. Vaccination practice in children with rheumatic disease. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50: 351-61.
9. Glück T, Müller-Ladner U. Vaccination in patients with chronic rheumatic or autoimmune diseases. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1459-65.
10. Marie I, Ménard JF, Hachulla E et al. Infectious complications in polymyositis and dermatomyositis: a series of 279 patients. *Semin Arthritis Rheum* 2011; 41: 48-60.
11. Heijstek MW, Ott de Bruin LM, Bijl M et al. EULAR recommendations for vaccination in paediatric patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 1704-12.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity - United States, August 30, 2009-January 9, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly.Rep* 2010; 59: 38-43.
13. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59:1-62. [Erratum, *MMWR Recomm Rep* 2010; 59: 1147. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59:993]

- 14.Ogimi C, Tanaka R, Saitoh A, Oh-Ishi T. Immunogenicity of Influenza Vaccine in Children With Pediatric Rheumatic Diseases Receiving Immunosuppressive Agents. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 208-11.
- 15.Kanakoudi-Tsakalidou F, Trachana M, Pratsidou-Gertsi P, Tsitsami E, Kyriazopoulou-Dalaina V. Influenza vaccination in children with chronic rheumatic diseases and long-term immunosuppressive therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 589-94.
- 16.Aikawa NE, Campos LMA, Silva CA et al. Glucocorticoid: major factor for reduced immunogenicity of 2009 influenza A (H1N1) vaccine in juvenile autoimmune rheumatic disease patients. *J Rheumatol* 2012; 39: 167-73.
- 17.Cook IF. Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines. *Vaccine* 2008; 26: 3551-5.
- 18.Oh CE, Lee J, Kang JH et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virus influenza A/H1N1 vaccine in healthy children from 6 months to <18 years of age: a prospective, open-label, multi-center trial. *Vaccine* 2010; 28: 5857-63.
- 19.Liang XF, Wang HQ, Wang JZ et al. Safety and immunogenicity of 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccines in China: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010; 375: 56-66.

20. Borba Ef, Saad CG, Pasoto SG et al. Influenza A/H1N1 vaccination of patients with SLE: can antimalarial drugs restore diminished response under immunosuppressive therapy? *Rheumatology* 2012; 51: 1061-9.
21. Abu-Shakra M. Safety of vaccination of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009; 18: 1205-8.
22. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1975; 292: 344-7.
23. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ, Eds. Concepts and procedures from laboratory-based influenza surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1982.
24. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research Office of Vaccines Research and Review, Regulatory Considerations Regarding the Use of Novel Influenza A (H1N1) Virus Vaccines. Acessado, 23 de Julho de 2009.
25. Spencer CH, Hanson V, Singsen BH, Bernstein BH, Kornreich HK, King KK: Course of treated juvenile dermatomyositis. *J Pediatr* 1984; 105: 399-408
26. Bode RK, Klein-Gitelman MS, Miller ML, Lechman TS, Pachman LM. Disease activity score for children with juvenile dermatomyositis: reliability and validity evidence. *Arthritis Rheum* 2003; 49: 7-15.
27. Lovell DJ, Lindsley CB, Rennebohm RM et al. Development of validated disease activity and damage indices for the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. II. The Childhood Myositis

- Assessment Scale (CMAS): a quantitative tool for the evaluation of muscle function. The Juvenile Dermatomyositis Disease Activity Collaborative Study Group. *Arthritis Rheum*; 42: 2213-9.
28. Rider LG, Koziol D, Giannini EH et al.: Validation of manual muscle testing and a subset of eight muscles for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Care Res* 2010; 62: 465-72.
29. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun* 2011; 36: 4-8.
30. 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.
31. Aikawa N. *et al.* Effective seroconversion and safety following the pandemic influenza vaccination (anti-H1N1) in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Scand. J. Rheumatol* 2013; 42: 34-40.
32. Campos, L. M. A. *et al.* High disease activity: an independent factor for reduced immunogenicity of pandemic influenza a vaccine in patients with juvenile SLE *Arthritis Care Res* 2013 (in press).
33. Malleson PN, Tekano JL, Scheifele DW, Weber JM. Influenza immunization in children with chronic arthritis: a prospective study. *J Rheumatol* 1993; 20: 1769-73.
34. Holvast A, van Assen S, de Haan A, Huckriede A, Benne CA, Westra J, et al. Effect of a second, booster, influenza vaccination on antibody

- responses in quiescent systemic lupus erythematosus: an open, prospective, controlled study. *Rheumatology* 2009; 48: 1294-9.
35. Holvast A, van Assen S, de Haan A, Huckriede A, Benne CA, Westra J, et al. Studies of cell-mediated immune responses to influenza vaccination in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2438-47.
36. Kunisaki KM, Janoff EN. Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 493-504.
37. 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.
38. EMA. European Committee for Proprietary Medicinal Products. Guideline on dossier structure and content for pandemic Influenza vaccine marketing authorisation application (CPMP/VEG/4717/03). London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2004.
39. EMA. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines. London: European Medicines Agency, 1996. (Publication no. CPMP/BWP/214/96).

- 40.USFDA. 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.

ANEXOS

Anexo I – “Influenza A H1N1/2009 vaccine in juvenile dermatomyositis: reduced immunogenicity in patients under immunosuppressive therapy”

Publicado na revista *Clinical and Experimental Rheumatology*.

Influenza A H1N1/2009 vaccine in juvenile dermatomyositis: reduced immunogenicity in patients under immunosuppressive therapy

V.R. Guissa¹, R.M.R. Pereira², A.M.E Sallum¹, N.E. Aikawa^{1,2}, L.M.A. Campos¹, C.A. Silva^{1,2}, E. Bonfá²

¹Paediatric Rheumatology Unit and ²Division of Rheumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Abstract

Objectives

The aim of the present paper is to assess the influence of demographic, muscle enzymes, JDM scores and treatment on non-adjuvanted influenza A H1N1/2009 vaccine immunogenicity in juvenile dermatomyositis (JDM) patients.

Methods

Thirty JDM patients and 81 healthy age-matched controls were vaccinated. All participants were evaluated pre- and 21 days post-vaccination and serology for anti-H1N1 was performed by haemagglutination inhibition assay. Muscle enzymes, JDM scores and treatment were evaluated before and after vaccination. Adverse events were reported.

Results

After immunisation, seroconversion rates were significantly lower in JDM patients compared to age-matched controls (86.7 vs. 97.5%, $p=0.044$), whereas seroprotection ($p=0.121$), geometric mean titres (GMT) ($p=0.992$) and factor increase (FI) in GMT ($p=0.827$) were similar in both groups. Clinical and laboratorial evaluations revealed that JDM scores and muscle enzymes remained stable throughout the study ($p>0.05$). A higher frequency of chronic course was observed in non-seroconverted compared to seroconverted (100% vs. 27%, $p=0.012$). Regarding treatment, a lower rate of seroconversion was observed in patients under prednisone $>20\text{mg/day}$ (50% vs. 4%, $p=0.039$), and in those treated with a combination of prednisone, methotrexate and cyclosporine (50% vs. 4%, $p=0.039$). Local and systemic vaccine adverse events were mild and similar in patients and controls ($p>0.05$).

Conclusion

This study identified that chronic course and immunosuppressive therapy are the major factors hampering seroconversion in JDM, suggesting that a specific protocol may be required for this subgroup of patients. In spite of that, a single dose of non-adjuvanted influenza A/H1N1 2009 vaccine was generally seroprotective in this disease with no evident deleterious effect in disease itself (ClinicalTrials.gov, no. NCT01151644).

Key words

vaccine, immunogenicity, influenza A H1N1/2009, children, juvenile dermatomyositis

Vanessa R. Guissa, MD
 Rosa M.R. Pereira, MD, PhD
 Adriana M.E. Sallum, MD, PhD
 Nadia E. Aikawa, MD, MSc
 Lucia M.A. Campos, MD, PhD
 Clovis A. Silva, MD, PhD*
 Eloisa Bonfá, MD, PhD*

*These authors made an equal contribution to this work.

Please address correspondence to:

Clovis A. Silva, MD, PhD,
 Rua Araioses 152/81,
 Vila Madalena,
 05442-010 São Paulo, Brazil.
 E-mail: clovis.silva@icr.usp.br

Received on December 27, 2011; accepted
 in revised form on March 14, 2012.

© Copyright CLINICAL AND
 EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2012.

Funding: This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP no. 2009/51897-5 to EB and no. 2010/10749-0 to EB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ no. 300559/2009-7 to RMRP, no. 2011/12471-2 to CAS and no. 301411/2009-3 to EB), Federico Foundation (to RMRP, CAS and EB), Butantan Foundation, and by Núcleo de Apoio a Pesquisa "Saúde da Criança e do Adolescente" da USP (NAP-CriAd).
Competing interests: none declared.

Introduction

Improvements in the diagnosis and management of juvenile dermatomyositis (JDM) have significantly enhanced survival over the last decades (1-4). The treatment used in these patients and disease itself may induce immunosuppression with a consequent increase in infection susceptibility (5-7). Therefore, vaccination emerges as an essential prevention tool in pediatric rheumatologic disease (5, 8).

Recently, the European League Against Rheumatism (EULAR) task force has reinforced the relevance of vaccination in immunosuppressed pediatric rheumatologic patients, due to high risk of severe infection (8). Accordingly, the influenza A H1N1/2009 vaccination was recommended for all immunosuppressed patient (9), due to the high incidence of hospitalisation and death in this particular group of patients reported during the 2009 pandemic (10).

There are scarce data in the literature regarding H1N1 influenza vaccine in JDM patients and all of them are restricted to overall immunogenicity and safety (11-13). Ogimi *et al.* evaluated the immune response of influenza vaccine in small cohort of juvenile autoimmune rheumatic diseases, including only 6 JDM patients, and reported immune response comparable to controls (11). Only 3 JDM patients were evaluated in the study of Kanakoudi-Tsakalidou *et al.*, thus precluding a definitive conclusion about their findings (12). We have recently assessed immunogenicity and safety of the non-adjuvanted influenza A H1N1/2009 vaccine in 237 juvenile autoimmune rheumatic diseases, including only 18 JDM patients, and showed an overall short-term safety with reduced immune response associated with glucocorticoid use (13), without a specific analysis of this subgroup of patients.

Moreover, the possible role of demographic, disease and therapy factors in vaccine antibody response and the potential impact of vaccine in JDM disease parameters need to be determined. Gender and age are relevant for immunogenicity, since female gender has higher antibodies titers to a large number of viral vaccine (14) and pa-

tients younger than 9 years old may induce lesser humoral response to influenza A H1N1(15, 16). Treatment was also identified to contribute to vaccine response in lupus patients (17) and there were reports suggesting that the vaccine may induce flare in systemic lupus erythematosus patients (18).

Therefore, the objectives of this study were to assess the possible association between seroconversion rate with demographic data, muscle enzymes, JDM scores, lymphopenia and treatment in JDM patients, as well as the possible deleterious effect of the non-adjuvanted influenza A H1N1/2009 in the disease itself.

Methods

Thirty consecutive JDM outpatients, including 18 JDM patients of our previous study (13), routinely followed at the Pediatric Rheumatology Unit and the Rheumatology Division of Clinics Hospital, São Paulo, Brazil, were included in this study. All patients fulfilled the international classification criteria for JDM (19). A total of 81 age-matched healthy subjects were concomitantly included in the control group. All participants were ≥ 9 and ≤ 21 years old, and exclusion criteria included previous proven infection by influenza A H1N1/2009, anaphylactic response to vaccine components or to egg, previous vaccination with any live vaccine four weeks before or any inactivated vaccine two weeks before the study, 2010 seasonal influenza vaccination, acute infection resulting in fever over 38°C at the time of vaccination, Guillain-Barré syndrome or demyelinating syndromes, blood transfusion within six months, and hospitalisation (13).

Study design

This was a prospective, open study conducted between March 2010 and April 2010. All JDM patients were invited by letter to participate in the Public Health influenza A H1N1/2009 vaccine campaign at the Immunisation Centre of the same hospital. Healthy volunteers who came to this centre seeking vaccination in response to the Public Health National Campaign were included as control group. This protocol was ap-

proved by the Local Institutional Review Board, and informed consent was obtained from all participants or their legal guardian. The study was registered at clinicaltrials.gov under no. NCT01151644.

A single intramuscular dose (0.5 ml) of H1N1 A/California/7/2009-like virus vaccine (A/California/7/2009/Butantan Institute/Sanofi Pasteur) was administered to all participants. Patients and controls were evaluated on the day of vaccination (from March 22nd to April 2nd) and after three weeks. Blood samples were obtained from each participant immediately before and 21 days after vaccination.

Vaccine

A novel monovalent, non-adjuvanted, inactivated, split-virus vaccine was supplied by Butantan Institute/Sanofi Pasteur (São Paulo, Brazil). The vaccine contained an inactivated split influenza virus with 15 µg of haemagglutinin antigen equivalent to the A/California/7/2009 (H1N1) virus-like strain (NYMCx-179A), one of the candidate reassortant vaccine viruses recommended by the WHO. Embryonated chicken eggs were employed using the same standard techniques for the production of seasonal, trivalent, inactivated influenza vaccine. The vaccine was presented in 5-ml multi-dose vials with thimerosal (45 µg per 0.5-ml dose) as a preservative.

Haemagglutination inhibition assay

The antibody levels against H1N1 A/California/7/2009-like virus were evaluated using the haemagglutination inhibition assay (HIA) at the Adolfo Lutz Institute. Sera were tested for antibodies to the H1N1 A/California/7/2009 influenza strain supplied by Butantan Institute at an initial dilution of 1:10, and at a final dilution of 1:2560. For calculation purpose, negative titers had an assigned value of 1:5, and titers greater than 1:2560 a value of 1:2560. Samples were tested in duplicate, and geometric mean values were used in the analysis. Virus concentrations were previously determined by haemagglutinin antigen titration, and the HIA test was performed after removing naturally oc-

curing nonspecific inhibitors from the sera as previously described (20).

The immunogenicity end-points after vaccination were the seroprotection (SP) rate (antibody titre $\geq 1:40$), seroconversion (SC) rate (pre-vaccination titre $< 1:10$ and post-vaccination HIA titre $\geq 1:40$ or pre-vaccination titre $\geq 1:10$ and ≥ 4 -fold increase in post-vaccination titre), geometric mean titres (GMTs), and factor increase in GMT (GMT of the ratio of antibody titres after and before vaccination).

Safety assessment

On the day of vaccination, patients or parents were given a 21-day personal diary card containing the following list of pre-defined adverse events: local reactions (pain, redness, swelling, and itching) and systemic adverse events (arthralgia, fever, headache, myalgia, sore throat, cough, diarrhoea, rhinorrhoea, and nasal congestion). Participants were asked to give 'yes/no' responses to each side effect and to return their diary cards at the second evaluation day (21 days after vaccination). Adverse events that were not on the list were also reported. All local reactions were considered related to the influenza A H1N1/2009 vaccine, while systemic adverse events were analysed by the investigators to determine their causality. Severe adverse events were defined as those requiring hospitalisation or death.

Disease activity, JDM clinical course, muscle strength and treatment in JDM patients

JDM activity was assessed by disease activity score (DAS) (21) (range 0–20), and muscle strength was evaluated by childhood myositis assessment scale (CMAS) (22) (range 0–52) and manual muscle testing (MMT) (23) (range 0–80). The JDM clinical course was classified in monophasic, recurrent and chronic (24). The serum muscle enzymes performed were aspartate aminotransferase (AST) (normal value < 41 IU/L), alanine aminotransferase (ALT) (normal value < 37 IU/L), lactate dehydrogenase (LDH) (normal range 240–480 IU/L), creatine phosphokinase (CK) (normal range 39–308 IU/L) and aldolase (nor-

mal value < 7.6 IU/L). Data concerning the current JDM treatments included: prednisone, methotrexate, azathioprine, chloroquine, cyclosporine, cyclophosphamide, mycophenolate mofetil, intravenous immunoglobulin and rituximab.

Statistical analysis

The immunogenicity and safety analyses were descriptive, and the two-sided 95% confidence intervals (CI) were calculated assuming binomial distributions for dichotomous variables and log-normal distribution for haemagglutination inhibition titres. The analysis of continuous variables was based on distributional assumptions. The GMTs and FI in GMT were compared between JDM patients and the healthy controls using a two-sided Student's *t*-test or Mann-Whitney U-test on the \log_{10} -transformed titres. Mann-Whitney U-test was also used to compare demographic data, muscle enzymes, JDM scores and prednisone current dose between patients with and without seroconversion. For categorical variables, statistical summaries included the rates of seroconversion that were compared using Fisher's exact test. All tests were two-sided with a 0.05 significance levels.

Results

Demographic data

JDM patients and healthy controls had similar current age (15.5 [9–21] vs. 15 [9–21] years, $p=0.511$) and frequencies of female gender (63% vs. 41%, $p=0.286$). The median disease duration of JDM was 5.5 (2–17) years.

Response to immunisation in JDM patients and controls

Table I illustrates seroprotection, seroconversion, GMTs and factor increases in the GMTs in JDM patients and controls before and after influenza A H1N1/2009 vaccination. Prior to immunisation, the seroprotection rate and GMT were comparable between JDM patients and healthy controls ($p=0.457$, $p=0.817$; respectively). After immunisation, the seroconversion rate was significantly lower in JDM patients compared to healthy controls (86.7%, 95% CI 74.9% to 99.3% vs. 97.5%, 95% CI 94.1% to 100.9%, $p=0.044$),

whereas the seroprotection rate was similar in both groups (90%, 95% CI 79.6% to 101.1% vs. 97.5%, CI 94.1% to 100.9%, $p=0.121$). In addition, GMT after immunisation and factor increase in GMT were alike in the two groups ($p=0.992$ and $p=0.827$ respectively). None of the JDM patients and three (3.7%) healthy controls received previous immunisation with seasonal 2008/2009 influenza vaccine ($p=0.562$).

Immunisation response and disease parameters in JDM patients

Demographic data, muscle enzymes, JDM scores, lymphopenia and treatment at vaccination according to presence or absence of seroconversion in JDM patients after influenza A H1N1/2009 vaccination are shown in Table II.

Demographic data were comparable in the two groups ($p>0.05$) (Table II). The clinical courses of 19 JDM patients under any immunosuppressive agents were monophasic in 3 (15.8%), recurrent in 7 (36.8%) and chronic in 9 (47.4%). A higher frequency of chronic course was observed in non-seroconverted compared to seroconverted patients (100% vs. 27%, $p=0.012$). None of the patients had moderate or severe clinical activity or muscle weakness and seroconverted and non-seroconverted groups had comparable levels of JDM scores ($p>0.05$). Lymphopenia was not observed in patients that did not seroconverted. Muscle enzymes were also alike in both groups, except for a higher median level of aldolase in the non-seroconverted patients (7.4 [4.9–9.1] vs. 4.4 [2.1–7.2] IU/L, $p=0.026$). Regarding therapy, the four JDM patients that did not seroconvert had chronic course of disease and were more often under higher dose of prednisone (>20 mg/day) compared to those that seroconverted (50% vs. 4%, $p=0.039$). Likewise, a higher frequency of methotrexate (100% vs. 38%, $p=0.036$) and combination of prednisone, methotrexate and cyclosporine use (50% vs. 4%, $p=0.039$) was observed in patients that did not seroconvert (Table II).

Further analysis of the possible effect of vaccine in disease parameters revealed that the median of pre- and post-vaccination DAS (0 [0–11] vs. 0 [0–14],

Table I. Seroprotection (SP), seroconversion (SC), geometric mean titers (GMT) and factor increases in the GMT (FI in GMT) in juvenile dermatomyositis (JDM) patients and controls before and after influenza A/H1N1/2009 vaccination.

Variables	JDM (n=30)	Controls (n=81)	p-value
SP			
Before immunisation	30 (12.5–45.5)	22.2 (13.1–31.3)	0.457
After immunisation	90 (79.6–101.1)	97.5 (94.1–100.9)	0.121
SC	86.7 (74.9–99.3)	97.5 (94.1–100.9)	0.044
GMT			
Before immunisation	13.8 (9.1–21)	13 (10.1–16.9)	0.817
After immunisation	259.9 (155.5–434.4)	260.6 (204.4–332.2)	0.992
FI in GMT	18.8 (11.4–31.1)	20 (15.2–26.3)	0.827

Values expressed in % (95% confidence interval).

Table II. Demographic data, muscle enzymes, juvenile dermatomyositis (JDM) clinical courses and scores, lymphopenia and treatment at vaccination according to seroconversion (SC) to influenza A H1N1/2009 vaccine in JDM patients.

Variables at vaccination (reference values)	Without SC (n=4)	With SC (n=26)	p-value
Demographic data			
Current age, years	15 (12–16)	15.5 (9–21)	0.646
Disease duration, years	4.9 (4–12)	7.2 (2–17)	0.806
Female gender	2 (50)	17 (65)	0.611
Muscle enzymes			
AST, IU/liter (<41)	26 (10–35)	19 (10–45)	0.471
ALT, IU/liter (<37)	41 (32–57)	31 (12–72)	0.155
LDH, IU/liter (240–480)	196 (168–211)	183 (93–469)	0.858
CK, IU/liter (39–308)	223 (65–533)	124 (49–387)	0.647
Aldolase, IU/liter (<7.6)	7.4 (4.9–9.1)	4.4 (2.1–7.2)	0.026
JDM clinical course			
Monophasic	0 (0)	11 (42)	0.267
Recurrent	0 (0)	8 (31)	0.550
Chronic	4 (100)	7 (27)	0.012
JDM Scores			
DAS (0–20)	3 (0–11)	0 (0–7)	0.126
CMAS (0–52)	51.5 (48–52)	52 (45–52)	0.894
MMT (0–80)	80 (80–80)	80 (74–80)	0.621
Lymphopenia (<1000/mm ³)	0 (0)	2 (7.7)	1.0
Treatment			
Prednisone	4 (100)	11 (42)	0.097
Current dose, mg	5.8 (2.5–12.5)	4 (1–35)	0.646
Prednisone > 20mg/day	2 (50)	1 (4)	0.039
Immunosuppressor (any)	4 (100)	15 (58)	0.267
MTX	4 (100)	10 (38)	0.036
Cyclosporine	2 (50)	4 (15)	0.169
Prednisone, MTX and cyclosporine	2 (50)	1 (4)	0.039
Azathioprine	0 (0)	2 (8)	1.0
Chloroquine	3 (75)	4 (15)	0.169

Values expressed in median (range) or n (%), AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; LDH: lactate dehydrogenase; CK: creatine kinase; DAS: disease activity score; CMAS: childhood myositis assessment scale; MMT: manual muscle testing; MTX: methotrexate.

$p=0.954$), CMAS (52 [45–52] vs. 52 [41–52], $p=0.803$) and MMT (80 [74–80] vs. 80 [79–80], $p=0.987$) remained largely unchanged. Likewise, no significant differences were observed in muscle enzymes before and after immunisation: AST (20 [10–45] vs. 23 [11–36] IU/liter, $p=0.246$), ALT (32.5 [12–72]

vs. 31 [11–63] IU/liter, $p=0.825$), LDH (187 [93–469] vs. 179 [83–446] IU/liter, $p=0.906$), CK (124 [49–533] vs. 102 [33–481] IU/liter, $p=0.339$) and aldolase (4.8 [2.1–9.1] vs. 4.8 [0–7.5] IU/liter, $p=0.333$). Frequencies of lymphopenia before and after immunisation were comparable (7% vs. 0%, $p=0.492$). Fur-

Table III. Adverse events of influenza A/H1N1/2009 vaccination in juvenile dermatomyositis (JDM) patients and controls.

Variables	JDM (n=30)	Controls (n=81)	p-value
Local reactions			
Pain	9 (30)	19 (23)	0.472
Redness	0	2 (2)	1.0
Swelling	0	2 (2)	1.0
Itching	0	1 (1)	1.0
Systemic reactions			
Arthralgia	1 (3)	2 (2)	1.0
Fever	1 (3)	3 (4)	1.0
Headache	5 (17)	18 (22)	0.606
Myalgia	1 (3)	6 (7)	0.671
Sore throat	0	5 (6)	0.321
Cough	0	5 (6)	0.321
Diarrhea	0	2 (2)	1.0
Rhinorrhea	4 (13)	3 (4)	0.083
Nasal congestion	0	3 (4)	0.561

Values expressed in n (%).

thermore, therapy was stable throughout the study in all patients.

Adverse events

Local and systemic vaccine adverse events were mild and had similar frequencies in JDM and controls ($p>0.05$) (Table III). None of them had severe adverse events.

Discussion

This study revealed that the non-adjuvanted influenza A H1N1/2009 virus immunisation is effective in JDM patients and identified that JDM chronic course and immunosuppressive therapy may hamper the vaccine induced antibody production.

The advantage of the present study was the inclusion of a homogenous group of patients that fulfilled the criteria for JDM (19) and the comparison with an age-matched control group, since vaccine efficacy has a distinct pattern in pediatric population (15). We also included only patients over 9 years of age, excluding the group of infants and children who had reduced humoral response to influenza A H1N1/2009 vaccine and required two doses of this vaccine (15, 16). Additionally, the use of non-adjuvant vaccine was chosen to avoid an autoimmune-related disease (25). The prospective design of this rare disease resulted, however, in a limited number of participants, and to our knowledge our study encompasses the

largest JDM population that received influenza vaccine (11-13).

After immunisation with influenza A H1N1/2009 vaccine, the immunoreponse was impaired in JDM patients, as also observed in our recent report for the same vaccine in adult DM (26). Similarly, we evidenced reduced seroconversion rates for the same vaccine in a cohort of 99 of juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE) and 93 juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients (13). Further studies will be performed to assess the influence of influenza A H1N1/2009 vaccine in disease parameters and the potential deleterious effect of therapy in immunoreponse treatments in each of these diseases.

In contrast, previous studies in juvenile rheumatic diseases (27), including a very limited number of JDM populations (11, 12), demonstrated satisfactory immunogenicity with seasonal and pandemic influenza vaccination, independent of glucocorticoid and immunosuppressive therapies. In addition, the lower seroconversion rates in JDM patients cannot be explained by previous immunisation with seasonal influenza vaccine.

The four patients without seroconversion had chronic course of JDM and therefore, they were still under immunosuppressants combination in spite of mild disease activity parameters. Glucocorticoid was the major factor for the reduced overall immune response of

pandemic vaccine in our recent study with juvenile autoimmune rheumatic diseases, mainly comprised by JSLE, JIA and 18 JDM also included in the present evaluation (13).

We have identified that immunosuppressive therapy may hamper vaccine antibody response in JDM patients. In our previous study including several pediatric autoimmune diseases, lymphopenia and immunosuppressants did not influence seroconversion against the same vaccine (13). Likewise, previous studies reported no effect of immunosuppressants in immunogenicity with seasonal (12, 27) and pandemic influenza vaccine (11) in patients with rheumatic diseases. In contrast, glucocorticoid and/or immunosuppressant use was associated with lower humoral and cell-mediated responses against the H1N1 strain of seasonal influenza vaccine in adult systemic lupus erythematosus (28, 29) and rheumatoid arthritis patients (30). In a recent study on pandemic influenza A H1N1/2009 vaccine in adult lupus, immunogenicity was improved in those under antimalarials therapy (17).

As regards the possible influence of other clinical and laboratorial parameters, lymphopenia was not a relevant finding in these patients and does not seem to interfere with immunoreponse to vaccine in JDM. Of note, in lupus, pandemic vaccination failure was significantly associated with reduced lymphocyte count (31).

The evaluation of the potential relevance of disease activity, as determined by JDM score, in pandemic vaccine antibody response was impaired by the small representation of patients with moderate or severe flares in our cohort that excluded hospitalised patients. Disease safety is reinforced by our findings of stable JDM scores and laboratorial muscle evaluation parameters throughout the study, including the borderline higher levels of aldolase in the non-seroconverted group. In this regard, studies with adult SLE have demonstrated no effect of seasonal influenza immunisation on disease flares (18).

Of note, influenza A H1N1/2009 vaccine was well tolerated and safe in JDM patients, as no serious short-term

adverse event was observed, as also reported previously in a limited number of JDM patients that received influenza vaccine (11, 12). In our large study with 237 pediatric autoimmune rheumatic diseases patients, only arthralgia was more frequently observed, comparing patients to healthy controls (13).

Notably, for pandemic influenza vaccines to be licensed, all children, adolescents and adults must meet all three current immunologic standards established: a percentage of seroprotection >70%, seroconversion >40%, and a factor increase in GMT >2.5 (29-31). JDM patients and healthy controls evaluated herein fulfilled all of the three criteria, indicating that the vaccine, while being less immunogenic, was effective.

In conclusion, this study identified that in JDM patients, chronic course and immunosuppressive therapy may hamper seroconversion, suggesting that a specific vaccination protocol may be required for this subgroup of patients. In spite of that, a single dose of non-adjuvanted influenza A H1N1/2009 vaccine was generally seroprotective and had no evident deleterious effect in disease itself.

Acknowledgments

We thank the subjects for their critical roles in this study, the staff of Hospital das Clínicas FMUSP, Laboratório de Investigação Médica (LIM-17), Faculdade de Medicina da USP, Adolfo Lutz Institute and Butantan Institute.

References

- SATO JO, SALLUM AM, FERRIANI VP *et al.*: A Brazilian registry of juvenile dermatomyositis: onset features and classification of 189 cases. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27: 1031-8.
- GUSEINOVA D, CONSOLARO A, TRAIL L *et al.*: Comparison of clinical features and drug therapies among European and Latin American patients with juvenile dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: 117-24.
- RAVELLI A, LATTANZI B, CONSOLARO A, MARTINI A: Glucocorticoids in paediatric rheumatology. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: 148-52.
- GUTIÉRREZ-SUÁREZ R, BURGOS-VARGAS R: The use of methotrexate in children with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 122-7.
- SILVA CA, TERRERI MT, AIKAWA NE *et al.*: Vaccination practice in children with rheumatic disease. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50: 351-61.
- GLÜCK T, MÜLLER-LADNER U: Vaccination in patients with chronic rheumatic or autoimmune diseases. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1459-65.
- MARIE I, MÉNARD JF, HACHULLA E *et al.*: Infectious complications in polymyositis and dermatomyositis: a series of 279 patients. *Semin Arthritis Rheum* 2011; 41: 48-60.
- HEIJSTEK MW, OTT DE BRUIN LM, BIJL M *et al.*: EULAR recommendations for vaccination in paediatric patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 1704-12.
- FIORE AE, UYEKI TM, BRODER K *et al.*: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59:1-62. [Erratum, *MMWR Recomm Rep* 2010; 59: 993].
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC): Update: influenza activity—United States, August 30, 2009–January 9, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly. Rep* 2010; 59: 38-43.
- OGIMI C, TANAKA R, SAITOH A, OH-ISHI T: Immunogenicity of Influenza Vaccine in Children With Pediatric Rheumatic Diseases Receiving Immunosuppressive Agents. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 208-11.
- KANAKOUDI-TSAKALIDOU F, TRACHANA M, PRATSIDOU-GERTSI P, TSITSAMI E, KYRIAZOPOULOU-DALAINA V: Influenza vaccination in children with chronic rheumatic diseases and long-term immunosuppressive therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 589-94.
- AIKAWA NE, CAMPOS LM, SILVA CA *et al.*: Glucocorticoid: major factor for reduced immunogenicity of 2009 influenza A (H1N1) vaccine in juvenile autoimmune rheumatic disease patients. *J Rheumatol* 2012; 39: 167-73.
- COOK IF: Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines. *Vaccine* 2008; 26: 3551-5.
- OH CE, LEE J, KANG JH *et al.*: Safety and immunogenicity of an inactivated split-virus influenza A/H1N1 vaccine in healthy children from 6 months to <18 years of age: a prospective, open-label, multi-center trial. *Vaccine* 2010; 28: 5857-63.
- LIANG XF, WANG HQ, WANG JZ *et al.*: Safety and immunogenicity of 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccines in China: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010; 375: 56-66.
- BORBA EF, SAAD CG, PASOTO SG *et al.*: Influenza A/H1N1 vaccination of patients with SLE: can antimalarial drugs restore diminished response under immunosuppressive therapy? *Rheumatology* 2012; 51: 1061-9.
- ABU-SHAKRA M: Safety of vaccination of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009; 18: 1205-8.
- BOHANA, PETER JB: Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1975; 292: 344-7.
- KENDAL AP, PEREIRA MS, SKEHEL JJ: Concepts and procedures from laboratory-based influenza surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1982.
- BODE RK, KLEIN-GITELMAN MS, MILLER ML, LECHMAN TS, PACHMAN LM: Disease activity score for children with juvenile dermatomyositis: reliability and validity evidence. *Arthritis Rheum* 2003; 49: 7-15.
- LOVELL DJ, LINDSLEY CB, RENNEBOHM RM *et al.*: Development of validated disease activity and damage indices for the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. II. The Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS): a quantitative tool for the evaluation of muscle function. The Juvenile Dermatomyositis Disease Activity Collaborative Study Group. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2213-9.
- RIDER LG, KOZIOL D, GIANNINI EH *et al.*: Validation of manual muscle testing and a subset of eight muscles for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Care Res* 2010; 62: 465-72.
- SPENCER CH, HANSON V, SINGSEN BH, BERNSTEIN BH, KORNREICH HK, KING KK: *J Pediatr* 1984; 105: 399-408.
- SHOENFELD Y, AGMON-LEVIN N: 'ASIA' – autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun* 2011; 36: 4-8.
- 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.
- MALLESON PN, TEKANO JL, SCHEIFELE DW, WEBER JM: Influenza immunization in children with chronic arthritis: a prospective study. *J Rheumatol* 1993; 20: 1769-73.
- HOLVAST A, VAN ASSEN S, DE HAAN A *et al.*: Effect of a second, booster, influenza vaccination on antibody responses in quiescent systemic lupus erythematosus: an open, prospective, controlled study. *Rheumatology* 2009; 48: 1294-9.
- HOLVAST A, VAN ASSEN S, DE HAAN A *et al.*: Studies of cell-mediated immune responses to influenza vaccination in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2438-47.
- KUNISAKI KM, JANOFF EN: Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 493-504.
- 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.
- EMA. EUROPEAN COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS: Guideline on dossier structure and content for pandemic Influenza vaccine marketing authorisation application (CPMP/VEG/4717/03). London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2004.
- EMA. COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS: Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines. London: European Medicines Agency, 1996. (Publication no. CPMP/BWP/214/96).
- USFDA. 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.