

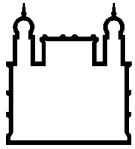
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DA VACINA TRIVALENTE INATIVADA ANTI-INFLUENZA
DAS TEMPORADAS DE 2018, 2019 E 2020 NO BRASIL: IMPACTO DA
OBESIDADE, IDADE E IMUNIDADE PRÉVIA

ARTUR SILVA VIDAL CAPÃO

Rio de Janeiro
Maio de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ARTUR SILVA VIDAL CAPÃO

AVALIAÇÃO DA VACINA TRIVALENTE INATIVADA ANTI-INFLUENZA DAS TEMPORADAS DE 2018, 2019 E 2020 NO BRASIL: IMPACTO DA OBESIDADE, IDADE E IMUNIDADE PRÉVIA

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências em Biologia Parasitária.

Orientadora: Dra. Cristiana Couto Garcia

RIO DE JANEIRO

Maio de 2021

Capão, Artur Silva Vidal.

Avaliação da vacina trivalente inativada anti-influenza das temporadas de 2018, 2019 e 2020 no Brasil: impacto da obesidade, idade e imunidade prévia / Artur Silva Vidal Capão. - Rio de Janeiro, 2021.

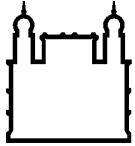
122 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientadora: Cristiana Couto Garcia.

Bibliografia: f. 83-111

1. Influenza. 2. Vacina Trivalente Inativada. 3. Inibição da Hemaglutinação. 4. Resposta imunológica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ARTUR SILVA VIDAL CAPÃO

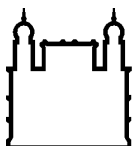
AVALIAÇÃO DA VACINA TRIVALENTE INATIVADA ANTI-INFLUENZA DAS TEMPORADAS DE 2018, 2019 E 2020: IMPACTO DA OBESIDADE, IDADE E IMUNIDADE PRÉVIA

ORIENTADORA: Dra. Cristiana Couto Garcia

EXAMINADORES:

Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto - Presidente	(IOC-Fiocruz)
Dra. Flávia Barreto dos Santos	(IOC-Fiocruz)
Dr. Alexandre Vieira Machado	(René Rachou-Fiocruz)
Dr. Olindo Assis Martins Filho	(René Rachou -Fiocruz)
Dra. Vanessa Salete de Paula	(IOC-Fiocruz)

Rio de Janeiro, 31 de Maio de 2021



Ministério da Saúde

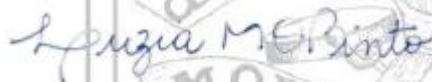
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de Artur Silva Vidal Capão, sob orientação da Dr^a. Cristiana Couto Garcia. Ao trigésimo primeiro dia do mês de maio de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "Avaliação da Vacina Trivalente Inativada Anti-influenza das Temporadas de 2018, 2019 e 2020: Impacto da Obesidade, Idade e Imunidade Prévia", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia e Patogênese de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Flávia Barreto dos Santos– IOC/FIOCRUZ, Dr. Alexandre Vieira Machado – FIOCRUZ/MG, e como suplentes: Dr. Olindo Assis Martins Filho- FIOCRUZ/MG e Dr^a. Vanessa Salette de Paula - IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 31 de maio de 2021.



Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Presidente da Banca):



Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora, Dra. Cristiana Couto Garcia, pelo enorme e constante apoio, pelas oportunidades oferecidas, pela sua dedicação, disponibilidade e pelas inúmeras contribuições para o meu desenvolvimento como cientista.

À coordenação e ao corpo docente do programa de pós-graduação em Biologia Parasitária pela excelente qualidade de ensino provido e oportunidades de aprendizagem oferecidas.

À toda a equipe do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (IOC), pelo suporte em todas as etapas da realização do projeto, pelas valiosas contribuições e pela oportunidade de realizar um projeto de pesquisa em um laboratório de referência nacional, especialmente à Dra. Marilda Siqueira, Dra. Bráulia Caetano, Dra. Paola Resende, Dr. David Brown, Dra. Maria de Lourdes Oliveira, Jalusy Bezerra, Tânia Andrade e Jonathan Lopes.

Aos meus colegas discentes no Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo, Thiago Sousa, Thayssa Keren e Jéssica Martins, pelo apoio no recrutamento de voluntários, processamento de amostras e apoio moral.

Ao Ronaldo Lopes e à Aline Santos do Laboratório de Flavivírus (IOC), pelo apoio na realização das coletas de amostras e à Dra. Luzia Pinto do Laboratório de Imunologia Viral (IOC), por providenciar reagentes e materiais de bancada.

Aos meus pais pelo apoio e carinho que sempre providenciaram.

Ao Dr. Eduardo Ferreira Borba e ao Dr. Francisco Felliipe Claudino Formiga do Departamento de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), pela valiosa oportunidade de colaboração.

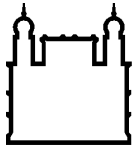
À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento que permitiu a colaboração realizada com os pesquisadores da USP.

Ao Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria (ENSP) e à Dra. Valéria Lino pela colaboração no recrutamento de voluntários e obtenção de amostras.

Aos membros constituintes da Banca examinadora, pela sua disponibilidade em contribuir para este trabalho e pelas suas certamente valiosas contribuições.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz), instituição de pesquisa prestigiosa que possibilitou todo o desenvolvimento deste projeto e o meu processo de formação científica.

Aos voluntários do estudo, dispostos a contribuir para a ciência e sem os quais este trabalho não seria possível.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

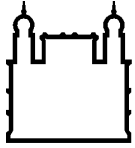
AValiação DA VACINA TRIVALENTE INATIVADA ANTI-INFLUENZA DAS TEMPORADAS DE 2018, 2019 E 2020 no Brasil: IMPACTO DA OBESIDADE, IDADE E IMUNIDADE PRÉVIA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Artur Silva Vidal Capão

Os vírus influenza ocasionam 290 a 650 mil mortes mundialmente durante suas epidemias anuais, sendo assim de especial relevância para a saúde pública. A sua alta taxa de mutação faz com que seja necessário reformular anualmente a vacina. Apesar da vacinação ser a melhor ferramenta para o seu controle, apresenta variações de eficácia, com grandes diferenças entre temporadas e entre estirpes e com a possibilidade de não concordância entre estirpes vacinais e circulantes. Além disso, a literatura apresenta indícios de respostas reduzidas em certas populações de risco, como idosos e obesos, bem como em indivíduos previamente vacinados contra a influenza. Considerando estes fatores, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de voluntários à vacina trivalente inativada anti-influenza nas temporadas de 2018, 2019 e 2020 no Brasil, observando-se a influência que a idade, obesidade e imunidade prévia podem ter na resposta vacinal. Para tal, foram realizados ensaios de inibição da hemaglutinação, avaliando-se os títulos de anticorpos ao longo dos anos, e procurando-se comparar as populações de jovens versus idosos, eutróficos versus obesos e avaliando-se a influência da imunidade prévia na resposta vacinal, bem como avaliando a resposta frente a estirpes vacinais de anos anteriores e estirpes circulantes representativas. A partir dos títulos de inibição de hemaglutinação, foram avaliadas as métricas de soroproteção e soroconversão. Observamos que a vacina foi capaz de induzir altos níveis de soroproteção pós-vacinais (>84%), apesar da soroconversão baixa em comparação com a literatura (13-43%). A vacina foi capaz de induzir proteção cruzada tanto para estirpes componentes anteriores da vacina e estirpes circulantes representativas, novamente com altos índices de soroproteção. Em 2018, foi observada uma resposta mais intensa para o componente anterior do que o componente vacinal de H3N2. A proteção induzida pela vacina perdurou durante a temporada de influenza, mas realçou a necessidade de vacinação anual. A análise de títulos contra o componente de H3N2 de 2018 em uma outra coorte, da USP, apontaram padrões semelhantes aos observados na coorte original. O acompanhamento dos voluntários sugeriu alta eficácia vacinal. Identificamos que as populações obesas, idosas, previamente vacinadas e soroprotegidas previamente à vacinação apresentam uma resposta parcialmente reduzida para alguns componentes vacinais. Os mecanismos responsáveis por estas variações na resposta precisam ser estudados, determinando-se o seu impacto na resposta vacinal, devendo a avaliação da vacina ser contínua para permitir o seu aprimoramento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF THE INACTIVATED TRIVALENT ANTI-INFLUENZA VACCINE EM THE 2018, 2019 AND 2020 SEASONS: IMPACT OF OBESITY, AGE AND PREVIOUS IMUNITY

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Artur Silva Vidal Capão

Influenza viruses are responsible for 290 to 650 thousand deaths worldwide during their annual epidemics, thus representing an important public health concern. Due to their high mutation rates, the vaccine needs to be reformulated each year. Vaccination is considered to be the best tool available for influenza control, but there are still variations in its efficacy, with large differences between seasons and strains, with the possibility of miss-match between vaccine and circulating strains. In the literature, there is evidence of reduced efficacy in certain at-risk populations, such as the elderly or obese, as well as previously vaccinated individuals. Based on those factors, the objective of this study was to evaluate the response to the inactivated trivalent influenza vaccine in the 2018, 2019 and 2020 seasons in Brazil, determining the influence that age, obesity and previous immunity can have on vaccine response. To accomplish that, hemagglutination inhibition assays were performed, enabling us to evaluate antibody titers over time, to compare the young versus elderly and normal weight versus obese populations, as well as evaluating the impact of previous immunity on vaccine response, regarding each year's vaccine strains, past years vaccine strains and representative circulating strains. Using the antibody titers, we were able to evaluate the seroconversion, seroprotection and fold-increase metrics. We observed that the vaccine induced high post-vaccination seroprotection levels (>84%), even if seroconversion was low compared to the literature (13-43%). The vaccine was able to induce cross-protection to both circulating strains and past years vaccine strains, with high levels of post-vaccination seroprotection. In 2018, we observed a more intense response to the previous years vaccine component than the 2018 vaccine component for H3N2. The protection induced by the vaccine lasted for the duration of an influenza season, but our results emphasize the necessity of annual vaccination. The analyses of antibody titers against the 2018 H3N2 vaccine component in a different study population (USP population), indicated similar atypical patterns as we had observed in our own population. Volunteer follow-up indicated high vaccine efficacy. We observed that the obese, elderly, previously vaccinated and seroprotected previously to vaccination populations had a partially reduced response to certain vaccine strains. Vaccine response evaluation needs to be continuous and the mechanisms responsible for these variations in vaccine response need to be studied and their impact on vaccine response determined, in order to permit the continuous improvement of influenza vaccines.

ÍNDICE

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
ÍNDICE.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XVI
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Classificação e nomenclatura viral.....	1
1.2 Evolução viral	2
1.3 História da Influenza.....	3
1.4 Epidemiologia da Influenza.....	7
1.4.1 Fatores relacionados à ocorrência de influenza.....	7
1.4.2 Vigilância dos vírus de Influenza.....	11
1.5 Multiplicação viral.....	12
1.6 Transmissão viral e manifestações clínicas da influenza.....	15
1.7 Resposta Imune.....	16
1.8 Patogênese.....	19
1.9 Antivirais.....	21
1.10 Prevenção.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Aspectos Éticos.....	31
4.2 Desenho de estudo e recrutamento de voluntários.....	31
4.3 Obtenção das amostras de soro e plasma.....	32

4.4 Obtenção da suspensão de hemácias de cobaio.....	33
4.5 Cultura e expansão celular.....	33
4.6 Cultura e expansão viral.....	34
4.7 Ensaio de hemaglutinação.....	35
4.8 Tratamento das amostras de soro e plasma.....	35
4.9 Titulação reversa.....	36
4.10 Ensaio de inibição da hemaglutinação.....	36
4.11 Acompanhamento de voluntários, coleta de amostra de <i>swab</i> de naso-faringe e imunofluorescência.....	40
4.12 Extração de RNA.....	41
4.13 Detecção por RT-PCR.....	41
4.13 Sequenciamento de HA.....	42
4.14 Análise dos resultados.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1 Títulos de anticorpos anti-hemaglutinina dos diferentes componentes vacinais induzidos pela TIV em 2018, 2019 e 2020.....	43
5.2 Níveis de soroproteção (SP), antes e após a vacinação, e de soroconversão (SC) em relação aos vírus componentes da vacina de 2018, 2019, 2020	45
5.3 Avaliação da proteção cruzada induzida pela TIV.....	47
5.4 Títulos de anticorpos contra os componentes vacinais ao longo dos anos em voluntários.....	51
5.5 Avaliação de infecção após a vacinação.....	52
5.6 Comparação dos Títulos de anticorpos, índices de SP e SC contra o vírus A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2) entre a coorte de 2018 e uma coorte de indivíduos saudáveis de São Paulo.....	53
5.7 Avaliação de fatores que afetam a resposta à TIV.....	56
5.7.1 Comparação das taxas de soroconversão, títulos de anticorpos e razão entre títulos pós e pré-vacinais entre a população soroprotetida previamente à vacina e a população não soroprotetida.....	56
5.7.2 Comparação das taxas de soroconversão, soroproteção,	

títulos de anticorpos e razão entre títulos pós e pré-vacinais entre a população previamente vacinada para influenza e a população vacinada pela primeira vez.....	59
5.7.3 Comparação das taxas de soroconversão, títulos de anticorpos e razão entre títulos pós e pré-vacinais entre a população eutrófica e obesa.....	63
5.7.4 Comparação das taxas de soroconversão, títulos de anticorpos e razão entre títulos pós e pré-vacinais entre a população idosa e a população jovem.....	66
5.7.5 Análises Multivariadas.....	71
6. DISCUSSÃO.....	73
7. PERSPECTIVAS.....	81
8. CONCLUSÕES.....	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
10 ANEXO 1.....	112
11.1 APÊNDICE 1.....	117
11.2 APÊNDICE 2.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo demonstrando alguns dos acontecimentos mais relevantes na história dos vírus de influenza.....	7
Figura 2: Sazonalidade dos vírus de influenza.....	10
Figura 3: Ciclo de Replicação de vírus de influenza.....	15
Figura 4: Mecanismo de ação dos anticorpos anti-influenza.....	19
Figura 5: Abundância relativa das proteínas estruturais do influenza e a porcentagem de anticorpos para elas direcionadas.....	23
Figura 6: Fluxograma esquematizando o desenho do estudo.....	32
Figura 7: Fluxograma do número de voluntários e coletas realizadas ao longo de 2018, 2019 e 2020.....	33
Figura 8: Esquema representativo do princípio do ensaio de Inibição da Hemaglutinação.....	36
Figura 9: Ilustração representativa de uma placa de microtitulação com os conteúdos finais de todos os poços em um ensaio de HI.....	39
Figura 10: Interpretação dos ensaios Hemaglutinação e Inibição da Hemaglutinação.....	39
Figura 11: Placa de ensaio de inibição da hemaglutinação.....	40
Figura 12: Títulos de HI para os componentes vacinais de cada ano.....	44
Figura 13: Razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de cada ano.....	46
Figura 14: Comparativo entre os índices de soroproteção de componentes da vacina em cada em cada ao de estudo e o respectivo componente de anos anteriores.....	47
Figura 15: Comparativo entre as taxas de soroconversão entre os componentes da vacina em cada em cada ao de estudo e o respectivo componente de anos anteriores	48
Figura 16: Comparativo entre a razão entre títulos pós e pré-vacinais em relação a estirpes componentes da vacina em cada em cada ao de estudo e o respectivo componente de anos anteriores.....	49
Figura 17: Índices de soroproteção 21 dias e 6 meses após a vacinação para todas as estirpes analisadas no ano de 2018.....	51
Figura 18: Dinâmica dos anticorpos induzidos pela vacinação nos	

voluntários acompanhados no estudo ao longo dos anos.....	52
Figura 19: Razão entre títulos pós e pré-vacinais nas populações USP e Fiocruz	55
Figura 20: Comparativo entre a razão entre títulos pós e pré-vacinais entre as populações soroprotegidas previamente à vacinação (SPV) e não soroprotegidas previamente à vacinação (NSPV).....	57
Figura 21: Frequência de soroconversão na população soroprotegida previamente à vacinação (SPV) comparativamente à não soroprotegida previamente à vacinação (NSVP).....	58
Figura 22: Títulos de inibição da hemaglutinação (HI) para os componentes vacinais de 2018 e 2019 nas populações previamente vacinadas (VA) e vacinadas pela primeira vez (NVA).....	60
Figura 23: Razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de 2018 e 2019 nas populações previamente vacinadas (VA) e vacinadas pela primeira vez (NVA).....	62
Figura 24: Títulos de Inibição da Hemaglutinação para as estirpes componentes da vacina em 2019 nas populações eutróficas (IE) e obesas (OB).....	64
Figura 25: Razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de 2019 na população obesa (OB) e eutrófica (IE).....	65
Figura 26: Títulos de Inibição da Hemaglutinação para os componentes vacinais de 2018 e 2019 nas populações jovens (<60 anos) e idosas (>60 anos).....	67
Figura 27: Razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de 2018 e 2019 na população jovem (<60 anos) e idosa (>60 anos).....	68
Figura 28: Títulos de inibição da hemaglutinação (HI) para os componentes vacinais de 2019 nas populações com 60 a 69 anos (>60) ou mais de 70 anos de idade (>70).....	70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Especificidade e abundância dos anticorpos produzidos pelos diferentes tipos de vacina anti-influenza.....	26
Quadro 2: Estirpes vacinais e circulantes de vírus influenza testadas no estudo em cada ano.....	38
Tabela 1: Características das coortes estabelecidas para a avaliação do impacto da obesidade, idade e imunidade prévia após imunização com a vacina trivalente inativada de para influenza nas temporadas de 2018, 2019 e 2020.....	43
Tabela 2: Porcentagens de soroproteção pré-vacinal (S1), pós-vacinal (S2) e soroconversão para os componentes vacinais, por ano de análise.....	45
Tabela 3: Valores de soroproteção, soroconversão e aumentos nos títulos de inibição de hemaglutinação pré-vacinais para estirpes circulantes e vacinais (n=48) em 2019.....	50
Tabela 4: Valores de soroproteção pré (SP S1) e pós-vacinal (SP S2), soroconversão e aumentos nos títulos de inibição de hemaglutinação para o componente vacinal A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) na população Fiocruz e USP em 2018	54
Tabela 5: Número de indivíduos soroprotetidos (SPV) ou não soroprotetidos (NSPV) previamente à vacinação, para cada estirpe em 2018 e 2019.....	56
Tabela 6: Análises de Risco Relativo entre a variável soroproteção S1 (SP S1) e a soroproteção S2 (SP S2) e a soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019.....	58
Tabela 7: Porcentagens de soroconversão e de soroproteção pré (S1) e pós-vacinais (S2) para estirpes vacinais de 2018 e 2019 nas populações previamente vacinadas (VA) e vacinadas pela primeira vez (NVA).....	61
Tabela 8: Análises de Risco Relativo entre a variável Vacinação Prévia e a soroproteção S1 (SP S1), S2 (SP S2) e soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019.....	63
Tabela 9: Porcentagens de soroconversão e de soroproteção pré (S1) e pós-vacinais (S2) para estirpes vacinais de 2019 nas populações eutróficas (IE) e obesas (OB).....	65

Tabela 10: Análises de Risco Relativo entre a variável Obesidade e a soroproteção S1 (SP S1), S2 (SP S2) e soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019.....	66
Tabela 11: Porcentagens de soroconversão e de soroproteção pré (S1) e pós-vacinais (S2) para estirpes vacinais de 2018 e 2019 nas populações jovens (<60 anos) e idosas (>60 anos).....	69
Tabela 12: Análises de Risco Relativo entre a variável Idade e a soroproteção S1 (SP S1), S2 (SP S2) e soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019.....	71
Tabela 13: Análises de Risco Relativo entre as variáveis Comorbidade, Sexo e Gripe Recente e as variáveis soroproteção S1 (SP S1), S2 (SP S2) e soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AS	Ácidos Siálicos
BR	B/Brisbane/60/2008 (Victoria)
BRI	A/Brisbane/02/2018 (H1N1)
BSA	Albumina bovina, do inglês <i>Bovine serum albumin</i>
CA	A/California/7/2009(H1N1)
CO	B/Colorado/06/2017(Victoria)
DMEM	Meio Essencial Modificado de Dulbecco
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
GMT	Média geométrica dos títulos de inibição da hemaglutinação
HA	Hemaglutinina dos vírus influenza
HAI	Ensaio de inibição da hemaglutinação
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico)
HI	Inibição da hemaglutinação
HK	A/Hong Kong/4801/2014(H3N2)
HPAI	Highly pathogenic avian influenza
IFN	Interferons
IL	Interleucinas
IMC	Índice de massa corporal
ISG	Gene estimulado por interferons
FLUV	Vírus de influenza
LVRS	Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo
M	Proteína de Matriz
MDCK	Células provenientes de rim canino de Madin-Darby
MI	A/Michigan/45/2015(H1N1)
NA	Neuraminidase dos vírus influenza
NEP	do inglês <i>Nuclear Export Protein</i>
NOD	do inglês <i>Nucleotide oligomerization domain</i>
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína não estrutural 1, do inglês <i>Non-Structural Protein 1</i>
NSPV	Não soroprotetidos previamente à vacinação
NVA	Vacinados pela primeira vez no ano de estudo
OB	Indivíduos obesos
PH	B/Phuket/3073/2013(Yamagata)

IE	Indivíduos eutróficos
PRR	do inglês <i>Pattern Recognition Receptors</i>
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RBC	Suspensão de hemácias de cobaio
RBD	Sítio de ligação do receptor, do inglês <i>receptor binding site</i> –
RDE	do inglês <i>Receptor Destroying Enzyme</i>
RIG-I	do inglês <i>Retinoic acid inducible gene-1</i>
S1	Amostra pré-vacinal
S2	Amostra 21 dias após a vacinação
S3	Amostra 6 meses após a vacinação
SA	A/SouthAustralia/34/2019
SC	Soroconversão
SFB	Soro Fetal Bovino
SI	A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016
SP	Soroproteção
SPV	Soroprotégidos previamente à vacinação
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
SW	A/Switzerland/8060/2017
TIV	Vacina Trivalente Inativada anti-influenza
TLR	do inglês <i>Toll-like receptors</i>
Tripsina-TPCK	Tripsina tratada com L-(1-tosylamido-2-fenil) etil cloromethyl cetona)
VA	Vacinados para influenza em anos anteriores ao estudo
WA	B/Washington/02/2019 (Victoria)

1 INTRODUÇÃO

Dentre os vírus respiratórios, os vírus influenza (FLUV) sempre tiveram especial relevância para a saúde pública pelo seu caráter epidêmico sazonal. Estes vírus geram grande impacto na população humana, através de pandemias ocasionais e epidemias anuais, desde a antiguidade até os tempos modernos. Mesmo com o advento da medicina moderna, com uso de antivirais e vacinas, os FLUV continuam representando um grande desafio para a saúde pública, pelas suas características discutidas ao longo deste texto.

1.1 Classificação e nomenclatura viral

Os FLUV pertencem à família Orthomyxoviridae e são compostos por quatro gêneros: *Alpha*, *Beta*, *Gama* e *Delta-influenza*, com as espécies de Influenza A, B, C e D, respectivamente, diferenciados principalmente por diferenças entre suas proteínas M1 (Matrix 1) e NP (Nucleoproteína) (1–3).

Os FLUDV não infectam humanos e os FLUCV ocasionam patologias menos graves e com menor número de casos, sendo A e B os mais clinicamente relevantes (4). Os FLUBV circulam principalmente em humanos, infectando apenas algumas outras espécies como focas, mas não possuem a capacidade de rearranjo genômico inerente aos FLUAV, e evoluem de forma mais lenta, sendo divididos em apenas duas linhagens genética e antígenicamente distintas: Yamagata e Victoria (4,5). Por outro lado, os FLUAV circulam em várias espécies para além dos humanos, como aves, suínos e cavalos, podendo ocorrer trocas genéticas entre as variadas estirpes zoonóticas e humanas. Os FLUV são vírus envelopados, contendo as glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (6). O genoma dos vírus A e B é composto de RNA de fita simples senso-negativo, segmentado em oito fragmentos que codificam pelo menos uma proteína viral cada, mas podendo sofrer processos de *splicing* alternativo, gerando outras proteínas menos comuns e estirpes dependentes (2,3).

A nomenclatura dos FLUV segue uma convenção internacional, permitindo a sua padronização. Os diferentes FLUV possuem em comum alguns aspectos da sua nomenclatura: a indicação do tipo antigênico (A, B, C ou D), a origem geográfica, o número atribuído à estirpe isolada no laboratório e o ano em que ocorreu o isolamento

(4). Para estirpes de origem animal, o nome do hospedeiro de onde foram isoladas também é incluído, podendo ainda serem classificadas como estirpes de baixa ou alta patogenicidade (4). Os subtipos de FLUAV são também classificados de acordo com as variações de HA e NA, existindo 18 subtipos de HA e 11 de NA, mas apenas os subtipos contendo H1, H3, N1 ou N2 infectam frequentemente humanos, podendo ocorrer ocasionalmente infecções por outros subtipos de origem aviária, como por exemplo, o H5N1 e H7N9 (3,4,7). Pode-se observar como exemplo da classificação de FLUAV as estirpes A/Michigan/45/2015(H1N1)pdm09 e A/Singapore/ INFIMH-16-0019/2016(H3N2), sendo que o sufixo pdm09, refere-se à estirpe pandêmica de 2009.

Os FLUBV se distinguem em duas linhagens (Victoria e Yamagata), sendo estas genética e antigenicamente distintas quanto aos seus clados de HA, devendo-se esta reduzida variação, à sua menor taxa de mutação e não ocorrência de rearranjo genômico (*shift*) (4,8–11). Dessa forma, a nomenclatura dos FLUBV inclui a linhagem ao invés de subtipos de HA e NA, podendo ser exemplificada por B/Phuket/3073/2013(Yamagata) e B/Brisbane/60/2008 (Victoria).

1.2 Evolução viral

Os subtipos de FLUAV são originados devido à sua grande capacidade de mutação, ocorrendo este processo pelos mecanismos de mutação pontual (*antigenic drift*) e de rearranjo genômico (*antigenic shift*) (3,12). Existem evidências de que a recombinação genômica também ocorra nos FLUV, mas este não aparenta ser um importante mecanismo de variação genética (13).

A mutação pontual (*drift*), também presente nos FLUBV, ocorre devido à RNA polimerase viral dos FLUV não possuir a capacidade de endonuclease (13). Isto resulta na incorporação arbitrária de nucleotídeos errados durante a síntese do material genético da progênie viral (13). Este mecanismo pode resultar em mutações que confirmam um aumento de *fitness* viral, como por exemplo mutações em sítios antigênicos das glicoproteínas de superfície virais, sendo então denominado de deriva antigênica (13). É por este mecanismo que se originam as estirpes de FLUV sazonais, representando estirpes com suficiente variação antigênica para se disseminar na população humana, substituindo estirpes previamente circulantes (13).

Já o rearranjo genômico (*shift*) ou rearranjo é um processo pelo qual duas estirpes de FLUAV que co-infectem a mesma célula podem trocar segmentos de RNA durante

a montagem dos vírions, podendo dar origem a uma nova estirpe (13). O rearranjo pode ocorrer de forma intra ou inter-subtipo, inclusive entre estirpes de FLUV que infectam espécies animais diferentes, que podem assim adquirir a capacidade de infectar humanos, gerando novas estirpes com grande potencial pandêmico (3,12,14). A constante e gradual variação antigênica resultante da mutação pontual confere aos FLUV a sua capacidade de disseminação para um grande número de pessoas em curto período de tempo, causando as epidemias anuais. Por outro lado, as pandemias, ou seja, a rápida disseminação de um novo FLUAV a nível mundial, infectando um percentual significativo da população e possuindo um acentuado aumento de mortalidade, são geralmente resultantes do processo de rearranjo genômico (*shift*) (12). Os novos subtipos virais podem então rapidamente disseminar-se na população se estas mutações resultarem em um aumento de adaptação ou *fitness* do FLUV (15). Devido à falta de imunidade em relação aos novos subtipos na população humana em geral, estes podem tornar-se dominantes na população, substituindo os vírus previamente em circulação, como ocorrido na pandemia de 2009 pelo FLUAV(H1N1)pdm09 (3,12,15).

1.3 História da influenza

As pandemias de influenza representam uma importante preocupação para a Saúde Pública, tendo-se como exemplo as pandemias de 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) e 2009 (H1N1pdm09), sendo a de 1918 considerada uma das pandemias com maior número de mortes mundialmente, com estimativas de 40 a 50 milhões de óbitos (12,16,17).

Os primeiros indícios dos FLUV na história da humanidade datam de até 430 anos antes de Cristo, sendo os seus sintomas e até o seu carácter sazonal, descritos em textos de Hipócrates (18,19). É provável que os FLUV estejam em circulação na população humana desde a antiguidade, mas é difícil encontrar provas definitivas nos dias de hoje. Por exemplo, observa-se o caso da possível introdução dos FLUV nas Américas por Cristóvão Colombo em 1493, contribuindo para a devastação da população nativa, que não estaria protegida contra este novo patógeno, destacando-se desde então a capacidade dos FLUV de influenciarem a história da humanidade de forma significativa (20). A história da influenza apenas se torna mais clara nos anos recentes, contada através das grandes pandemias que deixaram marcas indeléveis, sendo uma suposição provável que as epidemias tenham ocorrido de forma contínua ao longo da história, com relatos mais confiáveis descrevendo epidemias a partir do

ano 1173 (12,21). Nos últimos dois séculos, o intervalo entre cada pandemia de influenza nunca excedeu 50 anos, ocorrendo de forma periódica, sendo que a pandemia mais antiga ocorreu em 1580, seguindo-se as pandemias de 1729, 1781, 1830 e 1898. No entanto, não existem evidências suficientes nos dias atuais para analisar-se os vírus responsáveis de forma decisiva, sendo que a primeira pandemia sobre a qual existem evidências que permitem uma certa análise foi a gripe russa ou Asiática em 1889, com autores destacando a possibilidade de o agente etiológico ser os vírus influenza A H3N8 ou H2N2 (18).

Posteriormente, ocorreu a gripe espanhola, a pandemia de H1N1 de 1918. Esta foi uma das pandemias mais devastadoras da história da humanidade, com estimativas de mais de 50 milhões de mortos no mundo e afetando indivíduos jovens de forma desproporcionada, demonstrando o assustador potencial destes vírus (22). Desta forma, o H1N1 foi introduzido na população humana, circulando de forma epidêmica até 1957, quando ocorreu a pandemia pela gripe asiática, causada pelo subtipo H2N2, que substituiu os H1N1 na população humana e com mortalidade estimada em 1,1 milhão de indivíduos (12,18,22,23).

O H1N1 que originou a pandemia de 1918 teve o seu genoma sequenciado recentemente e foi observado que provavelmente este vírus também teve origem a partir de eventos de rearranjo genômico entre estirpes suínas, aviárias e humanas (24,25). Apesar de esta estirpe demonstrar-se particularmente virulenta, deve-se levar em consideração outros fatores ao se comparar esta pandemia com a pandemia mais recente de 2009, como a ausência de vacinas, antivirais e medidas de cuidado de pacientes como ventilação mecânica, bem como o cenário imposto pela Primeira Guerra Mundial (24,25).

Outro fator importante são os antibióticos, considerando-se que co-infecções ou infecções secundárias bacterianas foram um importante fator na mortalidade por influenza durante a pandemia de 1918 (24,26). Na verdade, em 1918 o agente etiológico da gripe ainda não era conhecido, sendo a pandemia atribuída a uma bactéria frequentemente isolada dos pacientes (*Haemophilus influenzae*), com os primeiros FLUV apenas caracterizados em 1931 em suínos e em 1933 em humanos (24,27,28).

Em 1936 foram desenvolvidas as primeiras vacinas para influenza, com três métodos diferentes: vacinas de vírus atenuado cultivado em tecidos pulmonares de camundongos, ou cultivado em ovos embrionados de galinha e vacina inativada cultivada em ovos embrionados de galinha (29). Em 1940 foram isolados, pela

primeira vez, estirpes de influenza B e foram então produzidas vacinas trivalentes inativadas, que foram legitimadas durante seu amplo uso pelo complexo militar dos Estados Unidos da América durante a Segunda Guerra Mundial (29). Em 1945 a vacina inativada foi aprovada para uso em civis, ainda utilizando o método de cultura em ovos embrionados que é comumente utilizado até hoje (29,30). A capacidade de variação antigênica e a necessidade de atualizar as vacinas já havia sido proposta em 1936, mas só na temporada de 1947, quando a vacina não foi capaz de oferecer proteção, é que isto foi comprovado (29).

Na pandemia de 1968, conhecida como a gripe de Hong-Kong, ocorreu a introdução do subtipo H3N2 na população humana, que veio por sua vez substituir o H2N2 em circulação, com uma mortalidade estimada em 1 milhão de pessoas (31). Em 1977 ocorreu uma nova pandemia por H1N1 (gripe russa), passando então a co-circular dois subtipos de FLUAV, H1N1 e H3N2, mas sendo esta pandemia caracterizada por uma taxa de mortalidade baixa em relação às outras (32,33). Assume-se que os vírus de FLUBV tenham co-circulado com as estirpes de FLUAV durante este período sem, no entanto, ocasionar pandemias, divergindo-se nas duas linhagens, Yamagata e Victoria, na década de 1970 (11).

A capacidade das novas estirpes pandêmicas de substituírem as estirpes previamente em circulação deve-se não só ao *fitness* viral de cada estirpe, como também a sua capacidade de induzir respostas de proteção cruzada na população ao apresentarem tipos de HA ou NA em comum, potencialmente induzindo processos de *backboosting* (34). A exposição à nova estirpe nas populações mais velhas ou até mesmo a produção de anticorpos direcionados às regiões conservadas da HA, pode explicar o observado durante as pandemias de 1957 e 1968, com a substituição dos subtipos em circulação, bem como a posterior co-circulação de H1N1 e H3N2 em 1977, sendo que estas duas estirpes eram mais antigenicamente distintas entre si permitindo que circulassem concomitantemente. Estes mecanismos também possibilitam explicar o observado na pandemia de 2009, detalhada abaixo, que apresentou um número relativamente baixo de óbitos, ocorrendo estes principalmente nas populações mais jovens.

No século 21, apenas uma pandemia de influenza foi registrada, ocorrendo no ano de 2009 e sendo inicialmente chamada de gripe suína. Esta pandemia foi novamente ocasionada por uma estirpe de H1N1 que substituiu as estirpes de H1N1 previamente em circulação, possuindo a denominação de pdm09 (pandemia 2009) em sua nomenclatura (35). Esta estirpe foi primeiramente detectada nos Estados

Unidos da América, rapidamente disseminando-se pelo país e pelo mundo (36). Apesar de originalmente assumir-se origem asiática, pelas condições locais propícias, evidências mais recentes indicam que a sua origem possa ter sido no México (37,38). Estudos apontam que a estirpe responsável pela pandemia foi fruto de diversos eventos de rearranjo genômico entre estirpes suínas, humanas e aviárias, dando assim origem a uma estirpe inédita na população humana de assumida origem suína (37,38).

Contrariamente ao que geralmente é observado nos FLUV sazonais, a estirpe pandêmica de 2009 afetou desproporcionalmente indivíduos jovens (39,40). Uma possível explicação para este fato reside na exposição prévia dos indivíduos, com pessoas acima de 60 anos tendo maior probabilidade de terem sido expostos aos vírus H1N1 decorrentes da pandemia de 1918 que circularam até 1957, possuindo alguma imunidade prévia devido à proteção cruzada, enquanto que indivíduos jovens que foram expostos aos H1N1 decorrentes da gripe russa, que circulavam de forma sazonal, não possuíam imunidade prévia por estes serem mais antigenicamente distantes da estirpe pandêmica (41,42).

A vacinação com estirpes sazonais também não foi capaz de induzir proteção contra esta estirpe pandêmica, mas rapidamente foi produzida uma vacina monovalente para a nova estirpe com alta eficácia (41). Ainda assim, estima-se que no primeiro ano de circulação a pandemia resultou em aproximadamente 61 milhões de casos e 12 mil mortes apenas nos Estados Unidos da América, com estimativas que de 152 a 575 mil mortes globalmente, apesar destes dados provavelmente subestimarem a realidade, estimando-se que mais de 20% da população tenha sido infectada (35,39–41).

Além dos vírus pandêmicos, FLUV de origem aviária podem ocasionar surtos em humanos, causando casos leves a moderados, como no caso de H9N2, ou podem possuir uma elevada mortalidade, como no caso de H5N1 ou H7N9 (43–45). Estirpes aviárias tendem a possuir como reservatórios espécies de aves aquáticas, incluindo espécies migratórias, ocorrendo eventos de *spillover* para as populações de aves de criação, como galinhas, podendo tornar-se endêmicos se não controlados (43). Por estes motivos, e pelas características dos processos de criação destas aves, a erradicação destas estirpes torna-se difícil. Os casos detectados ocorreram por contato direto ou indireto com aves infectadas, não existindo ainda evidências de transmissão humano-humano sustentável, mas milhares de casos e centenas de óbitos já foram relatados na população humana, com estudos sorológicos

demonstrando uma elevada exposição entre indivíduos expostos a estas aves (43–45). No entanto, alguns estudos apontam que seria necessária a mudança de apenas um aminoácido para conferir a mudança da especificidade da ligação HA/AS, o que faria com que estirpes zoonóticas tivessem a capacidade de infectar humanos, mudando o seu tropismo de AS α -2,3 para α -2,6 (46,47). O monitoramento constante desses episódios e do potencial pandêmico desses vírus é realizado pelos centros colaboradores da Organização Mundial da Saúde. Na Figura 1, pode-se observar os principais eventos da história dos FLUV.

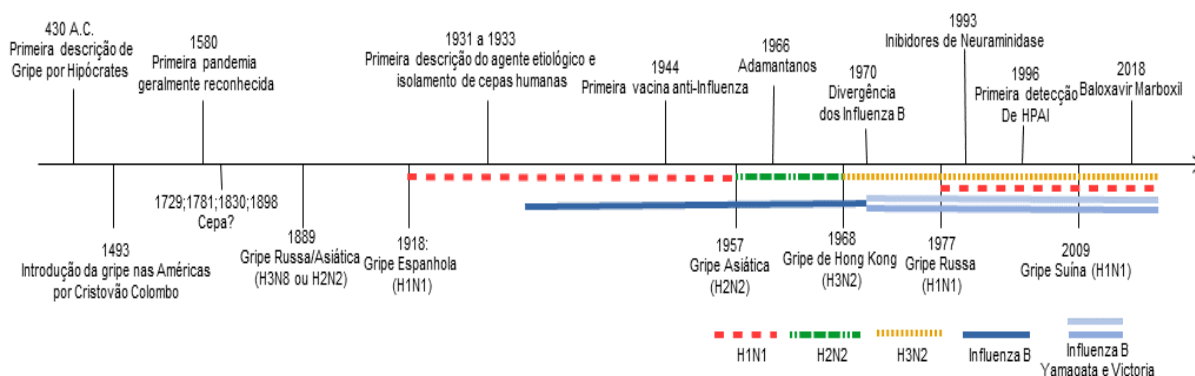


Figura 1: Linha do tempo demonstrando alguns dos acontecimentos mais relevantes na história dos vírus de influenza.

Fonte: Capão, Artur. 2021.

1.4 Epidemiologia da influenza

1.4.1 Fatores relacionados à ocorrência de influenza

Os FLUV possuem uma sazonalidade distinta, sendo bem documentada a ocorrência de picos anuais do número de casos nos meses de inverno, com baixo número de casos ao longo do ano, em países situados em zonas temperadas (48). Nos países tropicais, esses padrões não são tão evidentes, existindo evidências de picos em meses chuvosos ou então dois picos anuais, nos meses de chuva e de inverno, ocorrendo também uma maior distribuição do número de casos ao longo do ano (48,49). Várias hipóteses já foram propostas para explicar esta sazonalidade dos FLUV, no entanto, os mecanismos responsáveis não estão completamente elucidados, sendo provável que um conjunto diverso de fatores, tanto ambientais como do vírus e do hospedeiro, influenciem estes padrões de circulação (50).

Em relação ao hospedeiro, pode-se considerar certas alterações comportamentais nos meses de inverno e de chuvas, como uma maior agregação de pessoas em

ambientes fechados e em proximidade (48,51). Outro fator que deve ser considerado é a intensidade e duração da exposição à luz solar, especificamente à radiação ultravioleta-B (UV-B). A exposição à UV-B é essencial para a produção de vitamina D, uma molécula com importantes funções fisiológicas e moduladora do sistema imune, existindo inclusive indícios de uma correlação negativa entre a exposição à UV-B e as epidemias de FLUV, mas não sendo esta variável capaz de explicar exclusivamente a sazonalidade dos FLUV (48,52). Também existem evidências de que a inalação de ar frio diminui a atividade metabólica celular, diminuindo a frequência dos movimentos ciliares e a secreção de muco (53). A baixa umidade absoluta no ar, encontrada frequentemente nos meses de inverno, também possui um impacto na susceptibilidade aos FLUV, reduzindo a depuração mucociliar, capacidade antiviral de imunidade inata nas vias respiratórias e mecanismos de reparo tecidual locais (54).

Em zonas temperadas é comum o aquecimento artificial de ambientes internos, com diminuição da umidade relativa como consequência. É também interessante notar a possibilidade de as baixas temperaturas induzirem uma maior liberação de partículas virais (*shedding*) em cobaias (55). Outra molécula com importante papel imunomodulatório e potente função anti-inflamatória e antioxidante é a melatonina, podendo as suas vias também serem moduladas pelos vírus para exacerbação do processo inflamatório (56). A relação entre ciclo circadiano, exposição ao sol, produção de melatonina e outros fatores que modulam a sazonalidade dos FLUV é complexa, mas esta pode ser mais uma variável com influência na sazonalidade dos FLUV (56–58).

Uma outra perspectiva que deve ser considerada é o impacto destas variáveis ambientais nas partículas virais propriamente ditas. Temperaturas baixas, em torno de 5°C, demonstram-se mais favoráveis para a transmissão dos FLUV, enquanto que temperaturas altas, de aproximadamente 30°C diminuem a capacidade de transmissão (51). Outra variável a ser considerada é a umidade relativa do ar, com indícios de que baixa umidade (<50%) e alta umidade (~100%) são mais favoráveis, com as faixas intermediárias diminuindo a capacidade de persistência das partículas virais no ambiente (50).

Com base nestas evidências foi então proposto um modelo, no qual as epidemias de influenza estão relacionadas ou a épocas frias e secas ou a épocas chuvosas, com alta umidade, sendo que em regiões onde não ocorrem estas variações climáticas tão marcantes os casos de influenza estão mais uniformemente distribuídos ao longo do ano (Figura 2) (48).

A atual pandemia causada pelo SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2), teve grande impacto na circulação dos FLUV no ano de 2020 e 2021 (Figura 2), provavelmente devido às medidas de distanciamento social, uso de máscaras, entre outras medidas que tem impacto na transmissão de vírus respiratórios, constituindo uma temporada atípica.

O Brasil, considerado um país tropical, apresenta 2 picos de casos de influenza ao longo do ano, um durante os meses mais frios, com maior detecção de casos de FLUBV e um maior durante a época de chuvas, para o qual a campanha de vacinação é voltada (49). No entanto, diferentes regiões do país apresentam condições climáticas variadas, com diferentes estados sendo considerados zonas temperadas, subtropicais ou tropicais, podendo explicar assim os diferentes padrões de circulação e a ocorrência de 2 picos no número de casos anuais (49). A imunidade populacional e a mutação viral para escape desta imunidade também é uma variável comumente implicada na sazonalidade dos FLUV, mas a sua influência também é dificilmente avaliada, interagindo com as outras variáveis que modulam a sazonalidade dos FLUV (59).

As epidemias sazonais causadas pelos FLUV são responsáveis pela síndrome gripal e pela síndrome respiratória aguda grave (SRAG). Estima-se uma incidência de um bilhão de casos de gripe por ano, com 3 a 5 milhões de casos evoluindo para doença grave e resultando em uma mortalidade de cerca de 290 mil a 650 mil pessoas (60,61). Deve-se também considerar o impacto financeiro, sendo estimados custos diretos de 1 a 10 bilhões e indiretos de 10 a 16 bilhões de dólares anuais nos Estados Unidos (62).

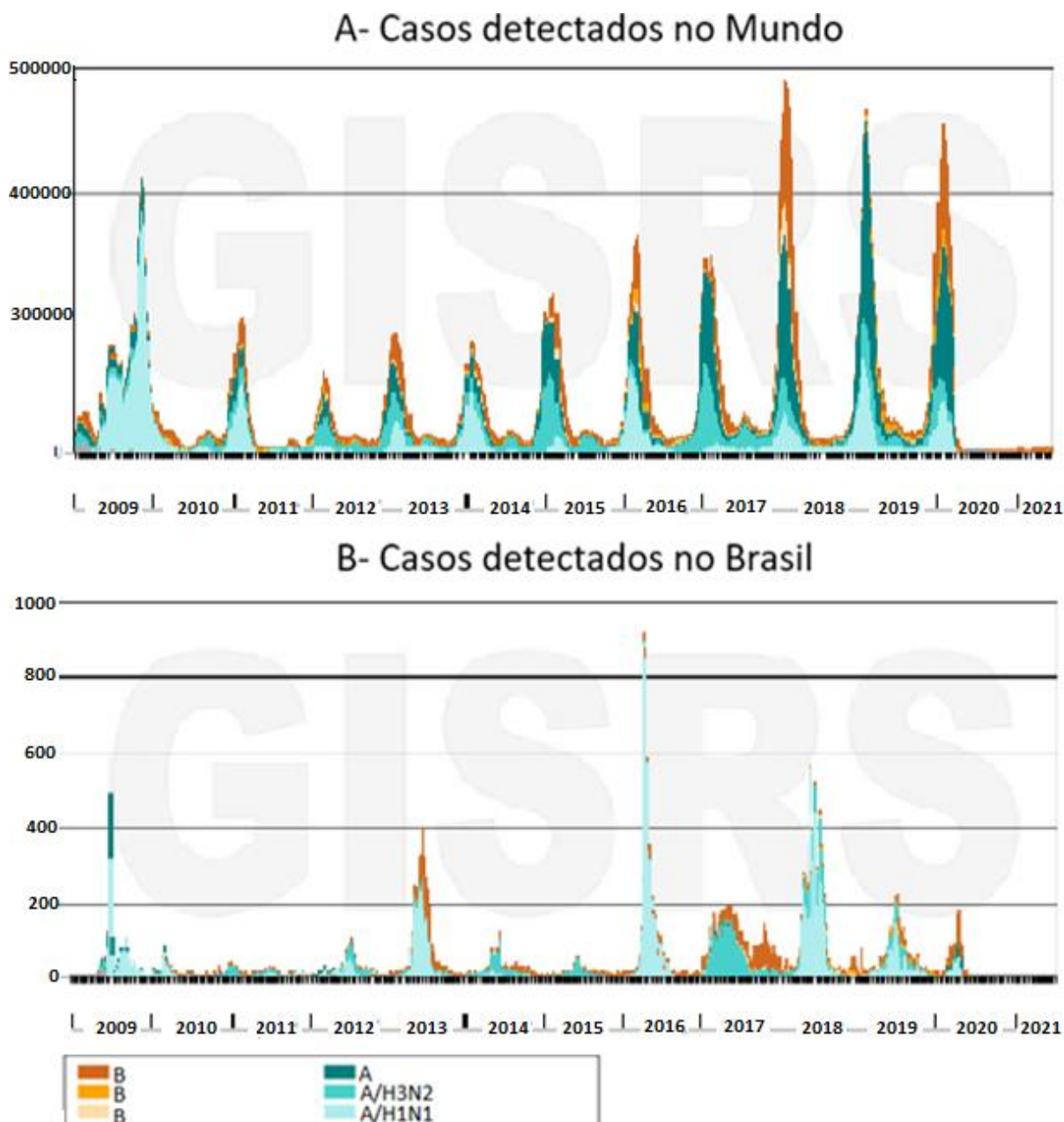


Figura 2: Sazonalidade dos vírus de influenza. Número de casos de influenza, por subtipo, no mundo (A) e no Brasil (B), entre as temporadas de 2009 e 2021, por semana epidêmica, demonstrando uma clara sazonalidade anual.

Fonte: Adaptado de WHO/GISRS. Number of specimens positive for influenza by subtype. 2021. Acessado em: 23/08/2021. Disponível em: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/charts/en/

No Brasil, foram observados aproximadamente 6754 e 5700 casos de SRAG e 1381 e 1100 óbitos por influenza, em 2018 e 2019 respectivamente, sendo maioritariamente influenza A/H1N1, seguindo-se A/H3N2 e por fim influenza B, e a maior parte dos óbitos no grupo de idosos, indivíduos com doenças cardiovasculares e indivíduos com diabetes, respectivamente, com mais de 10% dos óbitos ocorrendo no grupo de obesos (63,64). No entanto, deve-se considerar a possibilidade de estes

números representarem apenas uma porcentagem da verdadeira morbidade e mortalidade, principalmente devido à baixa testagem. Em 2020 e 2021 foram observados, até a data presente, 2567 e 436 casos de SRAG e 330 e 71 óbitos por influenza, respectivamente (65,66). Na última década, os vírus H3N2 predominaram em circulação em relação aos H1N1 apenas nas temporadas de 2014, 2015 e 2017, podendo também observar-se que algumas temporadas apresentam epidemias com número de casos maior que o normalmente observado, como em 2016 e 2018 (Figura 2).

1.4.2 Vigilância dos vírus de Influenza

Inicialmente, a influenza como doença, era uma preocupação quase exclusiva de países temperados, onde a sazonalidade distinta permitia distinguir claramente os danos causados por estes vírus (67). No entanto, não demorou muito para que a necessidade de uma vigilância global, que permitisse uma atualização confiável das vacinas, se demonstrasse essencial, algo que se torna cada vez mais relevante pela crescente interconectividade do mundo moderno (67).

Em 1947, a OMS instaurou o Programa Global de Influenza (GIP) e um dos frutos deste programa foi a criação da Sistema Global de Vigilância e Resposta a Influenza (GISRS, inicialmente GISN) que rapidamente levou à criação dos primeiros Centros Colaboradores e Centro Nacionais de Influenza (NIC) (67). O principal foco desta rede era inicialmente a detecção de estirpes para permitir a elaboração de vacinas, mas suas atividades foram se expandindo ao longo do tempo, por exemplo padronizando a nomenclatura dos vírus com base na HA e NA, introduzindo o então revolucionário diagnóstico molecular por PCR nos centros da rede ou desempenhando importantes papéis nas medidas de prevenção e vigilância de estirpes pandêmicas (67). Este programa teve importante papel na estimativa do impacto da influenza nas populações, ampliando a rede de vigilância, e induzindo a criação de mais programas de vacinação (67).

Atualmente, existem seis Centros Colaboradores e 143 NICs, sendo que três deles são brasileiros, inclusive o Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo do IOC (67). Amostras coletadas de casos suspeitos em cada unidade da rede sentinela da vigilância nacional são encaminhadas para os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) de cada estado, que enviam uma porcentagem representativa para os NICs que por sua vez enviam amostras para os Centros Colaboradores. Nos NICs, além da

confirmação do diagnóstico molecular, pode ser feita a caracterização molecular e antigênica, por ensaio de inibição de hemaglutinação (68).

Os centros colaboradores também realizam monitoramentos sorológicos e estudos de avaliação da resposta vacinal, de forma a estimar mudanças antigênicas nos vírus circulantes ao se medir a capacidade de anticorpos de indivíduos vacinados de inibir os vírus circulantes. Os soros desses estudos são trocados entre os centros colaboradores e testados contra os vírus candidatos vacinais para o próximo ano. Desta forma, a OMS consegue determinar as estirpes vacinais de cada ano para cada hemisfério, bem como desempenhar outros papéis importantes na vigilância, como detecção de resistência viral aos antivirais em uso (67).

Atualmente, o padrão ouro para diagnóstico consiste na transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) a partir de amostras coletas de *swabs* de naso e orofaringe. Alternativamente, também podem ser realizados ensaios de imunofluorescência ou isolamento viral, seguido de sequenciamento ou testes sorológicos. Para caracterização antigênica, ensaios de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação são utilizados (69).

1.5 Multiplicação viral

A adsorção dos vírus às células é o primeiro passo necessário para a infecção celular e para a replicação viral, ocorrendo por ligação da hemaglutinina (HA), uma glicoproteína de superfície presente no envelope lipídico viral, com receptores de ácidos siálicos (AS) (70).

A HA é uma glicoproteína presente na superfície dos FLUV e apresenta funções essenciais para a sua replicação, apresentando uma estrutura homotrimérica, com cada monômero possuindo um domínio globular (HA1) e uma região de haste (HA2). É na região globular que se encontra o sítio de ligação com os ácidos siálicos (RBS), uma região mais conservada por sua importante funcionalidade e que constitui assim um importante alvo de anticorpos neutralizantes (71).

A maioria dos anticorpos produzidos pelo sistema imune humano são direcionados à HA1, principalmente à região do RBS, impondo uma pressão seletiva sobre o processo de mutação e conseqüente variação antigênica, o que desempenha um importante papel na complexa dinâmica epidemiológica dos FLUV, principalmente ao se considerar que esta região é hipervariável (1,5 mutações por ano, principalmente localizadas nos sítios antigênicos) (72–74).

A região HA2 é mais conservada que a HA1, possuindo uma menor taxa de mutação, não sendo o principal alvo dos anticorpos produzidos, mas sendo capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes de amplo espectro, intra e até inter-subtipos, apesar de não ser imunodominante (73). Esta região também desempenha um papel essencial no ciclo de replicação viral através do peptídeo de fusão presente na sua estrutura, que desempenha outra função importante para a replicação viral, Figura 3.

Os AS, mais especificamente ácidos N-acetilneuroamínicos, são carboidratos de com carga negativa, associados a glicanos e glicoproteínas presentes na membrana celular, inclusive em células epiteliais do sistema respiratório humano (70,75). No entanto, outro fator determinante na especificidade desta ligação é a ligação dos AS com a estrutura na qual está ancorado, podendo a ligação ser do tipo α -2,3 (sistema respiratório inferior humano) ou α -2,6 (sistema respiratório superior) (70,76).

Já foi também observada a capacidade de certos vírus sazonais de se ligarem a ambos tipos de AS, α -2,3 e α -2,6, diferindo apenas na afinidade, inclusive com certas estirpes sazonais de H3N2 se ligando preferencialmente a α -2,3, até mesmo algumas destas estirpes com capacidade de ligação mediada pela NA (75,77,78).

Após a adsorção do vírus à célula, por ligação do RBS a um AS, ocorre a endocitose da partícula viral e a formação do endossomo, sendo a via mediada por clatrina a mais comum, mas também podendo ocorrer por macropinocitose ou via da caveolina, por exemplo, Figura 3 (79,80). A progressiva acidificação do endossomo resulta em mudanças conformacionais na HA, permitindo a exposição do peptídeo de fusão, que será inserido na camada lipídica do endossomo pela HA2, que possibilita a fusão das membranas lipídicas do vírus e do endossomo, formando um poro por onde ocorre a liberação do material genético no citoplasma (71,81).

As ribonucleoproteínas virais (vRNP) representam complexos entre cada fragmento de RNA, múltiplas moléculas de nucleoproteína e a polimerase viral (composta pelas subunidades PB1, PB2 e PA) (82). Um número variável de proteínas pode ser produzido a partir dos 8 fragmentos de RNA viral, dependendo da estirpe, sendo que já foram documentadas mais de 14 proteínas virais, resultantes de processos de *splicing* alternativo (82,83).

Os FLUV possuem uma característica pouco comum, sendo vírus de RNA que realizam a sua replicação no núcleo celular. Isto implica a necessidade de importar determinadas proteínas recentemente sintetizadas para o núcleo e de exportar os complexos de vRNP para o citoplasma.

O processo de replicação inicia-se com a transcrição primária, onde serão produzidos RNAs mensageiros, que serão exportados para o citoplasma onde ocorrerá a sua tradução. As proteínas necessárias para formação dos complexos de vRNP (PB1, PB2, PA e NP), bem como a proteína M1 e a proteína de exporte nuclear (NEP), são transportadas novamente para o núcleo onde serão associadas com os RNAs genômicos replicados. Os novos complexos de vRNP são exportados para o citoplasma com auxílio das proteínas M1 e NEP (82). As proteínas estruturais restantes produzidas durante a transcrição primária (HA, NA e M2) são carregadas para a membrana plasmática após oligomerização e glicosilação no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi (80,82). Na membrana plasmática, a HA e NA se associam com *lipid rafts*, e os vRNP e as outras proteínas virais serão montadas no vírion propriamente dito, ancorando-se no domínio interno da HA presente na membrana celular e com auxílio de interações entre M1 e M2. A NA desempenha um papel essencial ao impedir a aglomeração das partículas virais na superfície celular por ligação da HA com os AS, permitindo assim a liberação dos vírus pela sua atividade de sialidase (80,82,84). Através de mecanismos de *splicing* alternativo e *frame-shift* (mudança de matriz de leitura), os FLUV conseguem traduzir outras proteínas alternativas, dependendo da estirpe.

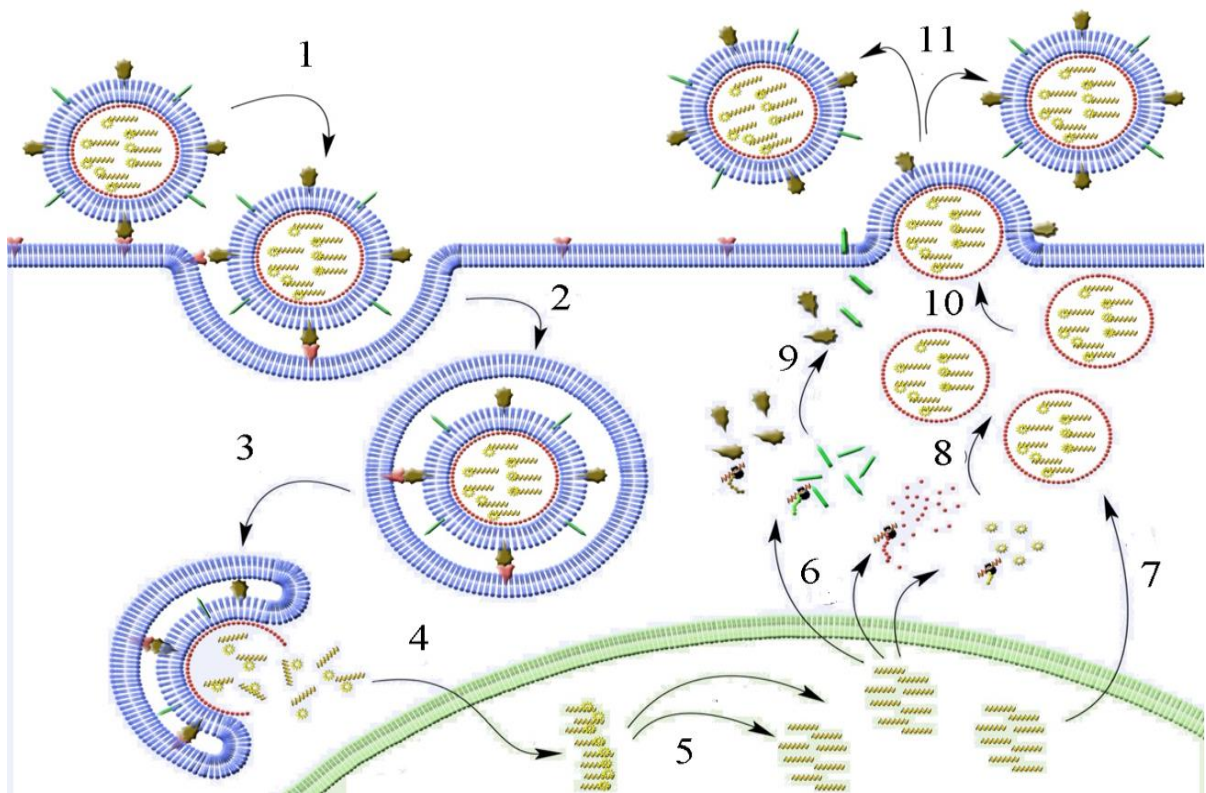
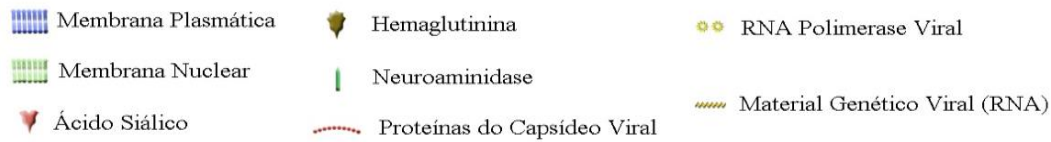


Figura 3: Ciclo de Replicação de vírus de influenza. A ocorrência da ligação entre o ácido siálico da célula e a HA (1) do vírus possibilita o processo de endocitose (2), sendo o processo de fusão endossomal também mediado pela HA, permitindo a liberação do material genético viral e suas enzimas no citoplasma (3). Ainda no endossomo a proteína M2, ativada pelo baixo pH, permite a acidificação do interior do nucleocapsídeo, dissociando a proteína M1 dos complexos de Ribonucleoproteínas virais, passo necessário para que o RNA viral e suas RNA polimerases sejam carregados para o núcleo (4), onde ocorrerá o processo de replicação (5), sendo produzidos RNAs tanto para a produção de componentes estruturais e funcionais do vírus (6 e 8) bem como para compor o material genético de futuros vírus (7). As glicoproteínas assim produzidas migram para a membrana plasmática, onde serão inseridas (9), possibilitando que o nucleocapsídeo seja externalizado por brotamento, sob a forma de um vírion completo (10), mas sendo necessária a ação da NA para clivar a ligação entre o HA e o ácido siálico da membrana para liberação da partícula viral (11).

Fonte: Adaptado de Science Education Partnership (SEP), Avian Flu Virus and Antibodies Tutorials (Não publicado). Disponível em: <http://authors.fhcr.org/363/>. Acessado em: 22/10/2018.

1.6 Transmissão viral e manifestações clínicas da influenza

A transmissão dos FLUV se dá através de aerossóis emitidos pelas vias respiratórias superiores ou através de transmissão indireta, possuindo grande capacidade de disseminação na população humana (3,85). Em média, um adulto saudável é infectado a cada 5 a 7 anos, sendo a probabilidade de infecção maior na infância e estabilizando a partir dos 30 anos de idade (86), estimando-se que 5% a

15% da população seja infectada anualmente (87).

Estima-se que a maior parte dos casos de infecção por Influenza ocorram de forma assintomática, mas a forma sintomática da infecção ocorre pela manifestação de alguns dos seguintes sintomas, em conjunto com febre: tosse, coriza, dores de cabeça, mialgia, anorexia e dores de garganta, entre outros (7,88–90). Os sintomas, bem como o *shedding* viral, podem perdurar por aproximadamente uma semana em indivíduos adultos saudáveis, podendo evoluir para casos de pneumonia e SRAG, especialmente em pacientes imunossuprimidos ou apresentando determinadas comorbidades, como doenças crônicas pulmonares e cardiopulmonares (7,88–90). Consideram-se, por exemplo, crianças, idosos, obesos e gestantes como populações em risco de desenvolvimento de formas graves das doenças (7,60,91).

1.7 Resposta Imune

A infecção pelo FLUV ocorre principalmente nas células epiteliais do sistema respiratório, podendo também infectar macrófagos e células dendríticas, através de receptores de Lectinas do tipo C, de maneira AS-independente. Desta forma, é necessário que o vírus supere as barreiras iniciais do organismo como muco e saliva, coletinas ou anticorpos naturais. As células infectadas produzem citocinas e quimiocinas como interferons do tipo I, tipo III, IL-6, IL-8, TNF- α , entre outras, que contribuem para a inflamação e recrutamento de células imunes (1,92,93).

Uma das células com ação mais rápida são os neutrófilos, que desempenham funções essenciais para o controle da infecção, como a fagocitose, degranulação, formação de NETs extracelulares e recrutamento de linfócitos T CD8+ para o local de infecção (via CXCL12) (1,92,93).

Os macrófagos alveolares também desempenham importantes funções nesta resposta, mantendo a homeostasia pulmonar através da fagocitose de células infectadas e antígenos opsonizados por anticorpos, sendo os principais produtores de IFN do tipo 1 no pulmão durante a infecção por influenza (1,93)(92).

As células dendríticas desempenham o seu papel clássico de apresentadores de antígenos, sendo responsáveis pelo *priming*, ativação, migração e sobrevivência das células T CD8+ nos pulmões durante a infecção por influenza, bem como ativando linfócitos T CD4+ e induzindo perfis Th1 (1,92,93). Além disso, estas células são importantes produtoras de citocinas inflamatórias e IFNs do tipo I nos pulmões (1,92,93). Outra população importante são as células NK, capazes de reconhecer

células infectadas marcadas por anticorpos e capazes de reconhecer a HA em células infectadas, induzindo a lise destas células (1,92,93).

Por mais que a resposta inata seja importante, a resposta adaptativa é crucial para o controle da infecção. Os linfócitos T CD4⁺ desempenham importante função ao promover a resposta por linfócitos TCD8⁺ e a ativação e diferenciação de linfócitos B produtores de anticorpos (1,92,93). A resposta à infecção por influenza assume principalmente um perfil Th1, promovendo a ativação de macrófagos e mudanças de isotipo dos anticorpos de linfócitos B, mas tendo também uma importante resposta Th2 e Th17 (1,92,93).

As células Treg também constituem um importante fator na resposta imunológica, modulando os processos de inflamação e reparo tecidual, principalmente pela produção de IL-10(1,92,93). Os linfócitos T CD8⁺ são críticos para o controle da infecção e *clearance* viral principalmente pela sua atividade citotóxica em células infectadas e pela produção de IFN- γ e - α , além de IL-10 (1,92,93). As proteínas M2, NP, M1 e PA são importantes alvos da resposta pelos linfócitos T, sendo estas proteínas consideradas antigenicamente conservadas (1,92,93).

A resposta humoral, assim como na maioria das infecções virais, é de grande importância para a resposta aos FLUV, principalmente por sua capacidade de memória. Linfócitos B *naive* ou de memória são ativados pelos linfócitos T CD4⁺, sendo que algumas destas células B rapidamente se diferenciam em plasmablastos, secretando os anticorpos IgM, IgG e IgA. Os plasmablastos são responsáveis por rapidamente elevar os níveis de anticorpos para um estado protetor, e alguns deles se diferenciam em plasmócitos, que têm maior longevidade e são responsáveis pela manutenção a longo prazo de níveis protetores de anticorpos séricos (92). Aproximadamente sete dias após a infecção, as células B começam a produzir anticorpos, sendo maioritariamente IgG e IgM nos pulmões, e IgA no trato respiratório superior (1,92,93).

Os anticorpos são maioritariamente direcionados para as glicoproteínas de superfície HA, sendo a sua região globular imunodominante, seguida da NA, mas podem ser específicos a outras proteínas como a M2 e a NP (1,92,93). Anticorpos neutralizantes, que impedem a infecção celular, são direcionadas à HA (1,92,93). Ainda assim, determinados epítomos da HA tendem a ser imunodominantes, algo possivelmente explicado pelo processamento de proteínas virais para apresentação dos peptídeos, já que linfócitos T CD4⁺ *naive* reconhecem peptídeos abrangendo toda

a HA e linfócitos T CD4 de memória são direcionados a apenas alguns peptídeos imunodominantes (94).

Apesar de não-neutralizantes, anticorpos direcionados à NA podem impedir as suas funções no brotamento viral e na liberação de partículas virais de barreiras de muco, estando associados com uma redução na patologia (95). Os anticorpos também participam da resposta de outras formas, como na citotoxicidade mediada por anticorpos, a fagocitose mediada por receptor Fc e lise mediada pelo complemento (1,92,93). Alguns estudos demonstram a existência de uma correlação entre títulos de inibição de hemaglutinação, níveis de IgG e atividade de fagocitose mediada por anticorpos (96). Anticorpos direcionados a proteínas mais conservadas, inclusive proteínas internas, ou mesmo à região conservada da HA, podem ter uma ação de amplo espectro, capazes de reconhecer diversas estirpes, inclusive tendo o potencial de oferecer proteção inter-subtipo (97,98). Também é importante destacar que determinados anticorpos de amplo espectro não-neutralizantes podem estar associados a uma maior patologia pulmonar e carga viral (98). Assim como na vacinação, discutida adiante, a resposta à infecção também é influenciada pelo histórico de infecções de cada paciente, com fenômenos de *imprinting* resultando em respostas cruzadas que podem ter um efeito benéfico na proteção ou podem inibir a resposta adequada (99).

O alvo dos anticorpos determina o seu mecanismo de ação e em qual etapa do ciclo de replicação eles atuam, Figura 4. É importante notar que esta resposta é principalmente desenvolvida em tecidos próximos ao local de infecção, em linfonodos drenantes ou nos iBALTs (tecido linfóide induzido associado aos brônquios) fazendo com que testes sorológicos, os mais comumente utilizados, possam não representar a resposta à infecção natural adequadamente (92).

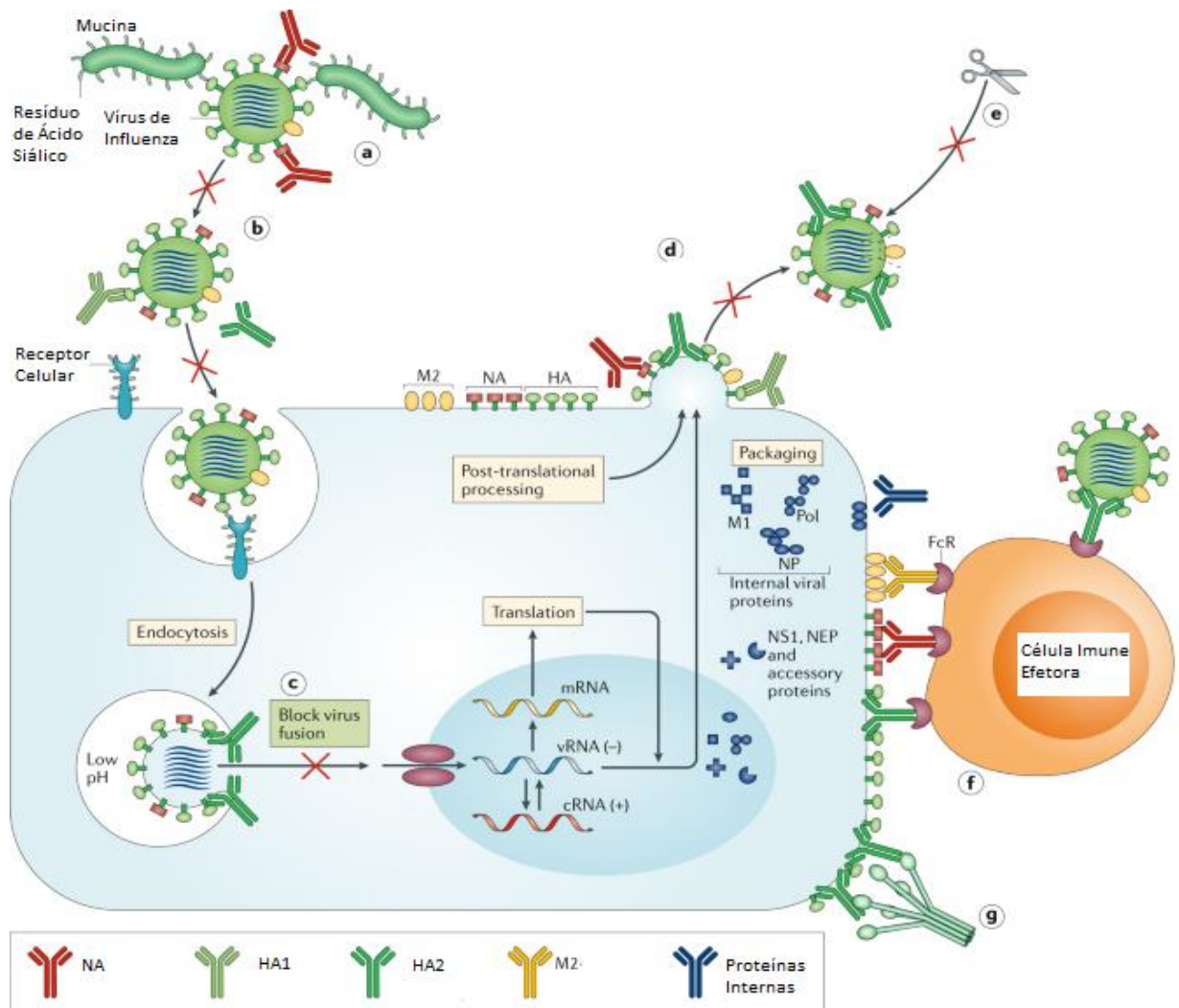


Figura 4: Mecanismo de ação dos anticorpos anti-influenza: anticorpos direcionadas para a NA podem inibir o escape viral de mucinas (a) ou a liberação de novas partículas virais (d). Anticorpos contra a região HA1 podem inibir a ligação dos vírus com os receptores celulares, enquanto que anticorpos para a região HA2 podem inibir a fusão endossomal (c) e a clivagem proteolítica da HA (e). Anticorpos para HA2, NA, M2 e possivelmente NP também podem contribuir para ação das células imunes efetoras mediadas por receptores Fc (f). Anticorpos para HA2 também se demonstram capazes de induzir respostas via complemento (g).

Fonte: Adaptado de Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. Vol. 19, Nature Reviews Immunology. 2019;383–97. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-019-0143-6>

1.8 Patogênese

Além da potencial lesão causada diretamente pela replicação ativa do vírus nas células epiteliais do sistema respiratório, os processos patológicos da influenza estão principalmente associados a uma exacerbação da resposta inflamatória. Apesar do processo inflamatório ser crítico para o controle da replicação viral e uma resposta imune adequada, também origina danos citotóxicos (100). Os processos de remodelamento tecidual também podem resultar em fibrose, comprometendo ainda mais a capacidade respiratória.

Os neutrófilos são críticos para o controle viral nos primeiros dias de infecção, mas podem causar elevados danos teciduais pela liberação de enzimas como elastase e mieloperoxidase ou pela liberação de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (100). Em várias etapas da resposta à infecção por influenza uma elevada produção de citocinas inflamatórias pode ocorrer, e quando ocorre, caracteriza-se uma “tempestade de citocinas”, fenômeno frequentemente associado às estirpes aviárias de alta patogenicidade e que pode ter efeitos sistêmicos, levando à falência de múltiplos órgãos (101–103).

Os fatores que afetam a gravidade da doença originada pelos vírus são múltiplos. Inicialmente podemos considerar fatores intrínsecos aos vírus, por exemplo a HA, como tropismo viral, escape imunológico por variação antigênica, entre outros e a NA pela capacidade de dissociar as partículas virais de mucinas. Existem indícios que a HA também seja capaz de reduzir os níveis de IFNAR e, conseqüentemente, a expressão de Genes Estimulados por Interferon (ISG) (104).

Outras proteínas virais também participam ativamente deste processo, modulando a resposta imune do hospedeiro. A proteína não estrutural 1 (NS1) viral inibe a produção de IFN, a sinalização *downstream* dos IFN e a expressão de ISGs, a partir de diversos mecanismos, como, por exemplo, inibindo a ativação de RIG-I (gene I induzível por ácido retinóico) ou a sinalização por TLRs (receptores do tipo Toll), além de inibir a expressão gênica da célula infectada (104). As proteínas virais PB1-F2 e PB2 também estão associadas a uma diminuição na produção de determinados IFNs, principalmente por associarem-se a MAVS (proteína de sinalização antiviral mitocondrial), inibindo assim a atividade de TLRs e RIG-I (83,104). A proteína PB1-F2 também possui a capacidade de sensibilizar células infectadas a estímulos pró-apoptóticos, como TNF- α (83,105). O complexo da polimerase viral realiza o processo de *cap-snatching*, desta forma diminuindo a expressão de proteínas da célula hospedeira (106). A proteína PA-X viral também diminui a expressão da célula infectada ao degradar seletivamente RNA Polimerase II celular (83). De uma forma geral, esta diminuição de expressão celular contribui para a patogênese ao inibir a expressão de ISGs. A proteína viral M2 também tem a capacidade de inibir a ativação de TLRs e a produção de IFNs ao interferir com os processos de autofagia na célula infectada (107).

Outro importante fator são os próprios hospedeiros, sendo que populações cuja resposta imune esteja comprometida, como idosos, crianças, imunossuprimidos ou pacientes com outras comorbidades são consideradas populações de risco para o

desenvolvimento de formas graves da doença. Os históricos de vacinação e de infecção de cada paciente também são uma variável importante para determinar a gravidade da infecção. Determinados hábitos de vida, como o tabagismo, também se encontram associados a um pior desfecho da doença (108). Por último, devemos também considerar fatores genéticos dos hospedeiros, sendo que mutações em determinados genes podem estar associados a uma deficiência na resposta imune, como por exemplo mutações nos genes que codificam as proteínas CXCR5, IFITM3 e HLA, envolvidas na resposta imune aos vírus de influenza, podem estar associadas a uma maior susceptibilidade e gravidade de infecções e até a reduzidas respostas vacinais (109–111).

Co-infecções ou infecções secundárias com outros patógenos, principalmente por bactérias comuns no trato respiratório como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* também são importantes fatores relacionados à patogênese da doença (112–114). Apesar de os FLUV poderem ocasionar pneumonias virais, existem as possibilidades de pneumonias bacterianas secundárias ou até concomitantes (115,116). Mesmo na pandemia de 2009, co-infecções bacterianas estavam presentes em mais de 30% dos indivíduos, estando associadas a maior mortalidade e morbidade (113). Nem todos mecanismos envolvidos nesta sinergia estão elucidados, mas a disfunção do sistema imune em geral pode reduzir a resposta ao novo patógeno, que por sua vez também pode alterar a resposta ao vírus, além de que a lesão tecidual no epitélio respiratório por um patógeno ou pela resposta imune do hospedeiro pode facilitar o estabelecimento de uma infecção secundária ou co-infecção bacteriana (112,115,117). Dentre outros mecanismos envolvidos, pode-se citar a indução da produção de interferon do tipo-1 ou a depleção de macrófagos alveolares pelas vírus de influenza, comprometendo assim a capacidade de resposta antibacteriana, ou simplesmente a exacerbação da resposta inflamatória local pela presença de dois patógenos distintos (118).

1.9 Antivirais

Para o tratamento de uma infecção por influenza é recomendado, no Brasil, o uso de antivirais do tipo inibidores de NA, que inibem o brotamento viral em uma célula infectada: o fosfato de oseltamivir (Tamiflu) e o zanamivir (Relenza), devendo ser administrados em até 48 horas após o início dos sintomas em pacientes hospitalizados, com progressão da doença grave ou com maior risco de

desenvolvimento de complicações, podendo também ser usados como quimioprofilaxia em determinados grupos (119,120).

Assim como para a vacinação, a grande capacidade de mutação dos vírus representa um importante desafio para o desenvolvimento de novos antivirais e manutenção da eficácia dos já existentes, com o surgimento e estabelecimento de estirpes resistentes na população humana constituindo uma importante preocupação para a saúde pública, podendo surgir estirpes resistentes mesmo sem pressão seletiva induzida pelo uso destas drogas (121,122).

Os antivirais da classe dos adamantanos, inibidores de M2 de influenza A, caíram em desuso, não sendo mais recomendado o seu uso devido à prevalência de estirpes resistentes em circulação (122,123). Desta forma, faz-se necessária a busca por novos medicamentos, sendo que vários encontram-se em fases de testes clínicos, como por exemplo preparações de anticorpos monoclonais direcionados à região conservada da hemaglutinina ou como o Pimodivir, que inibe a subunidade PB2 da polimerase viral (122,124,125). Em alguns outros países, outros antivirais já foram aprovados para uso, o baloxavir marboxil e o favipiravir, inibidores do processo de *cap-snatching* da polimerase viral (122,126,127).

Apesar dos tratamentos disponíveis, estirpes resistentes já foram detectadas para estes medicamentos, sempre existindo a possibilidade de que eles se tornem inviáveis em um futuro próximo, destacando-se assim a importância não só de desenvolver novos medicamentos como também de manter e melhorar os programas de vacinação, discutidos em mais detalhe na seção seguinte (122,128,129).

Diversos novos tratamentos para influenza encontram-se em fases de teste, podendo-se destacar como exemplo as imunoterapias, em que anticorpos neutralizantes de amplo espectro (bNabs) de pacientes convalescentes, direcionados a regiões conservadas das proteínas virais, são reproduzidos, podendo assim constituir a perspectiva de um mecanismo de imunização passiva, com aplicação terapêutica e de possível produção em massa, com anticorpos capazes de oferecer proteção cruzada intra e inter-subtipo para influenza (130,131).

1.10 Prevenção

Atualmente, a principal forma de controle da Influenza é através da prevenção pelo uso de vacinas. As vacinas de vírus inteiro inativado são muito utilizadas para diversos patógenos e para influenza também se demonstraram eficazes, mas devido à sua alta reatogenicidade caíram em desuso, sendo substituídas pelas vacinas

fragmentadas ou de subunidades, que demonstraram resposta equivalente às de vírus inteiro, pelo menos do que diz respeito a anticorpos anti-HA, mas com menor taxa de efeitos adversos (132).

A vacina anti-Influenza aplicada pelo SUS (Sistema Único de Saúde) no Brasil é inativada e trivalente (TIV) e fragmentada, seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde para o Hemisfério Sul, contendo uma estirpe de influenza A H1N1, uma estirpe de A/H3N2 e uma estirpe de influenza B (20,133).

A imunidade induzida pela vacinação pela TIV é direcionada à HA, não sendo padronizado o uso da NA, cujo conteúdo nas vacinas é variável, sendo que a maior parte dos anticorpos produzidos na infecção natural são anti-HA, Figura 5 (134). No entanto, a grande plasticidade da HA e o seu papel no escape imunológico não podem ser desconsiderados (73,74).

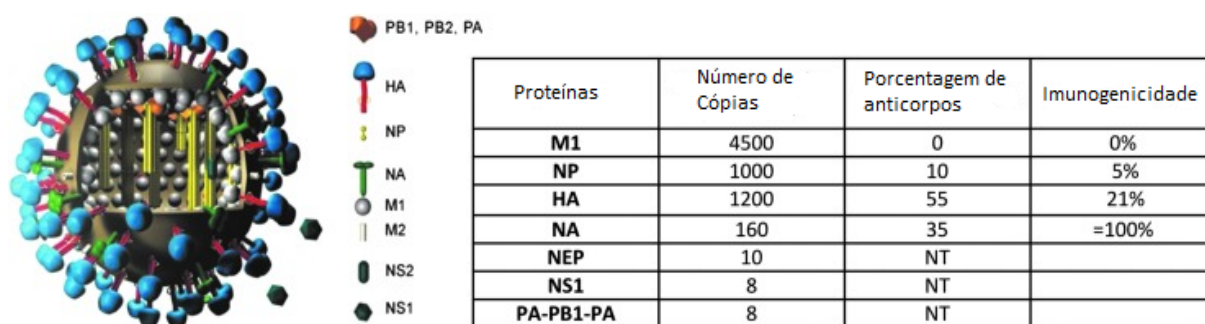


Figura 5: Abundância relativa das proteínas estruturais do vírus influenza e a porcentagem dos anticorpos para elas direcionadas: (M1 – proteína de matrix 1; NP – nucleoproteína; HÁ – hemaglutinina; NA – neuraminidase; NEP – proteína de exporte nuclear; NS1 – proteína não estrutural 1; PA-PB1-PA – complexo da polimerase viral).

Fonte: Adaptado de Altman, *et al* (2018).

Além das vacinas trivalentes, pode-se encontrar no sistema privado e em outros países, a vacina inativada quadrivalente, contendo as duas linhagens de influenza B (Yamagata e Victoria). As duas linhagens tendem a co-circular e a previsão de qual linhagem será predominante em uma determinada temporada não é sempre certa, com relatos de não concordância entre estirpes vacinais e circulantes em várias temporadas (135). Por estes motivos, discute-se o custo-benefício da vacina quadri ou trivalente, especialmente ao se considerar que as infecções por influenza B tendem a representar no máximo 30% do total de infecções e que a inclusão de uma nova estirpe vacinal representa uma grande elevação nos custos de produção,

especialmente em um país como o Brasil, que necessita de mais de 60 milhões de doses anualmente (136). Apesar disso, o Instituto Butantan está desenvolvendo uma vacina quadrivalente com o intuito de “substituir progressivamente a vacina trivalente nas campanhas de vacinação” (137), já que a vacina quadrivalente pode apresentar um impacto significativo na morbidade e mortalidade por influenza B (138). Por outro lado, alguns autores apontam que ampliar o público vacinado com a TIV possa oferecer melhor razão de custo/benefício do que a vacina quadrivalente (139,140).

No Brasil, as campanhas de vacinação para influenza são realizadas anualmente desde 1999, sendo gratuitas para o público-alvo, composto por populações de risco como idosos, crianças, profissionais de saúde e pacientes acometidos de certas patologias. Nos anos de 2018, 2019 e 2020 foram realizadas as 20^a, 21^a e 22^a Campanhas de Vacinação Nacional, com a meta de abranger 90% do público-alvo, composto por aproximadamente 60 milhões de pessoas, sendo esta meta atingida nos três anos, mas não em todos os grupos prioritários, com mais de 50 milhões de pessoas vacinadas anualmente (24–26).

A TIV ativa principalmente células T *helper* e linfócitos B (141). Evidências apontam que a TIV não induza uma boa resposta CD8 ou por células T da imunidade inata e que os linfócitos B ativados tendem a concentrar-se em tecidos, não sendo detectados na circulação sanguínea após um ano (141). A TIV induz a produção de uma população transiente de linfócitos secretores de anticorpos após sete dias, que rapidamente produzem anticorpos, estando estes linfócitos correlacionados com os títulos de HI e a soroconversão (141). Em seguida, linfócitos B migram para centros germinativos para maturação de afinidade, produzindo-se plasmócitos e linfócitos de memória, que atingem o seu pico após 14 dias, o mesmo período após o qual o pico de anticorpos séricos é detectado (141).

A TIV baseia-se principalmente na estimulação da produção de anticorpos anti-HA, mas esta glicoproteína é altamente variável e representa um importante mecanismo de escape imunológico viral (16,142,143). A alta capacidade de variação antigênica inerente aos FLUV resulta no surgimento constante de novas estirpes, ocorrendo um grande *turnover* das estirpes correntemente em circulação, o que coincide em uma necessidade de prever quais estirpes circularão na temporada seguinte, em cada região, com antecedência suficiente para a produção, transporte e aplicação da vacina antes do período sazonal (144).

Entre os anos de 2017 para 2018 e de 2018 para 2019 ocorreu a mudança de duas estirpes (H3N2 e FLUBV a cada ano), de 2019 para 2020 das três estirpes vacinais e de 2020 para 2021 de duas estirpes (144,145). Esta previsão não é sempre eficaz, podendo ocorrer uma não concordância entre as estirpes contidas na vacina e as estirpes circulantes. As diferentes estirpes podem também apresentar imunogenicidade variável, ou mesmo sofrer adaptações aos processos de replicação utilizados na produção da vacina (146). Todos estes fatores resultam em uma grande variação na eficácia vacinal de ano para ano, com estimativas variando de 30% a 80% mas existindo, no entanto, estimativas de que a vacinação previna aproximadamente 50% das patologias associadas e 39 a 75% das mortalidades devidas à infecção por FLUV (86,147–151).

Existem evidências de respostas vacinais comprometidas em certas subpopulações, como idosos e obesos (21,22). Além disso, existem indícios de que a resposta possa ser fortemente influenciada tanto pelo histórico de infecções como de vacinações de influenza para cada indivíduo (152).

Apesar dos desafios de produção e de eficácia da vacina, deve-se considerar os benefícios dos programas de vacinações. Estima-se que, só nos EUA no período de 2016-2017, a vacinação foi responsável por evitar a ocorrência de 5,29 milhões de casos e 84.700 hospitalizações, levando a um grande impacto econômico pela redução da perda de produtividade e dos custos de tratamento, sendo considerada a medida mais eficaz contra a Influenza e suas complicações (16,148,153,154). Neste cenário, faz-se necessária a avaliação anual da vacina, especialmente em subpopulações que são também consideradas grupos de risco, como idosos. A resposta sorológica pode também não ser a mais representativa da resposta à vacina em determinadas subpopulações imunocomprometidas, como idosos, já que uma resposta celular deficiente pode não permitir um controle adequado da infecção mesmo com títulos de anticorpos semelhantes.

Existem vários tipos de vacinas atualmente em uso, bem como várias em fases de teste clínicos (27–31). De forma a determinar qual opção é mais eficaz, os parâmetros que melhor se correlacionam com a resposta vacinal e com um estado de imunidade em cada subpopulação, devem ser averiguados.

Uma outra vacina comumente usada, principalmente em crianças, é a de vírus atenuado (LAIV), que aparenta induzir uma resposta mais diversificada e duradoura em crianças, assemelhando-se a uma infecção natural (155–157). No entanto, a sua eficácia em adultos é controversa, e a resposta não pode ser facilmente avaliada por

métodos sorológicos, sendo que a replicação, e conseqüentemente, a resposta ao vírus atenuado, ocorre principalmente no trato respiratório superior (156,157). Desta forma, o seu uso em adultos não é recomendado, sendo que até em crianças a sua eficácia comparativamente à TIV ainda não está definitivamente estabelecida.

Mais recentemente, vacinas recombinantes foram aprovadas, contendo apenas HA como antígeno mas em uma dose mais elevada (45ug ao invés dos 15ug presentes na TIV) e permitindo eliminar adaptações das estirpes virais à cultura como uma variável à eficiência vacinal (158–160). Estas vacinas recombinantes aparentam eficácia semelhantes às restantes, mas existem evidências de que a sua dose maior induza uma resposta mais robusta em idosos (158–160). Uma breve comparação entre a resposta a estas vacinas e a resposta à infecção natural pode ser observado no Quadro 1.

Tipo de Resposta de Anticorpos	Infecção Natural	LAIV	Vírus Inteiro Inativado	Subunidade ou Fragmentada	Recombinante (HA)
Soro	Forte	Moderado (em crianças)	Forte	Forte	Forte
Mucosas	Forte	Moderado (em crianças)	Fraco ou nenhum	Fraco ou nenhum	Fraco ou nenhum
HA-específicos	Forte	Moderado	Forte	Forte	Forte
NA-específicos	Forte	Fraco	Moderado	Fraco	Nenhum
M2-específicos	Detectável	Não definido	Não definido	Não definido	Nenhum
Específicos a proteínas internas	Detectável	Não definido	Detectável	Detectável	Nenhum
Longevidade	Longo prazo	Moderado	Curto	Curto	Curto
Espectro	Moderado	Amplio	restrito	restrito	Amplio

Quadro 1: Especificidade e abundância dos anticorpos produzidos pela infecção ou pelos diferentes tipos de vacina anti-influenza (HA – hemaglutinina; NA – neuraminidas; M2 – proteína de matrix 2; LAIV – vacina de vírus atenuado).

Fonte: Adaptado de Krammer, 2019.

O “Santo Graal” das vacinas de influenza são as vacinas chamadas de universais, que visam promover uma proteção de longo prazo contra uma grande variedade de estirpes, tornado desnecessária a reformulação e vacinação atual, sendo capaz de proteger contra estirpes futuras. Uma vacina universal poderia, inclusive, oferecer proteção em relação às estirpes pandêmicas.

Existem diversas vacinas com esta finalidade sendo testadas, utilizando como estratégia, por exemplo, a indução de uma resposta imune direcionada a regiões altamente conservadas (161–164), como exemplo, vacinas que usam a região de HA2 como antígeno, ou regiões das proteínas NA e M2, ou então vacinas que

procuram estimular a resposta por linfócitos T a partir da NP e M1 (161–165). Novos adjuvantes ou melhores formas de apresentar os antígenos nas mucosas do trato respiratório, também continuam sendo avaliadas (161–164). Pode-se citar também o uso de vacinas quiméricas, em que são administradas HAs contendo regiões de haste (conservadas) de diferentes grupos antigênicos associadas a regiões globulares de estirpes aviárias (166). Em cada dose vacinal é utilizada uma região globular de uma diferente estirpe, permitindo assim uma resposta à região subdominante de haste, que se mantém constante em cada dose, com resultados preliminares sugerindo uma resposta ampla e duradoura (166). Até o momento, nenhuma destas vacinas foi aprovada e demonstrar a sua verdadeira eficácia é complexo, sendo que a resposta vacinal depende de diversas variáveis para além do antígeno vacinal, como histórico de infecções e vacinações, ou comorbidades. Decifrar os mecanismos responsáveis pelas variações na resposta vacinal, demonstra-se essencial para o desenvolvimento de uma verdadeira vacina universal.

Quando exposto a um antígeno, o sistema imune humano pode estimular um aumento na produção de anticorpos, caracterizando-se a soroconversão (SC) quando ocorre um aumento de, pelo menos, quatro vezes no título de anticorpos inicial. Quando são produzidos níveis de imunoglobulinas suficientes para induzir um estado de imunidade em relação a esse antígeno, diz-se que ocorreu a soroproteção (SP) (143,167,168).

A SC induzida pela TIV pode ser determinada através de ensaios de inibição da hemaglutinação (HI) e de microneutralização (MN) (33,34). O teste de Hemaglutinação baseia-se na capacidade dos FLUV de hemaglutinar hemácias (HA) e o ensaio de HI determina a capacidade dos anticorpos presentes no soro de inibir este processo, considerando-se um estado de SP, quando se observa um título de 1:40 no ensaio de HI, título indicativo de uma redução de 50% na probabilidade de infecção (86,167,169,170). A SC corresponde a um aumento de pelo menos quatro vezes em relação ao título pré-vacinal (143,168,170). A MN, por sua vez, avalia a capacidade dos anticorpos presentes no soro de impedir a infecção celular, sendo que a MN apresenta custos mais elevados em termos financeiros, temporais e de experiência técnica, mas permite a detecção de outros anticorpos para além dos anti-HA (167–169). Para a técnica de MN considera-se um título de 1:20 como soroproteção e um aumento de 4 vezes como soroconversão, mas estudos avaliando a correlação entre a técnica de MN e de HI ainda apresentam resultados controversos (168,171).

2. Justificativa

Os FLUV estão em constante evolução, ocasionando epidemias anuais sazonais, com estimativas de 290 a 650 mil óbitos globalmente e com o surgimento de novas estirpes que entram em circulação na população humana, fazendo-se necessário uma reformulação anual da vacina (60). Essa reformulação depende das atividades de vigilância dessas novas estirpes virais, antigenicamente distintas das estirpes circulantes em anos anteriores, e de estudos sorológicos de indivíduos vacinados, perante a essas novas estirpes circulantes. Neste cenário, o aperfeiçoamento da vacina se torna um desafio, já que esta apresenta grandes variações na sua eficácia de temporada para temporada, de região para região, entre diferentes populações, inclusive aquelas consideradas de risco, como idosos e obesos (172). Além disso, evidências de respostas reduzidas em populações repetidamente vacinadas para influenza são de especial relevância, considerando-se o caráter anual das campanhas de vacinação e demonstrando a importância e complexidade da imunidade pré-existente como moduladora da resposta vacinal.

Estudos na literatura sobre a resposta nas populações obesas ou previamente vacinadas ainda são controversos, apontando respostas reduzidas, equivalentes ou alteradas. Portanto, os mecanismos responsáveis por modular a resposta nas diferentes subpopulações ainda não foram completamente elucidados (172). Ainda que a vacinação seja a medida mais eficaz disponível para o controle da influenza, prevenindo parte significativa das mortalidades, detalhar a resposta vacinal na população, e identificar as variáveis que modulam esta resposta e os mecanismos responsáveis por estes eventos, são cruciais para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes. Ao se tratar de vírus respiratórios tão ubíquos no mundo, o efeito de imunidade de rebanho não pode ser ignorado e a obtenção de uma alta taxa de soroproteção na população é uma prioridade, sendo necessário não só uma alta cobertura vacinal como também uma baixa taxa de falhas vacinais. Diante da possibilidade de ocorrência de pandemias que demonstram acontecer de forma quase cíclica na história humana, o desenvolvimento de vacinas cada vez mais eficazes também é essencial na prevenção da doença. Dessa maneira, o monitoramento da imunidade populacional frente à vacinação anual, bem como o entendimento de fatores individuais que possam comprometer essa imunidade são necessários e devem ser feitos de forma contínua dentro dos programas de vigilância da influenza,

especialmente em países do hemisfério Sul como o Brasil, que possuem uma diferente composição vacinal do hemisfério norte e onde estudos deste tipo são raros.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a resposta imune sorológica de adultos e idosos após a vacinação com a vacina trivalente inativada anti-influenza nas temporadas de 2018 a 2020 no Brasil, avaliando o impacto da idade, comorbidades e imunidade prévia.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os títulos de anticorpos anti-hemaglutinina, antes e após a vacinação em uma coorte de voluntários adultos e idosos.
- Determinar os níveis de soroproteção, antes e após a vacinação, e de soroconversão, em relação às estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo.
- Avaliar a proteção cruzada entre estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo e as correspondentes estirpes componentes da vacina em anos anteriores, bem como estirpes circulantes representativas.
- Determinar os títulos de anticorpos contra os componentes vacinais ao longo dos anos.
- Avaliar as taxas de infecção por influenza após a vacinação na população estudada.
- Comparar os títulos de anticorpos, índices de soroproteção e de soroconversão contra o vírus A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2) entre a coorte de 2018 e uma coorte de indivíduos saudáveis de São Paulo,
- Comparar a resposta sorológica vacinal nas subpopulações de vacinados contra influenza em anos anteriores *versus* vacinados pela primeira vez, em cada ano, de indivíduos eutróficos *versus* obesos e de indivíduos jovens *versus* idosos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ (CEP/IOC: 2.590.783), Anexo 1, e realizado no Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (LVRS), IOC/FIOCRUZ, Referência Nacional para o Ministério da Saúde. Os voluntários recrutados responderam a um questionário epidemiológico e as amostras biológicas foram coletadas mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Apêndice 1 e 2.

4.2. Desenho de estudo e recrutamento de voluntários

Para realização deste estudo observacional prospectivo, voluntários adultos que iriam se vacinar contra a gripe nos anos de 2018, 2019 e 2020 foram recrutados através de divulgação por cartazes, e-mail institucional e WhatsApp, no Rio de Janeiro, Brasil.

O estudo do ano de 2018 consistiu em um estudo piloto, sendo obtida uma população adulta ou idosa, de conveniência e sem critérios de exclusão, que permitiu a identificação de populações de interesse para o delineamento experimental do ano seguinte, como idosos (mais de 60 anos de idade), obesos (definidos por Índice de Massa corporal acima de 30) e previamente vacinados para influenza em anos anteriores.

Em 2019, foi realizado um recrutamento de idosos, atendidos pelo Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria (ENSP), FIOCRUZ, RJ, através de abordagem direta na fila de vacinação, convidando-os a participar da pesquisa e procurando-se também voluntários pertencentes às seguintes populações, tanto em jovens como idosos: nunca antes vacinados para influenza e vacinados pelo menos nos últimos dois anos consecutivos. Posteriormente, a população obesa foi classificada de acordo com o índice de massa corporal.

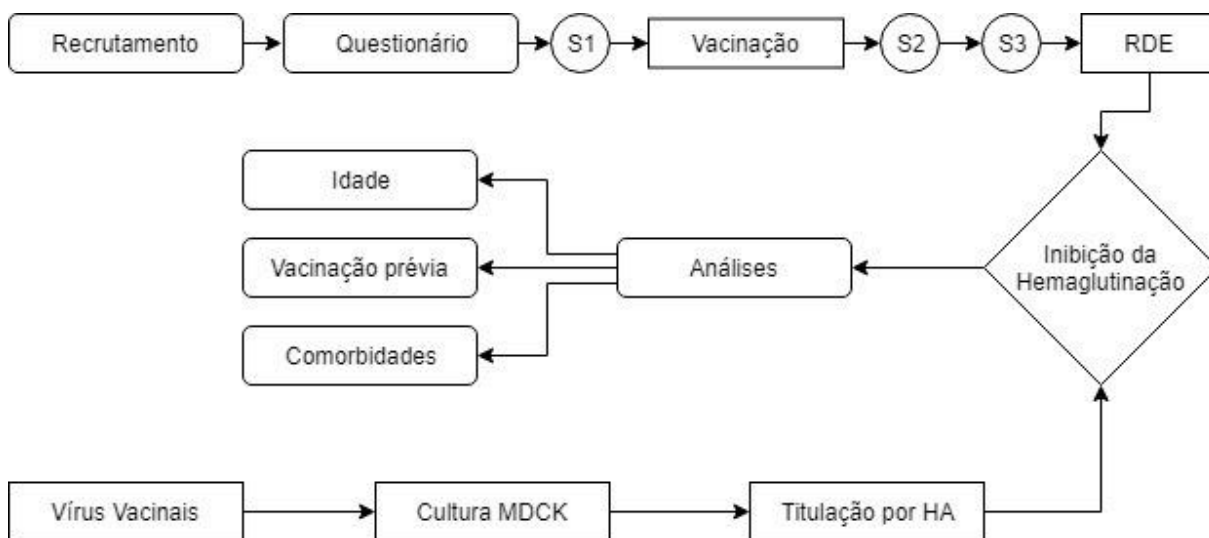
Em 2020, o recrutamento foi restrito devido às restrições impostas pela pandemia de SARS-CoV-2, estabelecendo-se uma amostragem de conveniência, usando-se apenas como critério de inclusão as populações de nunca antes vacinados e vacinados pelo menos nos últimos dois anos consecutivos.

Em cada ano, foi requisitado que os voluntários reportassem sintomas indicativos de infecção respiratória, bem como realizado o acompanhamento periódico, de forma a avaliar as taxas de infecção pós-vacinais.

Adicionalmente, foi realizada uma colaboração com pesquisadores da Faculdade de Medicina da USP (Projeto FAPESP: 18/16162-3) para avaliação da resposta ao componente H3N2 da TIV de 2018 (A/Singapura) em uma coorte de indivíduos saudáveis *versus* indivíduos com Lúpus Eritematoso Sistêmico, com idade e sexo pareados, com o autor deste texto desenvolvendo apenas os ensaios de HAI, incluindo-se nas análises apenas os indivíduos saudáveis para os quais o histórico de vacinação estava disponível. A população saudável deste estudo (população USP) foi analisada segundo os mesmos parâmetros que a coorte de 2018 previamente descrita (população Fiocruz), sendo analisadas individualmente ou agrupadas.

Na Figura 6 pode-se observar, resumidamente, o desenho do estudo e suas principais etapas.

Figura 6: Fluxograma esquematizando o desenho do estudo



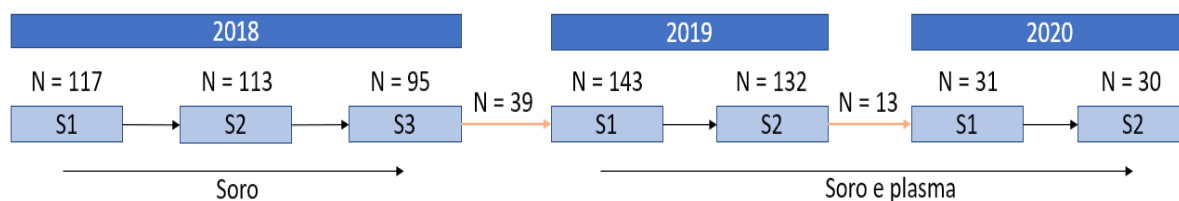
*S1 – amostra pré-vacinal. S2 – amostra 21 dias após vacina. S3- amostra 6 meses após vacina. HA- ensaio de hemaglutinação. MDCK – Células de rim canino de Madin-Darby.

4.3 Obtenção das amostras de soro e plasma:

Para o estudo do ano de 2018 foram obtidas três amostras de sangue venoso de cada paciente, por profissional de saúde treinado, previamente à aplicação da vacina (S1), 21 dias após a vacina (S2) e 6 meses após a vacinação (S3), conforme apresentação do comprovante de vacinação (Figura 7). As amostras de soro correspondentes foram obtidas por centrifugação a 250 G por 15 minutos, após uma

incubação a temperatura ambiente por 1 hora, e sendo estocadas a -20 °C. Nos anos de 2019 e 2020 foram obtidas duas amostras de sangue venoso de cada paciente, por profissional de saúde treinado, previamente à aplicação da vacina (S1) e 21 dias após a vacina (S2), conforme apresentação do comprovante de vacinação, em 2 tubos de coleta a vácuo com anticoagulante (ACD) de 8 mL. A coleta do plasma se deu após protocolo de separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) em gradiente de Ficoll. A camada superior do gradiente, correspondente ao plasma, foi recolhida, aliqüotada e estocada a -20°C.

Figura 7: Fluxograma do número de voluntários e coletas de sangue realizadas ao longo de 2018, 2019 e 2020



Legenda: Na figura pode-se observar todas as coletas realizadas em cada ano e o tamanho amostral das populações (N), com as setas em laranja demonstrando os voluntários que realizaram todas as coletas seguidas nos anos analisados. Em 2018 foram realizadas três coletas: S1 (pré-vacinal), S2 (21 dias após a vacina) e S3 (seis meses após a vacina), enquanto em 2019 e 2020 foram realizadas duas coletas: S1 e S2.

4.4 Obtenção da suspensão de hemácias de cobaio (RBC)

Para a realização dos ensaios de hemaglutinação e de inibição de hemaglutinação é necessária uma suspensão de hemácias capazes de serem aglutinadas pela hemaglutinina dos FLUV. Para tal, foi obtido sangue de cobaia *shorthair* em solução Alsever, fornecido pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz), e realizado um processo de repetidas lavagens em PBS 1x, seguidas de centrifugações a 450 G por 10 minutos, de forma a obter um precipitado de hemácias livre de produtos de hemólise e outros possíveis interferentes. Este precipitado de hemácias foi utilizado para preparar suspensões de hemácias em PBS 1x na concentração de 0,75% (RBC), sendo a RBC armazenada a 4°C para uso em no máximo duas semanas ou até o aparecimento de indicativos de produtos de hemólise.

4.5 Cultura e expansão celular

Para a realização dos ensaios de hemaglutinação e de inibição de hemaglutinação são necessários isolados virais, que serão incubados com os

anticorpos séricos e a suspensão de hemácias. Para tal, é necessária a cultura celular para a posterior expansão do estoque viral. Células da linhagem MDCK (provenientes de rim canino de Madin-Darby), foram cultivadas em garrafas de cultura contendo Meio Essencial Modificado de Dulbecco (DMEM) com 10% SFB (Soro Fetal Bovino) a 37°C e 5% CO₂. As células foram observadas diariamente e o meio de cultura repostado se necessário, até a obtenção de uma monocamada confluyente de células. Foi então realizada uma lavagem das garrafas de cultura contendo monocamadas confluyentes com PBS 1x e com tripsina EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,25%, seguida de uma incubação com tripsina EDTA 0,25% a 37 °C até ser possível ressuspender as células por meio de leve agitação mecânica, sendo então ressuspensas com um volume igual de DMEM 10% SFB, de forma a parar a ação da tripsina. Utilizou-se alíquotas desta solução final para realizar o repique das células em novas garrafas de cultura contendo DMEM 10% SFB na proporção de 1:4 a 1:6 para manutenção da cultura ou na proporção de 1:2 para expansão viral após 24 horas de cultivo.

4.6 Cultura e expansão viral

As garrafas de cultura de 75cm² contendo monocamadas confluyentes de células MDCK, foram lavadas com meio de inoculação - DMEM com 1% de Penicilina e estreptomicina, 1% de antibiótico e antifúngico, 0,3% de BSA e 2,5% de HEPES 1M (Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-Piperazin Etanol Sulfônico) - de forma a remover células mortas e seus detritos, bem como vestígios de SFB, visto que este inibe a ação da tripsina. Em seguida, foram adicionados 5mL de meio de inoculação e os vírus diluídos 1:50 ou 1:100, provenientes ou do *Influenza Reagents Resource* (IRR), do Francis Crick Institute ou estirpes circulantes isoladas de amostras clínicas durante as atividades de referência do laboratório, sendo que uma segunda garrafa de 25cm² foi utilizada como controle negativo, sendo inoculada com volume correspondente de meio de inoculação apenas, incubando-se então ambas as garrafas por 1 hora a 37,5 °C e 5 % CO₂ para adsorção viral. Após a incubação foi retirado o sobrenadante e adicionados 15 mL de meio de inoculação com tripsina-TPCK (6-(1-tosylamido-2-fenil) etil cloromethyl cetona) a 2 µg/mL e uma nova incubação foi realizada, um passo essencial para possibilitar a infecção viral visto que a tripsina-TPCK realiza o papel fisiológico de proteases ao clivar a hemaglutinina. Foi avaliada diariamente a presença de efeito citopático, determinado por morte celular, presença de células soltas e perda de confluência da monocamada, por meio de microscópio de inversão, comparando-se com a garrafa controle negativo. Quando detectado o efeito citopático, realizou-se

o ensaio de hemaglutinação, determinando-se a necessidade de realização de nova passagem do vírus ou, se obtido um título de hemaglutinação adequado, estocagem a -80°C.

4.7 Ensaio de hemaglutinação

O teste de hemaglutinação baseia-se na capacidade dos FLUV de hemaglutinar hemácias devido à presença de HA viral, ocorrendo a ligação da HA das partículas virais com os ácidos siálicos presentes na superfície das hemácias em suspensão. Na ausência de interferentes, as hemácias precipitam, enquanto na presença de uma concentração suficiente de HA é formada uma rede tridimensional de hemácias e partículas virais ligadas, impedindo a sua precipitação. Os ensaios de hemaglutinação foram realizados em placas de microtitulação em polipropileno descartável, com 96 orifícios e fundo em “U”, pela diluição seriada de base 2 dos isolados virais, utilizando PBS 1x como diluente, ao longo de cada linha da placa. Após a diluição seriada foi adicionada a RBC, reservando-se uma linha para realização do controle negativo contendo apenas PBS e RBC, sendo então a placa levemente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Considerou-se o título hemaglutinante do vírus, em Unidades de Hemaglutinação (UHA) por 50µL, o inverso da diluição correspondente ao último poço onde ocorreu hemaglutinação total das hemácias, ou seja, onde não foi observado nenhum precipitado de hemácias no fundo do poço. Desta forma, foram titulados os vírus após a cultura e padronizada a sua concentração para uso nos ensaios de inibição de hemaglutinação.

4.8 Tratamento das amostras de soro e plasma

As amostras de soro e plasma, S1, S2 e S3 em duplicata, foram tratadas com RDE (*Receptor Destroying Enzyme*) na proporção 1:3 (10µL de soro) por 15 a 16 horas em banho-maria 37 °C, fazendo-se uso de uma placa de microtitulação para PCR de 96 poços vedada, sendo também tratados antissoros padrão para cada vírus, produzidos em coelhos, cabra, furões ou ovelhas, fornecidos pela OMS ou pelo Francis Crick Institute, e um plasma controle de título conhecido para cada vírus. Após a incubação, o RDE foi inativado a 56 °C por 30 minutos, sendo então adicionado PBS 1x e estando os plasmas diluídos 1:10 e livres de receptores inespecíficos. Adicionou-se então, precipitado de hemácias na proporção de 1:20 aos antissoros padrão, incubando-se a 4°C por 1 hora, homogenizando a intervalos regulares e centrifugando-se por final, de forma a remover todos os aglutinantes inespecíficos presentes em

seros de animais. Amostras de plasma que demonstraram indícios de inibição da hemaglutinação inespecífica nos ensaios de HI (inibição parcial da hemaglutinação em diversas diluições) também foram submetidas a este processo.

4.9 Titulação Reversa

Com base no título de hemaglutinação de cada um dos vírus foi calculado o fator de diluição necessário para obter uma solução de vírus com concentração final de 4 UHA/25 µL, a concentração utilizada nos ensaios de HI. Os isolados virais foram então diluídos em PBS 1x e realizada a titulação reversa, ou seja, um ensaio de hemaglutinação com a forma diluída do vírus, a fim de constatar se a sua forma diluída mantém a capacidade de ocasionar hemaglutinação até aos poços correspondentes às diluições de 1:8.

4.10 Ensaio de inibição da hemaglutinação (HI)

O ensaio de HI determina a capacidade de os anticorpos presentes no soro testado de inibir o processo de hemaglutinação (Figura 8) (169). Considera-se um estado de SP quando se observa um título de 1:40 no ensaio de HI, sendo este valor indicativo de uma redução de 50% na probabilidade de infecção (157,168–170). A SC pela exposição à TIV ocorre quando se detecta um aumento de pelo menos quatro vezes em relação ao título pré-vacinal (157,168–170).

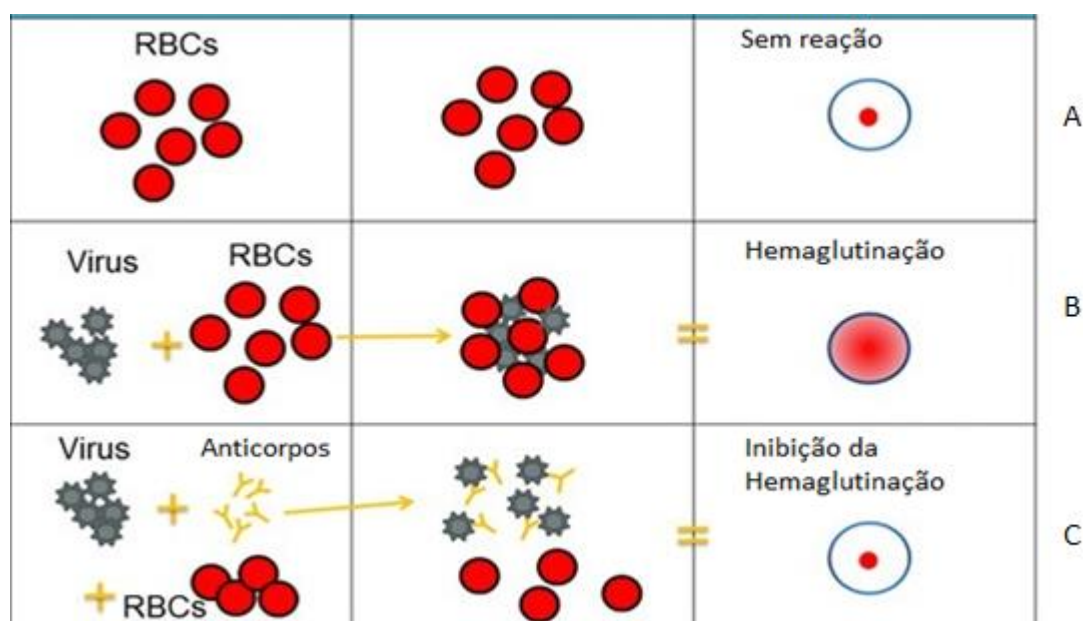


Figura 8: Esquema representativo do princípio do ensaio de inibição da hemaglutinação. Observa-se em (A) a suspensão de hemácias pura, com precipitação das hemácias, em (B) a suspensão de hemácias na presença do vírus, com a hemaglutinação ocorrendo, e em (C) a suspensão de hemácias

na presença do vírus e de anticorpos, com os anticorpos inibindo a hemaglutinação.

Fonte: Adaptado de CDC, 2019.

Foram realizados ensaios de inibição da hemaglutinação das amostras de soro ou plasma, S1, S2 e S3, em duplicata, contra estirpes vacinais correntes e passadas em cada ano, bem como estirpes circulantes representativas (Quadro 2). Estes ensaios foram realizados em placas de microtitulação em polipropileno, descartáveis com 96 orifícios, de fundo em “U”, onde foram realizadas diluições seriadas de base 2 das amostras de plasma ao longo de cada coluna, utilizando-se PBS 1x como diluente, sendo que na primeira linha seria adicionado 50 µL de soro com sua diluição prévia de 1:10, conforme esquematizado na figura 9. Foram também realizados controles negativos consistindo apenas de RBC e PBS (50 µL cada), controles positivos utilizando-se antissoros padrão, controles internos utilizando-se soros de títulos conhecidos para cada um dos vírus e controles positivos dos vírus (titulação reversa). Os controles foram feitos em uma placa de diluição de plasma, a cada 8 placas de HI (correspondentes a 1 placa de PCR para tratamento com RDE).

Em seguida, foram adicionados os vírus nas concentrações de 4 UHA/25 µL em todos os poços, exceto os correspondentes à titulação reversa e controle negativo, e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora (figura 9). Após a incubação, foi adicionado 50 µL de RBC em todos os poços, as placas foram levemente homogeneizadas e incubadas novamente por 1 hora. Considerou-se como título de inibição da hemaglutinação o inverso da diluição correspondente ao último poço onde ocorreu inibição total da hemaglutinação, contando que os limites de detecção correspondem aos títulos de 10 e 1280 visto que os plasmas estão previamente diluídos na proporção de 1:10 pelo tratamento com RDE. Desta forma, o ensaio de HI permite titular os anticorpos anti-HA específicos a cada estirpe presentes no soro de cada voluntário. Apesar de não geralmente utilizado para diagnóstico, pela possibilidade de imunidade prévia, este ensaio também é utilizado para caracterização antigênica das diferentes estirpes de influenza.

Quadro 2: Estirpes vacinais e circulantes de vírus influenza testadas no estudo em cada ano

		2018	2019	2020
H1N1	A/California/7/2009(H1N1) (CA)	x	x	
	A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI)	x	x	x
	A/Brisbane/02/2018 (H1N1) (BRI)			x
	A/Rio de Janeiro/1255/2018 (6B.1A1)		x	
	A/Parana/399/2019 (6B.1A2)		x	
	A/Santa Catarina/368/2019 (6B.1A5)		x	
H3N2	A/Hong Kong/4801/2014 (HK)	x		
	A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (SI)	x	x	
	A/Switzerland/8060/2017 (SW)		x	x
	A/SouthAustralia/34/2019 (SA)			x
B	B/Brisbane/60/2008 (Victoria) (BR)	x		
	B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH)	x	x	
	B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO)		x	x
	B/Washington/02/2019 (Victoria) (WA)			x
	B/Santa Catarina/1206/2018 Y3 (Yamagata)		x	
	B/Parana/69/2019 (V1A.1)		x	
	B/Bahia/162/2019 (V1A.1)		x	

*As estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo estão destacadas em azul, as estirpes componentes da vacina em anos anteriores em verde e as estirpes circulantes em cinza

Fonte: Capão, Artur. 2021

Em cada ano foram testadas seis estirpes vacinais, as três componentes da vacina do ano e três estirpes componentes da vacina em anos anteriores para cada subtipo, como detalhado no Quadro 2. Além destas estirpes, em 2019 também foram testadas seis estirpes circulantes, representativas de diferentes clados, coletadas durante as atividades de vigilância desempenhadas pelo LVRS, sendo três estirpes de H1N1: A/Rio de Janeiro/1255/2018 (6B.1A1), A/Parana/399/2019 (6B.1A2) e A/Santa Catarina/368/2019 (6B.1A5); e três estirpes de influenza B: B/Santa Catarina/1206/2018 (Y3), B/Parana/69/2019 (V1A.1) e B/Bahia/162/2019 (V1A.1).

Amostras		1S1	1S1	1S2	1S2	2S1	2S1	2S2	2S2	C.N.	T.R.	AS P.	AS P.
Diluição ↓		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10	A	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO	XO+	XO+	XO+
20	B	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO	XO+	XO+	XO+
40	C	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO	XO+	XO+	XO+
80	D	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO	XO+	XO+	XO+
160	E	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO	XO+	XO+	XO+
320	F	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO	XO+	XO+	XO+
640	G	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO	XO+	XO+	XO+
1280	H	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO+	XO	XO+	XO+	XO+

Figura 9: Ilustração representativa de uma placa de microtitulação com os conteúdos finais de todos os poços em um ensaio de HI: a solução de hemácias está representada por “O”, o vírus representado por “+”, o PBS por “X”, os plasmas por “I” e a seta indicando o sentido da diluição seriada, demonstrando o posicionamento das amostras de plasma, em duplicata, pré e pós-vacinais (S1 e S2) bem como os anti-soros padrão (AS P.), titulação reversa (T.R.) e controle negativo (C.N.).

Fonte: Capão, Artur. 2021

A interpretação dos resultados dos ensaios de HA e HI é passível de subjetividade na determinação do que representa inibição ou hemaglutinação **total**, sendo então definido e padronizado um ponto de corte, como exemplificado na figura 10. A inibição inespecífica, previamente citada, deve-se a capacidade de componentes presentes no soro de inibirem, parcialmente, o processo de inibição da hemaglutinação, observando-se o efeito detalhado na figura 10 (C) em diversas diluições, necessitando então do tratamento do soro, como detalhado no passo 4.8. (173).

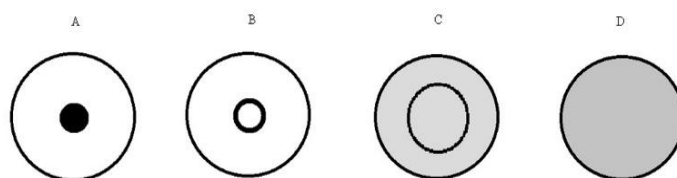


Figura 10: Interpretação dos ensaios Hemaglutinação e Inibição da Hemaglutinação: esquematização dos limiares estabelecidos para determinação da ocorrência de hemaglutinação (D), hemaglutinação parcial (C) ou não ocorrência de hemaglutinação (A e B) nos ensaios de HI e HA.

Fonte: Capão, Artur. 2021.

Na Figura 11 pode-se observar uma placa onde foi realizado um ensaio de inibição de hemaglutinação, observando-se também exemplos de soroconversão e soroproteção.

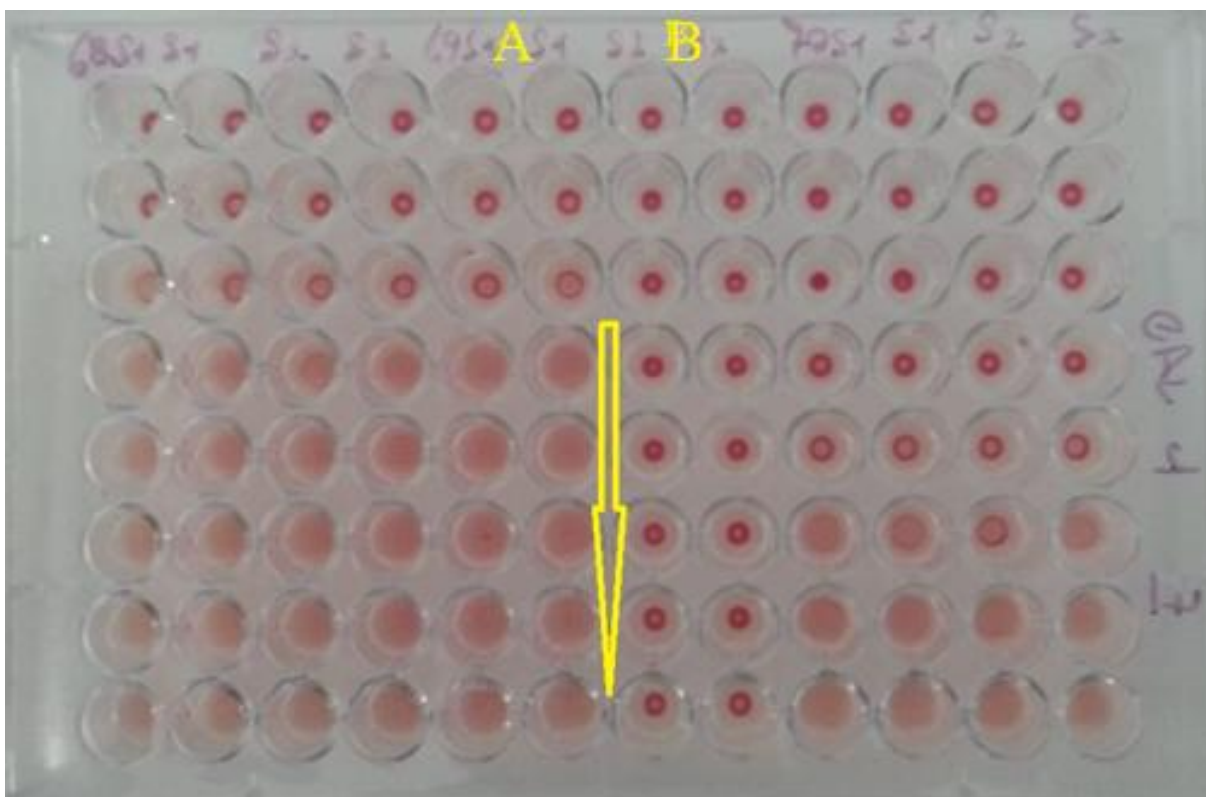


Figura 11: Placa de ensaio de inibição da hemaglutinação: na figura observa-se o resultado de um ensaio de inibição de hemaglutinação para uma estirpe de influenza A/H1N1, sendo em (A) os soros pré-vacinais (S1) em duplicata e em (B) os soros pós-vacinais (S2), em duplicata. É possível observar que foi atingido o limiar de soroproteção, com títulos de pelo menos 40, e de soroconversão, com um aumento de pelo menos quatro vezes entre títulos pré e pós-vacinais.

Fonte: Capão, Artur. 2021.

4.11 Acompanhamento de voluntários, coleta de amostra de swab de nasofaringe e imunofluorescência

Em cada ano, além de auto-reportagem por parte dos voluntários, foi realizado o acompanhamento periódico dos voluntários, através do contato por *whatsapp*, telefone ou e-mail, e em caso de apresentação de sintomas indicativos de infecção por FLUV, como coriza, tosse e febre, foram coletados 3 *swabs*, 1 de orofaringe (região da faringe e tonsilas) e 2 de nasofaringe (1 para cada narina), obtendo-se células das mucosas por fricção, e agregando os 3 *swabs* coletados em um tubo de propileno contendo Solução de Meio de Transporte Viral (DMEM 2% BSA, 1% Antibiótico e Antifúngico). As amostras foram centrifugadas, sendo realizado um processo de lavagem e ressuspensão em PBS com o *pellet*, sendo então adicionados 25 μ L da suspensão de células em diversos pontos (círculos) de uma lâmina, que foi seca à

temperatura ambiente e fixação com acetona gelada. Após a fixação, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta para detecção de FLUAV, FLUBV, Vírus Respiratório Sincicial, Parainfluenza 1, 2 e 3, Metapneumovírus e Adenovírus, adicionando-se 25 µL de anticorpos monoclonais específicos a cada vírus, seguindo-se uma incubação a 37°C por 30 minutos e posteriores lavagens com PBS. Em seguida, foi adicionado o anticorpo *anti-mouse* IgG conjugado com fluoresceína, repetindo-se o processo de incubação e lavagem. Por fim, foi adicionado 25 µL do fluido de montagem a cada círculo e as lâminas foram observadas em microscópio de imunofluorescência. Observando um mínimo de três células por campo, de forma a evitar falsos negativos, considerou-se um resultado positivo ao observar-se pelo menos três células intactas emitindo fluorescência no padrão específico a cada vírus, após verificação dos controles positivos e negativos.

4.12 Extração de RNA

Com o sobrenadante das amostras de swab nasofaríngeo em meio de transporte viral, foi realizada a extração de RNA por lise das partículas virais e executado o método de coluna com membrana de sílica em gel, utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), segundo protocolo estabelecido na rotina do LVRS e armazenando-se o material a -80°C, para uso posterior.

4.13 Detecção por RT-PCR

As amostras de RNA obtidas das coletas de *swab* foram submetidas à transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qRT-PCR *one-step*) para detecção de FLUAV, FLUBV, FLUAV H1N1, FLUAV H3N2, Vírus Respiratório Sincicial, Parainfluenza 1, 2 e 3, Metapneumovírus e Adenovírus, utilizando o *kit* SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase- (Invitrogen, EUA), e protocolo estabelecido pelo LVRS e fornecido pelo CDC Atlanta para detecção de FLUAV, FLUBV, Vírus Respiratório Sincicial, Parainfluenza 1, 2 e 3, Metapneumovírus e Adenovírus, utilizando o ABI 7500 StepOnePlus (174). A transcrição reversa foi realizada em um ciclo de 30 minutos a 50°C, a ativação enzimática em um ciclo de 2 minutos a 95°C e seguindo-se 45 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e amplificação (55°C por 30 segundos). A cada ensaio foram realizados controles negativos da extração (MOCK), controles negativos da amplificação, controles positivos da extração (gene da RNase P Humana) e controles positivos da amplificação de cada alvo.

4.14 Sequenciamento da região da HA dos vírus influenza

Amostras positivas para FLUV foram submetidas a sequenciamento da HA pelo método de Sanger, segundo protocolo estabelecido na rotina do LVRS, utilizando o *kit* Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA) para a obtenção do cDNA, seguido por amplificação por PCR convencional utilizando a enzima Taq Platinum-Thermofisher, purificação por ExoSAP-IT-Thermofisher e por fim o sequenciamento utilizando o *kit* BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems, EUA). Os produtos foram analisados no Prism 3130XL Genetic Analyser (Life Technologies, EUA).

4.15 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos resultados foram utilizados testes-t pareados e não pareados, teste de Bartlett para variâncias, ANOVA uni-direcional, teste de comparação múltipla de Newamn-Keuls ou de Dunn, testes de Pearson e Spearman, entre outros, com o uso do *software* Prism 5 (GraphPad), averiguando-se a possível existência de diferenças significativas e correlações entre os títulos de HI e variáveis como idade e estado vacinal prévio, considerando-se intervalos de confiança >95% e valores de $p < 0,05$. Os índices de SP e taxas de SC foram calculados como a frequência da população que apresentou títulos de HI de pelo menos 40 ou aumentos de pelo menos 4 vezes entre títulos pré e pós-vacinais, respectivamente. Variáveis categóricas e sua associação com a SP e SC foram avaliadas através do cálculo da Razão de Possibilidades (*Odds Ratio*), utilizando o teste Qui-Quadrado com testes exatos de Fisher no *software* SPSS Statistics v.19 (IBM).

5. RESULTADOS

A nossa população de estudo foi composta de 113 voluntários em 2018, 132 em 2019 e 30 em 2020 (Tabela 1). Em todos os anos, a maior parte da população foi do sexo feminino e a maior parte já havia sido vacinada com a TIV em anos anteriores ao estudo, sendo 78% previamente vacinados em 2018, 65% em 2019 e 93% em 2020. Calculado com base no índice de massa corporal (IMC), observamos que 17% da população era obesa em 2019, seja obesidade de grau I ou II, e 74% possuíam IMC na faixa normal ou sobrepeso.

Em 2018, 8% dos voluntários possuíam 60 anos ou mais, em 2019, 27% dos voluntários eram idosos e, em 2020, apenas 1 voluntário era idoso, com as faixas de idade, médias e medianas detalhadas na tabela 1. Em 2019, 86% dos idosos e 58% dos jovens já haviam sido vacinados para influenza em anos anteriores. Em 2018, 95 voluntários realizaram a coleta S3. Todas as coletas de sangue estavam disponíveis de 39 voluntários em 2018 e 2019, e 13 voluntários realizaram todas as coletas de sangue nos três anos de estudo.

Tabela 1: Características das coortes estabelecidas para a avaliação do impacto da obesidade, idade e imunidade prévia após imunização com a vacina trivalente inativada de para influenza nas temporadas de 2018, 2019 e 2020.

Ano	Sexo			Idade			Vacinação Prévia		Obesidade			
	Total (n)	M(n)	F (n)	<60 (n)	≥60 (n)	Mediana (anos)	Média (anos)	Min-Máx (anos)	Vacinados (n)	Não Vacinados (n)	IMC<30 (n)	IMC≥30 (n)
2018	113	25	88	104	9	34	36,6	20-70	90	25	-	-
2019	132	37	95	97	35	41	44,7	21-86	85	46	97	22
2020	30	9	21	27	1	36	38	25-60	28	2	23	3

* M- masculino; F – feminino; <60 – menos de 60 anos de idade; >60 –60 ou mais anos de idade; IMC – índice de massa corporal.

5.1 Títulos de anticorpos anti-hemaglutinina dos diferentes componentes vacinais induzidos pela TIV em 2018, 2019 e 2020

Como podemos observar na figura 12, os títulos de HI em média geométrica (GMT), seja S1, S2 ou S3, mantiveram-se consistentemente acima do limiar de SP em todos os anos, para quase todas as estirpes, sendo a única exceção o GMT S1

da estirpe B/Colorado em 2019. Observamos aumentos significativos induzidos pela vacinação entre títulos de S1 e S2 para todas as estirpes vacinais, em todos os anos.

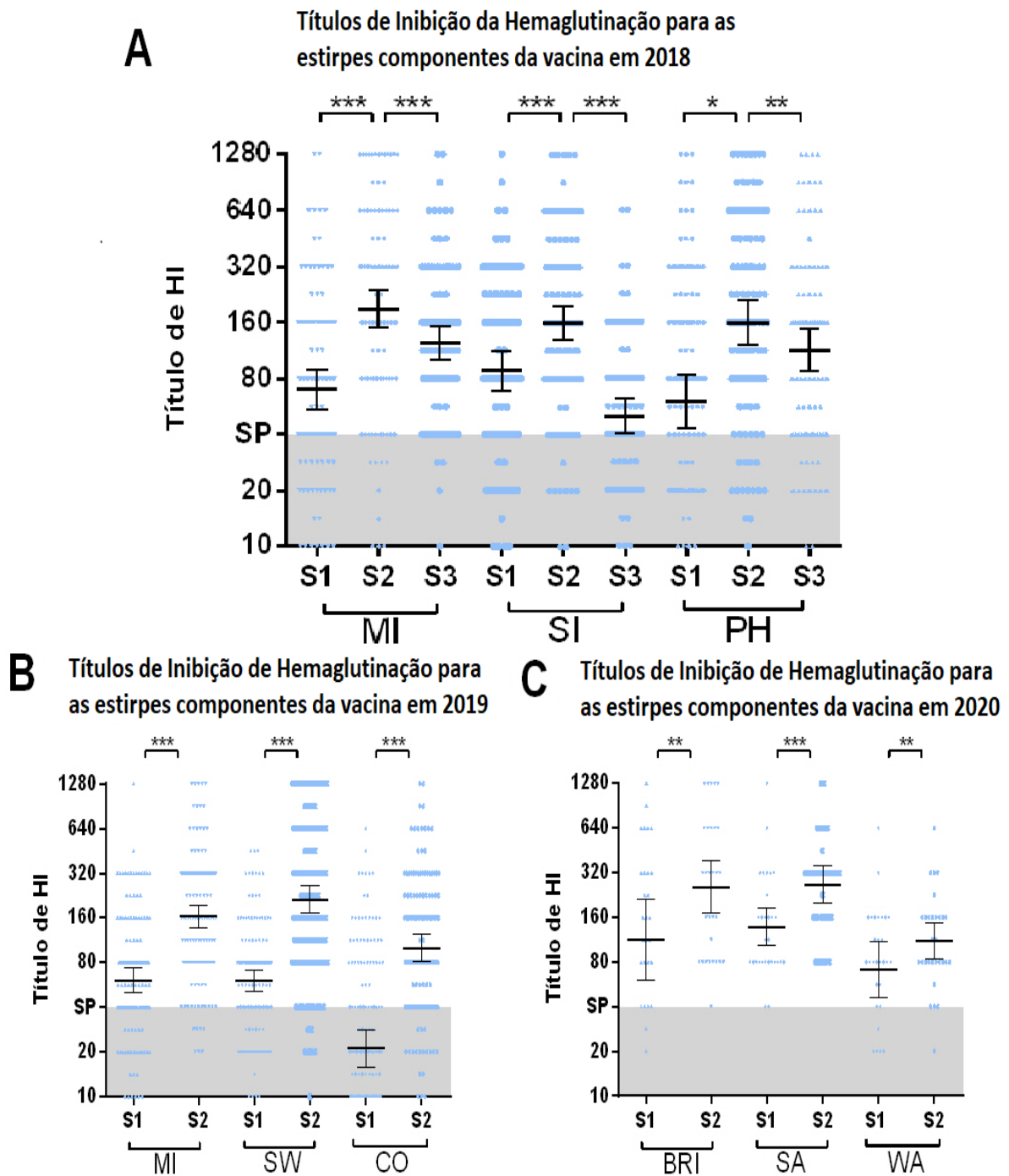


Figura 12: Títulos de HI para os componentes vacinais em cada ano do estudo. Os títulos de HI estão representados em azul, com a média geométrica e os intervalos de confiança 95% destacados pelas linhas pretas, para as estirpes vacinais dos anos de 2018, 2019 e 2020. Em (A) observa-se os componentes vacinais de 2018: A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) (SI) e B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH); Em (B) observa-se os componentes vacinais de 2019: A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW) e B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO); Em (C) A/Brisbane/02/2018 (H1N1) (BRI), A/SouthAustralia/34/2019 (H3N2) (SA) e B/Washington/02/2019 (Victoria) (WA). Diferenças significativas detectadas por testes-t pareados entre títulos pré-vacinais (S1), pós-vacinais (S2) e 6 meses após a vacinação (S3) estão representadas como * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$, com o limiar de soroproteção (SP), igual a 40, destacado em cinza.

5.2 Níveis de soroproteção (SP), antes e após a vacinação, e de soroconversão (SC) em relação aos vírus componentes da vacina de 2018, 2019, 2020

Ao avaliarmos os índices de SP antes da vacinação (S1), observamos valores relativamente altos, sendo 42% para CO em 2019 o menor valor observado, com índices acima de 67% para as restantes estirpes vacinais (tabela 2). A vacina foi capaz de induzir aumentos nos índices de SP, observando-se valores de pelo menos 84% para estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo, e das nove estirpes/ano testadas, seis obtiveram SP S2 acima de 90%.

Tabela 2: Porcentagens de soroproteção pré-vacinal (S1), pós-vacinal (S2) e soroconversão para os componentes vacinais, por ano de análise.

Estirpes Vacinais	2018			2019			2020		
	SP S1	SP S2	SC	SP S1	SP S2	SC	SP S1	SP S2	SC
A/Michigan/45/2015 (H1N1)	75	92	35	77	95	32			
A/Brisbane/02/2018(H1N1)							84	97	19
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	82	85	17						
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)				77	94	41			
A/South Australia/34/2019(H3N2)							97	97	26
B/Phuket/3073/2013 (Yamagata)	67	85	25						
B/Colorado/06/2017 (Victoria)				42	84	46			
B/Washington/02/2019(Victoria)							77	94	13

As taxas de SC observadas foram relativamente baixas, variando de 13% a 46%, sendo maiores para MI em 2018 do que para SI com OR 2,71 (1,45-4,85, $p < 0,01$) e menor para MI do que CO em 2019 com OR 0,54 (0,33-0,91, $p < 0,05$). Em seguida, calculamos também a razão entre títulos pós e pré-vacinais entre GMT S1 e GMT S2 ($S2/S1$), obtendo-se medianas de 1,41 a 2,83, figura 13. A análise estatística entre os aumentos de GMT entre S1 e S2 para cada ano demonstrou uma resposta variada entre os componentes vacinais.

Em 2018, a estirpe de H3 (SI) induziu um menor aumento de GMT que os componentes de H1 (MI) e FLUBV (PH). Em 2019, o componente vacinal de influenza B (CO) induziu um maior aumento de GMT que o componente H1 (MI). Já em 2020, não foram detectadas diferenças significativas na resposta aos diferentes

componentes vacinais. Quando foi feita a análise de diferenças estatística entre um mesmo tipo de vírus (H1, H3 ou influenza B) ao longo de diferentes anos, foi possível observar que a resposta ao componente H1N1 se manteve inalterada entre os anos e as diferentes coortes avaliadas. Já a resposta ao componente H3N2 foi mais intensa em 2019 que em 2018, assim como a resposta ao componente de influenza B. No ano de 2020 não foram encontradas diferenças significativas, devido ao reduzido tamanho amostral.

Razão entre títulos GMT pós e pré-vacinais (S2/S1)

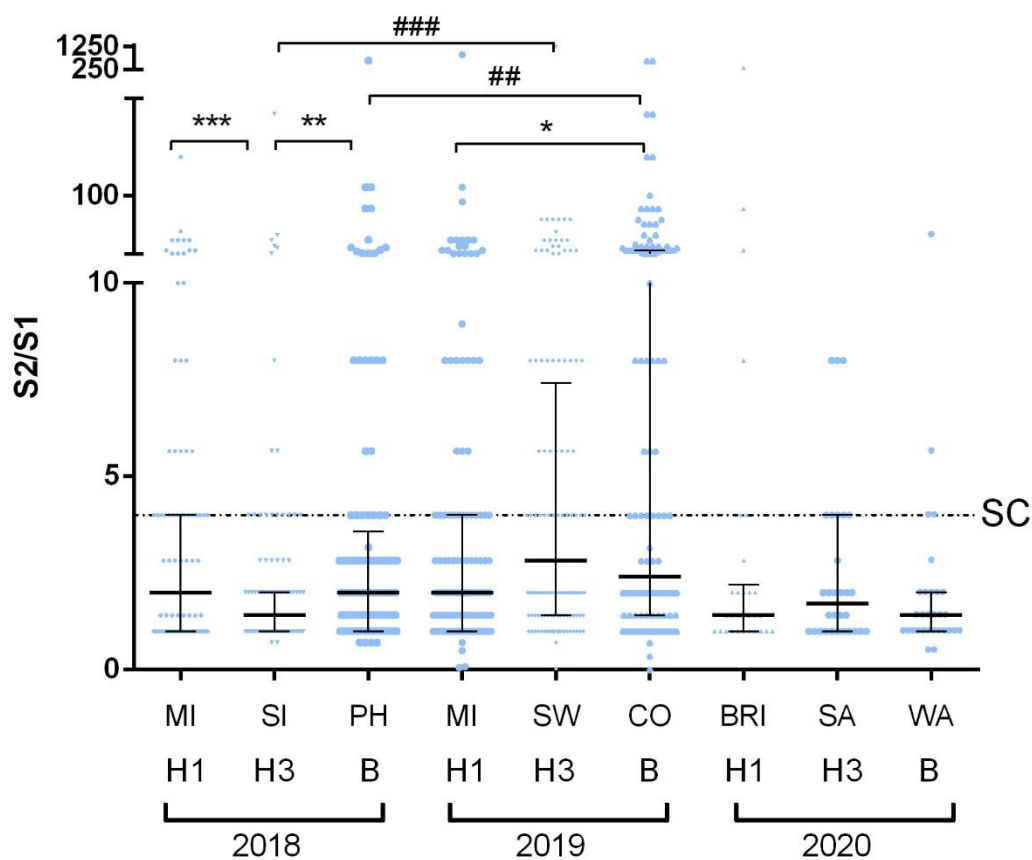


Figura 13: Razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de cada ano: Observe nos gráficos, em azul, a razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de 2018, 2019 e 2020, com as medianas e intervalos interquartis destacados pelas linhas pretas. As estirpes vacinais de H1N1 testadas foram: A/Michigan/45/2015 (MI) e A/Brisbane/02/2018 (BRI), de H3N2: A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (SI), A/Switzerland/8060/2017 (SW) e A/SouthAustralia/34/2019 (SA) e de influenza B: B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH), B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO) e B/Washington/02/2019 (Victoria) (WA). Diferenças significativas entre componentes do mesmo ano estão representadas como * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ em testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla de Dunn. Diferenças entre o mesmo componente entre 2018 e 2019 estão representadas como ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$ em testes-t pareados.

5.3 Avaliação da proteção cruzada induzida pela TIV

Em cada ano, foi também avaliada a resposta a estirpes componentes da vacina de anos anteriores, realizando-se uma comparação desta resposta com as estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo, para cada subtipo/linhagem. Com a exceção da estirpe B/Colorado em 2020, ano em que não era componente da vacina, a TIV foi capaz de induzir aumentos significativos entre títulos S1 e S2 para as componentes de anos anteriores, com a média geométrica dos títulos mantendo-se acima do limiar de soroproteção para todas estas estirpes (dados não mostrados). Os níveis de SP em S1 para estas estirpes foram acima de 60% e de SP em S2, acima de 80%, Figura 14. Em seis das nove estirpes testadas ao longo dos três anos, a SP em S2 foi de pelo menos 90% (Figura 14).

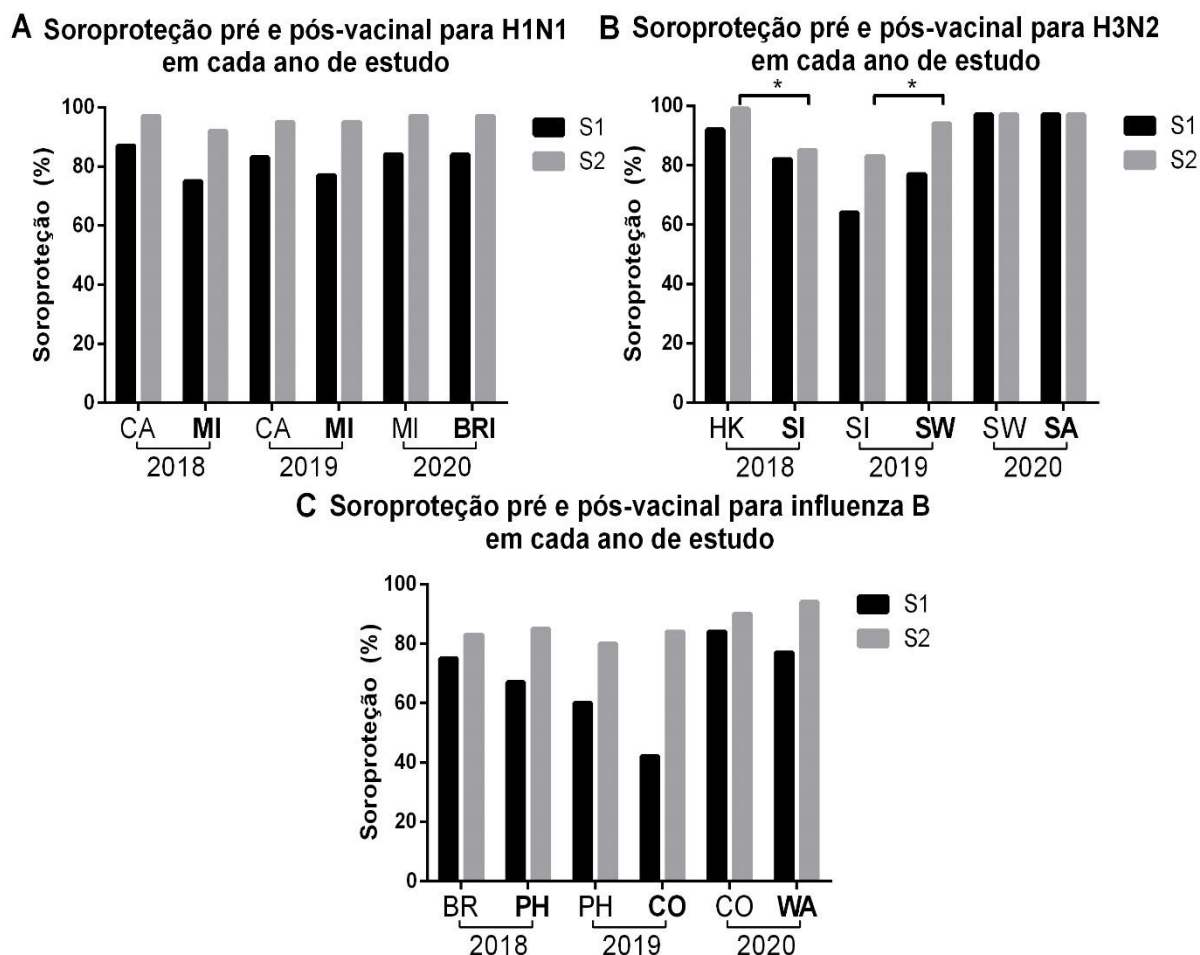


Figura 14: Comparativo entre os índices de soroproteção de componentes da vacina em cada em cada ao de estudo e o respectivo componente de anos anteriores: (A) índices de soroproteção (SP - título de inibição de hemaglutinação acima de 40) pré-vacinais (S1) e pós-vacinais (S2) para os componentes de H1N1: A/California/7/2009(H1N1) (CA), A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI) e A/Brisbane/02/2018 (H1N1) (BRI); (B) SP S1 e S2 para os componentes de H3N2: A/Hong Kong/4801/2014 (HK), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (SI), A/Switzerland/8060/2017 (SW) e A/SouthAustralia/34/2019 (SA); e (C) SP S1 e S2 para os componentes de influenza B: B/Brisbane/60/2008 (Victoria) (BR),

B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH), B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO) e B/Washington/02/2019 (Victoria) (WA). Os componentes da vacina de cada ano estão destacados em negrito. Associações entre diferentes estirpes e a soroproteção S2 foram avaliadas através do cálculo da Razão de Possibilidades (Odds Ratio), utilizando o teste Qui-Quadrado com testes exatos de Fisher, com * representando $p < 0,05$.

Os índices de SP da S2 foram relativamente semelhantes entre as estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo e as estirpes componentes da vacina em anos anteriores, com a exceção dos H3N2 em 2018, em que SI apresentou menores índices do que HK com OR 0,10 (0,01-0,65, $p < 0,05$), e em 2019, em que os valores de SW foram maiores que SI com OR 3,1 (1,35-6,82, $p < 0,05$). As taxas de SC foram relativamente baixas, variando de 10% a 26%, Figura 15. Os valores de SC foram semelhantes entre os H1N1 nos três anos de estudo. Para influenza B, as estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo apresentaram valores maiores que os componentes de anos anteriores em 2018 (OR 2,51, 1,15-5,62, $p < 0,05$) e em 2019 (OR 3,19, 1,85-5,36, $p < 0,001$). Já para os H3N2, em 2019 a estirpe componente da vacina no ano de estudo SW apresentou maiores valores que a estirpe componente da vacina em anos anteriores SI (OR 2,08, 1,23-3,49, $p < 0,01$).

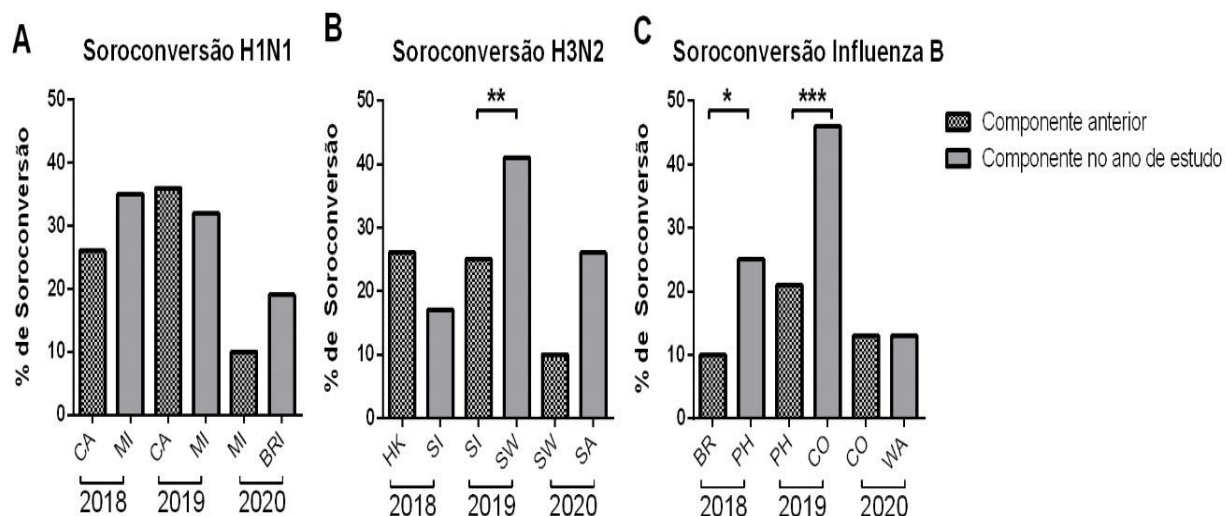


Figura 15: Comparativo entre as taxas de soroconversão entre as estirpes componentes da vacina em cada em cada ao de estudo e a respectiva estirpe componente de anos anteriores: (A) taxas de soroconversão (aumento de pelo menos 4 vezes entre títulos de inibição de hemaglutinação pré e pós-vacinais) para os componentes de H1N1: A/California/7/2009(H1N1) (CA), A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI) e A/Brisbane/02/2018 (H1N1) (BRI), (B) soroconversão para os componentes de H3N2: A/Hong Kong/4801/2014 (HK), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (SI), A/Switzerland/8060/2017 (SW) e A/SouthAustralia/34/2019 (SA); e (C) soroconversão para os componentes de influenza B: B/Brisbane/60/2008 (Victoria) (BR), B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH), B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO) e B/Washington/02/2019 (Victoria) (WA). Associações entre diferentes estirpes e a soroproteção S2 foram avaliadas através do cálculo da Razão de Possibilidades (Odds Ratio), utilizando o teste Qui-Quadrado com testes exatos de Fisher, com * representando $p < 0,05$, ** representando $p < 0,01$ e *** representando $p < 0,001$.

Em seguida, calculamos também a razão entre títulos pós e pré-vacinais entre GMT S1 e GMT S2 ($S2/S1$), com medianas variando de 1,0 a 2,0 para componentes da vacina em anos anteriores e 1,41 a 2,83 para componentes da vacina no ano de estudo (Figura 16). Nesta comparação, os valores entre os H1N1 foram semelhantes em todos os anos, enquanto os influenza B e os H3N2 apresentaram diferenças significativas entre as estirpes em 2018 e 2019, sendo maiores para os componentes em cada ano de estudo do que para os respectivos componentes da vacina em anos anteriores, com a exceção dos H3N2 em 2018, em que foi maior para A/HongKong (anterior) do que A/Singapura (atual).

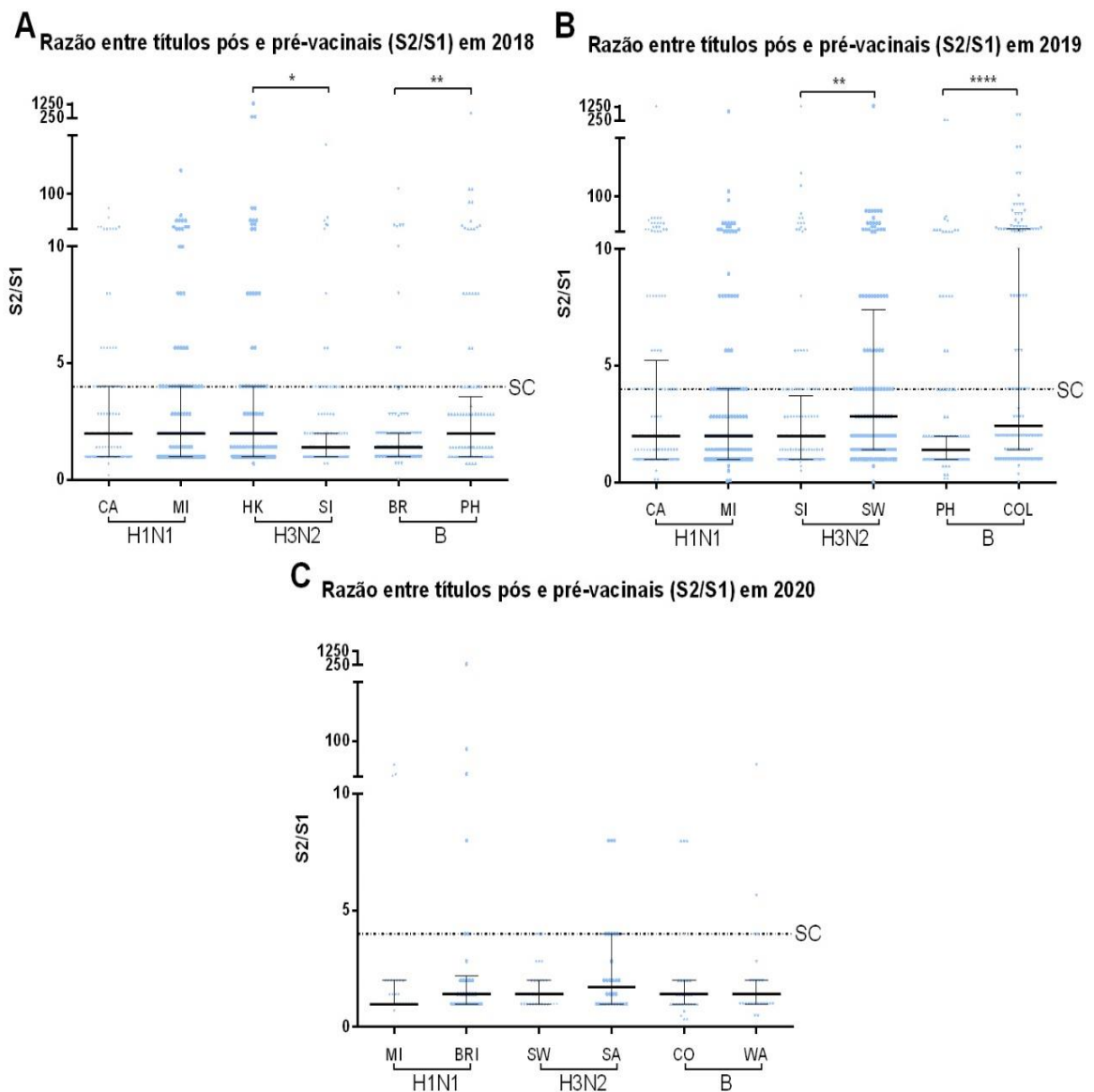


Figura 16: Comparativo entre a razão entre títulos pós e pré-vacinais em relação a estirpes componentes da vacina em cada em cada ao de estudo e o respectivo componente de anos anteriores:

observa-se nos gráficos, em azul, a razão entre títulos pós e pré-vacinais, definidos como a razão entre os títulos de inibição da hemaglutinação em média geométrica (GMT) pós-vacinais (S2) e pré-vacinais (S1). (A) Estirpes testadas no ano de 2018: A/California/7/2009(H1N1) (CA), A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), A/Hong Kong/4801/2014(H3N2) (HK), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) (SI), B/Brisbane/ 60/2008 (Victoria) (BR) e B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH); (B) diferenças entre as estirpes testadas em 2019: CA, MI, SI, A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW), PH e B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO); e (C) diferenças entre as estirpes testadas em 2020: MI, A/Brisbane/02/2018 (H1N1) (BRI), SW, A/SouthAustralia/34/2019(H3N2) (SA), CO e B/Washington/02/2019 (Victoria) (WA). Diferenças significativas entre estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo e os respectivos componentes da vacina em anos anteriores anteriores em testes-t pareados estão representadas como * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. As medianas e os intervalos interquartis estão destacadas pelas linhas pretas.

No ano de 2019 avaliamos a proteção induzida pela vacina em relação a estirpes circulantes, isoladas em cultura celular, a partir de amostras clínicas de pacientes infectados e que chegaram ao LVRS através da rede de vigilância para influenza, representativas de diferentes clados. Os soros de 48 indivíduos foram testados em relação às seis estirpes circulantes avaliadas, sendo 3 de influenza A H1N1 e 3 de influenza B, observando-se que a vacina induziu aumentos significativos entre GMT S1 e GMT S2 para todas as estirpes (tabela 3).

Tabela 3: Valores de soroproteção, soroconversão e aumentos nos títulos de inibição de hemaglutinação pré-vacinais para estirpes circulantes e vacinais (n=48) em 2019

		Soroproteção S1 (%)	Soroproteção S2 (%)	Soroconversão (%)	GMT S1 - GMT S2
Estirpes Circulantes	A/Rio de Janeiro/1255/2018 (6B.1A1 - H1N1)	52	75	27	50,9-117,9 ***
	A/Parana/399/2019 (6B.1A2 - H1N1)	70	92	32	76,9-186,4 ***
	A/Santa Catarina/368/2019 (6B.1A5 - H1N1)	71	90	26	84,7-197,3 ***
	B/Parana/69/2019 (V1A.1 - Victoria)	63	96	37	39,7-147,1 ***
	B/Bahia/162/2019 (V1A.1 - Victoria)	68	93	38	48,7-149,4 ***
	B/Santa Catarina/1206/2018 (Y3-Yamagata)	65	86	17	49,2-81,8 ***
Estirpes Vacinais	A/California/7/2009(6B.1 - H1N1)	85	94	31	128,5-259,5 **
	A/Michigan/45/2015(6B.1A1 - H1N1)	79	94	27	64,4-136,6
	B/Phuket/3073/2013(Y3 - Yamagata)	69	81	17	62,2-105,3 *
	B/Colorado/06/2017(V1A.2 - Victoria)	50	85	33	31,2-109,9 ***

* Diferenças significativas entre títulos de inibição da hemaglutinação pré (GMT S1) e pós-vacinais (GMT S2) em testes-t pareados estão representados como * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Estirpes componentes da vacina no ano de 2019 estão destacadas em negrito.

A estirpe A/Parana (6B.1A2) apresentou valores de SC, SP e GMT muito semelhantes à estirpe vacinal MI (6B.1A1), enquanto a estirpe A/Rio de Janeiro

(6B.1A1) apresentou valores de SC semelhantes, mas menor SP S2 (OR 0,20, 0,06-0,73, $p < 0,05$) e GMT. Por sua vez, a estirpe A/Santa Catarina (6B.1A5) apresentou valores de SP e SC semelhantes à estirpe vacinal, mas apresentou maior GMT que a estirpe vacinal. Em relação às estirpes de influenza B, observamos que as taxas de SC foram maiores nas linhagens B/Parana e B/Bahia (Victoria) do que na linhagem B/Santa Catarina (Yamagata) (OR 0,22, 0,08-0,56, $p < 0,01$ e 0,24, 0,09-0,62, $p < 0,01$), em concordância com a estirpe vacinal que era da linhagem Victoria (CO). Os valores de SC e SP das estirpes circulantes da linhagem Victoria foram semelhantes à CO, mas os valores de GMT S2 foram maiores, com a SC e GMT S2 para PH sendo inferior (OR 0,22, 0,08-0,56, $p < 0,01$). A linhagem B/Santa Catarina apresentou valores de SC e GMT menores que todas as outras estirpes, seja vacinais ou circulantes, mas apresentou valores de SC e SP S2 semelhantes à estirpe PH em 2019.

5.4 Títulos de anticorpos contra os componentes vacinais ao longo dos anos

No ano de 2018 foram realizadas 3 coletas de sangue, sendo a última, S3, 6 meses após a vacinação. Observamos uma diminuição significativa entre GMT S2 e GMT S3 para todas as estirpes (dados não mostrados). No entanto, isto não se traduziu em uma grande diminuição nos índices de SP (3%-13%, Figura 17), com a exceção do A/Singapura ($< 25\%$, OR 0,19, 0,09-0,44, $p < 0,001$).

Soroproteção 21 dias após a vacina (S2) e 6 meses após a vacina (S3)

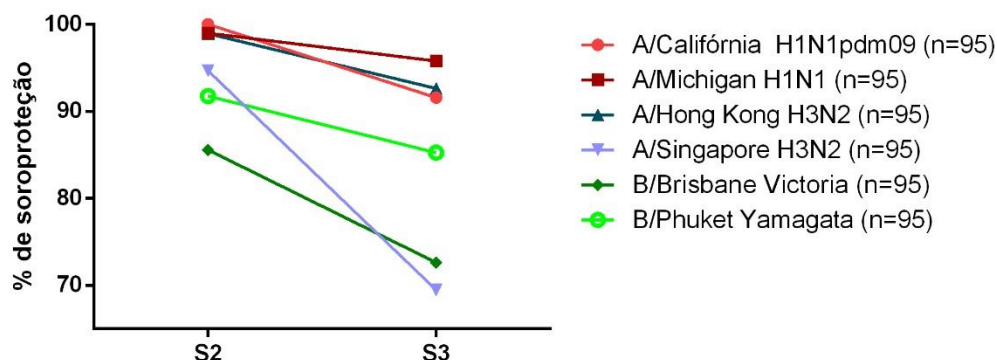


Figura 17: Índices de soroproteção 21 dias e 6 meses após a vacinação para todas as estirpes analisadas no ano de 2018.

Através do seguimento dos 39 voluntários que se mantiveram no estudo ao longo de 2018 e 2019 e dos 13 voluntários que se mantiveram no estudo ao longo de 2018, 2019 e 2020 observamos a cinética de GMT para as estirpes de H1N1 com os

títulos aumentando após a vacinação e decaindo constantemente até ser administrada uma nova dose, não sendo detectadas diferenças entre os valores de S1 dos diferentes anos, com aumentos significativos entre S1 e S2 apenas em 2018 (Figura 18). Este padrão repete-se tanto para a estirpe componente da vacina no ano de estudo como para a respectiva estirpe componente da vacina em anos anteriores. Ao analisarmos as taxas de SC da população de indivíduos, observamos que as taxas eram semelhantes entre 2018 e 2019 para cada estirpe, seja componente da vacina no ano de estudo ou componente da vacina em anos anteriores.

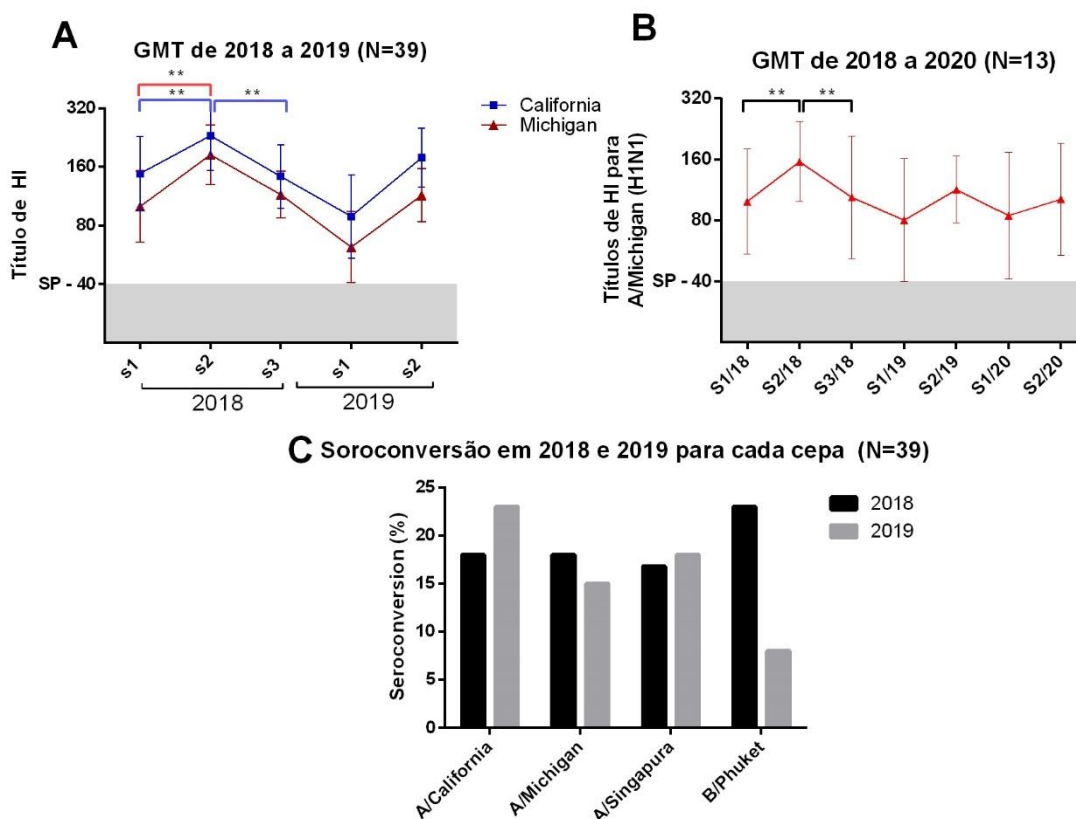


Figura 18: Dinâmica dos anticorpos induzidos pela vacinação nos voluntários acompanhados no estudo ao longo dos anos: (A) títulos de inibição de hemaglutinação (HI) em média geométrica pré-vacinais (S1), pós-vacinais (S2) e 6 meses após a vacina (S3) para os componentes H1N1 analisados em 2018 e 2019: A/California/7/2009(H1N1) (CA) e A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), com os intervalos com confiança 95% destacados. (B) títulos de inibição de hemaglutinação (HI) em média geométrica para o componente MI, estirpe analisada nos três anos de estudo, com os intervalos de confiança destacados, em S1, S2 e S3. (C) taxas de soroconversão (aumentos de 4 vezes entre GMT HI S1 e S2) para as estirpes analisadas tanto em 2018 como em 2019: A/California/7/2009(H1N1) (CA), A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (SI) e B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH).

5.5 Avaliação de infecção após a vacinação

Durante o acompanhamento dos voluntários, foram coletadas 13 amostras de swabs de naso e orofaringe em casos de sintomas indicativos de infecção por influenza, como sintomas respiratórios com febre. Apenas um caso positivo para

influenza foi detectado, sendo em uma paciente jovem (37 anos), sem comorbidades e que já havia sido previamente vacinada para influenza, sendo classificado como influenza A H1N1 por qRT-PCR. O diagnóstico ocorreu 46 dias após a vacinação em 2018 e o sequenciamento da HA demonstrou tratar-se de uma estirpe A/Michigan/45/2015(H1N1)-like pertencente ao subclado 6B1.1A1. A voluntária não soroconverteu para nenhum dos vírus vacinais, mas ficou soroprotégida para todas as estirpes, com a exceção do MI, com os títulos em GMT S1 de <10, em GMT S2 de 10 e em GMT S3 de 320. Para CA apresentou títulos de 160, 320 e 640 em GMT S1, S2 e S3, respectivamente.

5.6 Comparação dos títulos de anticorpos, índices de SP e SC contra o vírus A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2) entre a coorte de 2018 e uma coorte de indivíduos saudáveis de São Paulo

Através de uma colaboração, foi realizada uma comparação de dados de HI contra o componente vacinal SI em 2019 entre uma coorte de indivíduos saudáveis de São Paulo (população USP) com a população Fiocruz. A população USP foi composta de 77 indivíduos, sendo 5 vacinados pela primeira vez e 7 idosos, e as idades variando dos 18 aos 70 anos, com média de 40,7 (mediana 39). Como detalhado na tabela 4, foram observados aumentos significativos entre S1 e S2 para ambas as populações e as taxas de soroproteção S2 e soroconversão foram relativamente semelhantes entre as populações. No entanto, os valores de GMT tanto em S1 como em S2 foram significativamente maiores na população Fiocruz do que na população USP.

Tabela 4: Valores de soroproteção pré (SP S1) e pós-vacinal (SP S2), soroconversão e aumentos nos títulos de inibição de hemaglutinação para o componente vacinal A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) na população Fiocruz e USP em 2018

		GMT S1 (IC 95%)	GMT S2 (IC 95%)	SP S1 (%)	SP S2 (%)	Soroconversão (%)
População USP	Total (n=77)	42,1 (35,4-50,0)	64,56 (53,2-78,4) ***	75	91	10
	<60 anos (n=70)	41,9 (34,9-50,2)	63,5 (51,6-78,2) **	74	90	9
	>60 anos (n=7)	44,2 (20,7-94,1)	76,1 (39,7-146,2)	86	100	29
	NVA (n=5)	32,5 (15,8-66,8)	98,5 (29,6-327,5)	40	100	40
	VA (n=55)	37,9 (31,1-46,2)	54,9 (44,4-67,9) *	75	87	9
População Fiocruz	Total (n=132)	88,0 (69,1-112,1)	158,5 (129,0-194,8) ***	82	85	17
	<60 anos (n=97)	87,3 (67,4-113,0)	157,9 (126,7-196,7) **	82	91	17
	>60 anos (n=35)	96,9 (48,5-194,1)	166,3 (88,5-312,5)	89	100	11
	NVA (n=46)	65,5 (31,2-137,6)	267,1 (169,3-421,4) **	74	96	57
	VA (n=85)	96,6 (75,6-123,3)	141,8 (113,2-177,7)	85	92	7
População Agrupada	Total (n=209)	65,3 (55,3-77,0)	110,2 (94,2-128,8) ***	79	99	14
	<60 anos (n=167)	64.96 (54,5-77,5)	109.4 (92,6-129,3) ***	79	84	14
	>60 anos (n=42)	68.74 (41,9-112,8)	118.1 (75,2-185,6)	88	100	19
	NVA (n=51)	57.78 (31,2-107,0)	223.5 (146,2-341,6) **	68	93	54
	VA (n=140)	67.55 (56,3-81,0)	98.72 (82,9-117,6) *	81	90	8

*Diferenças significativas entre títulos de inibição de hemaglutinação pré (GMT S1) e pós-vacinais (GMT S2), em testes-t pareados, estão identificadas como * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$, *** para $p < 0,001$.

Ao comparar-se a razão entre títulos pós e pré-vacinais (figura 19), observamos o mesmo padrão detalhado para a população Fiocruz, em que o componente H3 (SI-USP) induziu menores aumentos do que o H1 (MI) e FLUBV (PH) em 2018, com aumentos estatisticamente semelhantes entre a população Fiocruz e USP (Tabela 4 e Figura 16). Ao comparar-se a razão entre títulos pós e pré-vacinais entre os componentes H3 de diferentes anos, observamos que SI (2018) induziu menores aumentos do que SW (2019), mas sem diferenças significativas em relação ao componente SA (2020). Essa diferença foi idêntica comparando-se os dados das coortes Fiocruz e USP.

Razão entre títulos pré e pós-vacinais - USP versus Fiocruz

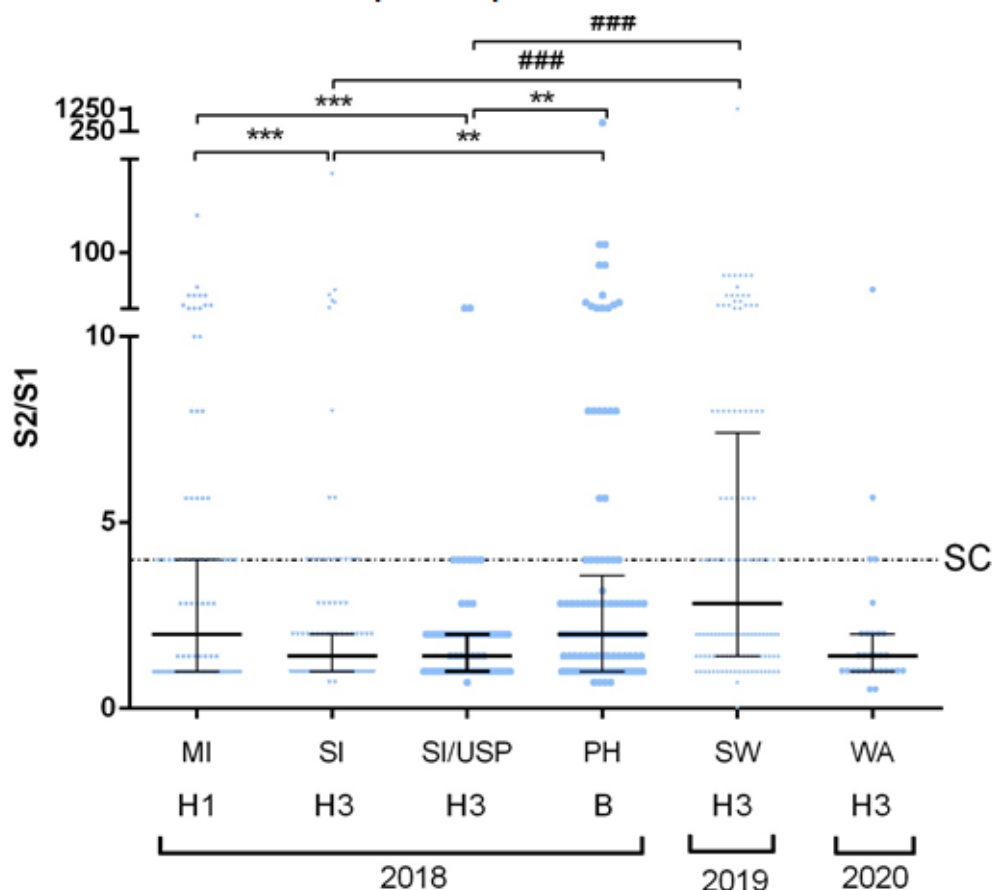


Figura 19: Razão entre títulos pós e pré-vacinais nas populações USP e Fiocruz: observa-se no gráfico a razão entre títulos pós e pré-vacinais para todas as estirpes componentes da vacina em 2018 na população Fiocruz: A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (SI) e B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH), bem como dos componentes vacinais de H3N2 nos anos de 2019 e 2020: A/Switzerland/8060/2017 (SW) e A/SouthAustralia/34/2019 (SA), respectivamente. Observa-se também a razão entre títulos pós e pré-vacinais para o componente SI na população USP. Diferenças significativas entre componentes do mesmo ano, em testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla de Dunn, estão representadas com ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Diferenças entre componentes de anos diferentes estão representadas como ### para $p < 0,001$ em testes-t pareados.

Em ambas as populações não foram detectadas diferenças entre os títulos de GMT S1 ou S2 de idosos versus jovens e de NVA versus VA (Tabela 4). Apesar de maiores taxas de SC nos NVA do que VA, na população USP apenas observou-se aumentos significativos entre S1 e S2 para VA (Tabela 4). O inverso foi observado na idade, com aumentos significativos apenas nos jovens, mas maiores taxas de SC nos idosos (Tabela 4). Ao agrupar as duas populações, observamos novamente aumentos significativos entre GMT S1 e S2 (Tabela 4). Foram observados aumentos significativos entre GMT S1 e S2 para VA, NVA e jovens, mas não idosos, com diferenças significativas entre os títulos de GMT S2 de VA versus NVA (Tabela 4). Na população agrupada os níveis de SP S1 e SC foram semelhantes, mas os de SP S2 ficaram ligeiramente maiores (Tabela 4). Mantiveram-se os padrões com SP S1 de

idosos sendo maior que jovens e de VA maior que NVA (Tabela 4). Em SP S2, os idosos continuaram apresentando valores maiores que jovens, enquanto VA e NVA apresentaram valores semelhantes (Tabela 4). As taxas de SC foram maiores nos NVA que VA mas foram semelhantes entre idosos e jovens (Tabela 4).

5.7 Avaliação de fatores que afetam a resposta à TIV

5.7.1 Comparação das taxas de soroconversão, títulos de anticorpos e razão entre títulos pós e pré-vacinais entre a população soroprottegida previamente à vacina e a população não soroprottegida

Procuramos subdividir a nossa população nas subpopulações de soroprottegidos previamente à vacinação (SPV) e não soroprottegidos previamente à vacinação (NSPV), para cada estirpe em 2018 e 2019 (Tabela 5).

Tabela 5: Número de indivíduos soroprottegidos (SPV) ou não soroprottegidos (NSPV) previamente à vacinação, para cada estirpe em 2018 e 2019

		CA	MI	HK	SI	SW	BR	PH	CO
2018	SPV (N)	98	85	104	93	-	85	76	-
	NSPV (N)	15	28	9	20	-	28	35	-
2019	SPV (N)	110	101	-	102	85	-	79	56
	NSPV (N)	22	31	-	30	47	-	53	76

Em relação à razão entre títulos pós e pré-vacinais, detectamos valores significativamente maiores no grupo de NSPV para as estirpes de influenza B nos dois anos e as duas estirpes de H3N2 em 2018, para as estirpes de H1N1 A/California em 2018 e 2019 e A/Michigan em 2019 (Figura 20).

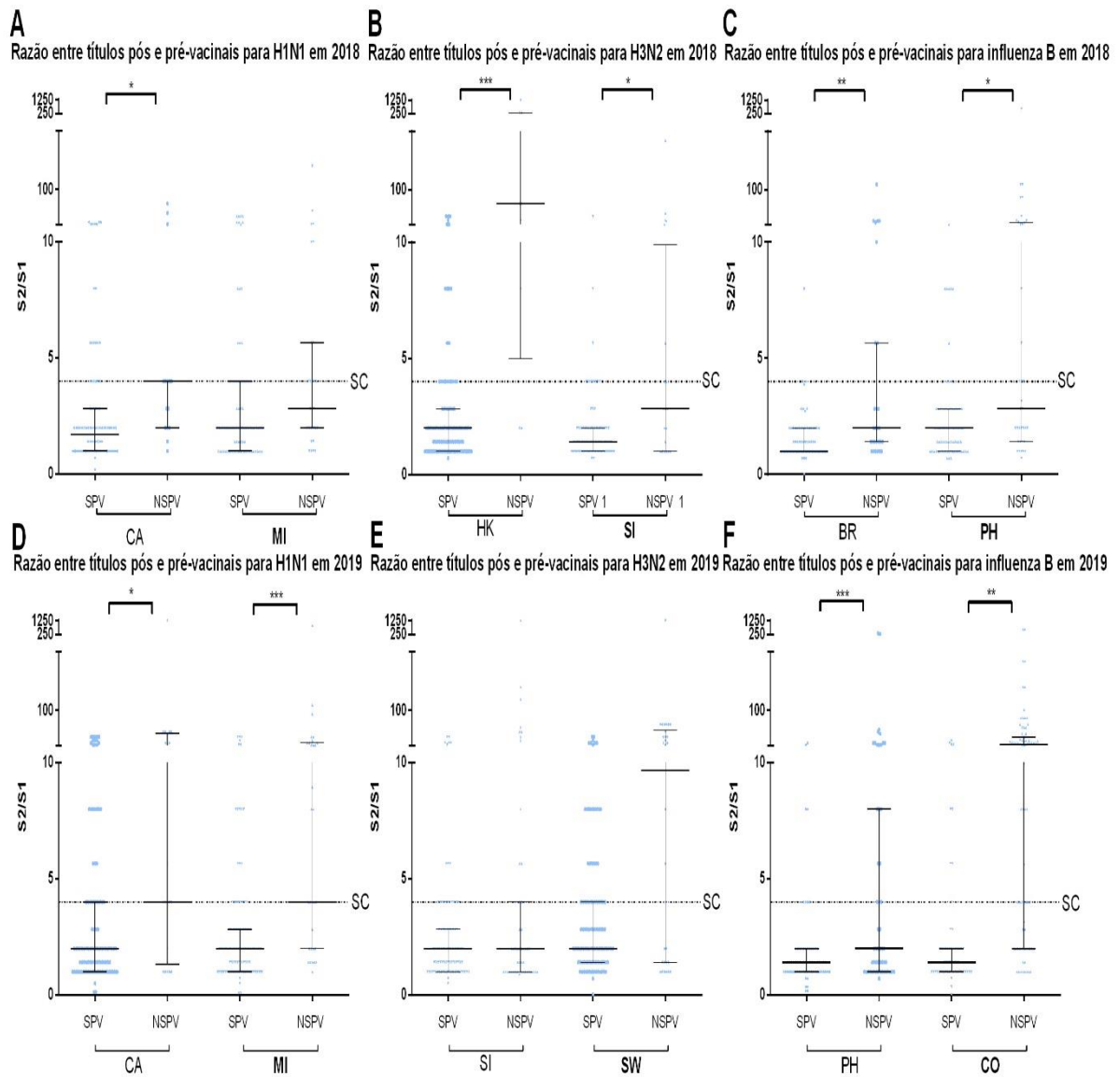
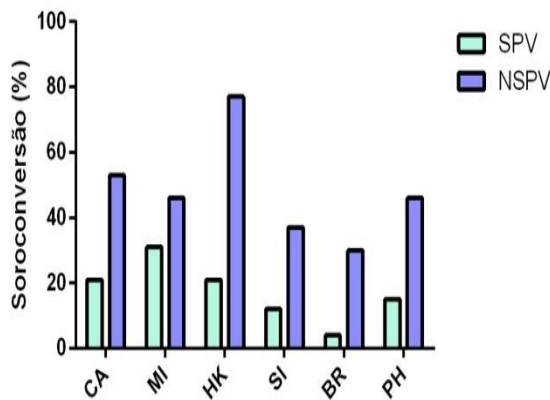


Figura 20: Comparativo entre a razão entre títulos pós e pré-vacinais entre as populações soroprotegidas previamente à vacinação (SPV) e não soroprotegidas previamente à vacinação (NSPV): observa-se nos gráficos, em azul, a razão entre títulos pós e pré-vacinais, definidos como a razão entre os títulos de inibição da hemaglutinação em média geométrica (GMT) pós-vacinais (S2) e pré-vacinais (S1). Em (A) observa-se as estirpes de H1N1 testadas no ano de 2018: A/California/7/2009(H1N1) (CA) e A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI); em (B) as estirpes de H3N2 de 2018: A/Hong Kong/4801/2014(H3N2) (HK) e A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) (SI); em (C) as estirpes de influenza B de 2018: B/Brisbane/ 60/2008 (Victoria) (BR) e B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH); em (D) para as estirpes de H1N1 de 2019: CA e MI; em (E) as estirpes de H3N2 de 2019: SI e A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW); e em (F) as estirpes de influenza B de 2019: PH e B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO). Diferenças significativas entre as populações, em testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla de Dunn, estão representadas como * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. As medianas e os intervalos interquartis estão destacadas pelas linhas pretas e os componentes da vacina de cada ano de estudo em negrito.

Em relação à estirpe A/Michigan em 2018 e as duas estirpes de H3N2 em 2019, não foram observadas diferenças entre os grupos. Observamos que as taxas de soroconversão foram sempre menores no grupo de SPV (variando de 4% a 31%) do que no grupo de NSPV (27% a 77%) (Figura 21).

A - 2018

Soroconversão em Soroprotegidos em S1 (SPV)
vs Não Soroprotegidos em S1 (NSPV)



B - 2019

Soroconversão em Soroprotegidos em S1 (SPV)
vs Não Soroprotegidos em S1 (NSPV)

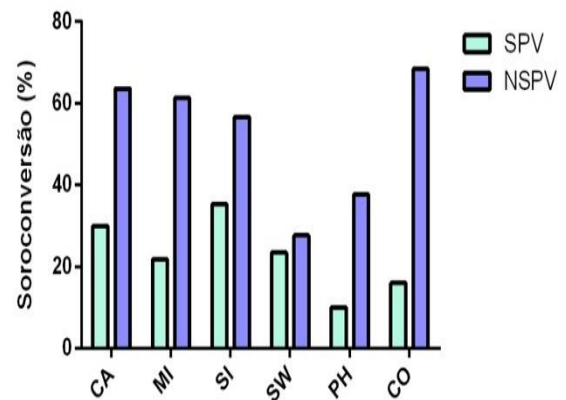


Figura 21: Frequência de soroconversão na população soroprotegida previamente à vacinação (SPV) comparativamente à não soroprotegida previamente à vacinação (NSVP): (A) taxas de soroconversão (aumento de pelo menos 4 vezes entre títulos de inibição de hemaglutinação pré e pós-vacinais) para as estirpes analisadas em 2018: A/California/7/2009(H1N1) (CA), A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), A/Hong Kong/4801/2014 (HK), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (SI), B/Brisbane/60/2008 (Victoria) (BR) e B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH) e (B) para as estirpes analisadas em 2019: CA, MI, SI, A/Switzerland/8060/2017 (SW), PH e B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO).

Em seguida, procuramos realizar as análises de risco relativo (*Odds Ratio*) para as estirpes componentes da vacina de 2019, sendo observadas associações inversas entre a soroconversão e a soroproteção S1 para MI ($p < 0,001$), SW ($p = 0,020$) e CO ($p < 0,001$), no entanto, a soroproteção S1 está associada com a soroproteção S2 para MI ($p = 0,001$), SW ($p < 0,001$) e CO ($p < 0,001$) (Tabela 6).

Tabela 6: Análises de Risco Relativo entre a variável soroproteção S1 (SP S1) e a soroproteção S2 (SP S2) e a soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019

Componente vacinal	Variável (n)	Soroproteção pré-vacinal (S1)		OR(95% IC)
		SPV (%)	NSPV (%)	
A/Michigan/45/2015(H1N1)	SP S1 (101)	-	-	-
	SP S2 (125)	100 (99%)	25 (80,6%)	24,0 (2,76-208,5)*
	SC (42)	22 (21,8%)	20 (60,4%)	0,15 (0,06-0,37)*
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)	SP S1 (102)	-	-	-
	SP S2 (124)	101 (99%)	23 (76,7%)	30,75(3,60-262,62)*
	SC (54)	36 (35,3%)	18 (60%)	0,36(0,16-0,84)*
B/Colorado/06/2017(Victoria)	SP S1 (56)	-	-	-
	SP S2 (111)	55 (98,2%)	56 (73,7%)	19,6(2,54-151,45)*
	SC (61)	9 (16,1%)	52 (68,4%)	0,009 (0,04-0,21)*

* $p < 0,05$ (teste exato de Fischer); SPV (soroprotegidos em S1); NSPV (não soroprotegidos em S1)

5.7.2 Comparação das taxas de soroconversão, soroproteção, títulos de anticorpos e razão entre títulos pós e pré-vacinais entre a população previamente vacinada para influenza e a população vacinada pela primeira vez

Adicionalmente, dividimos a população de estudo em dois grupos: aqueles que já haviam sido vacinados para influenza em anos anteriores (VA – pelo menos duas vacinações consecutivas no ano anterior ao estudo) e aqueles que foram vacinados pela primeira vez no ano do estudo (NVA). A partir do estudo piloto conduzido em 2018, com 13 NVA, conseguimos identificar indícios de resposta aumentada neste grupo e ampliamos então esta subpopulação recrutando, em 2019, 46 voluntários que nunca haviam sido vacinados contra a gripe. Em 2020, o tamanho amostral da população NVA não permitiu realizar esta análise. Comparando-se os títulos de HI de S1 com de S2 entre indivíduos VA ou NVA, foi possível observar que ambos os grupos tiveram aumentos significativos de GMT, com exceção do componente A/Singapura de 2018, em que foi possível observar aumentos de GMT apenas para indivíduos NVA (Figura 22). Foi observado que o grupo NVA apresentou títulos significativamente menores para CO em S1 que o grupo VA em 2019 (Figura 22 C), enquanto em S2 os NVA apresentaram títulos significativamente maiores para MI em ambos os anos e para SW em 2019.

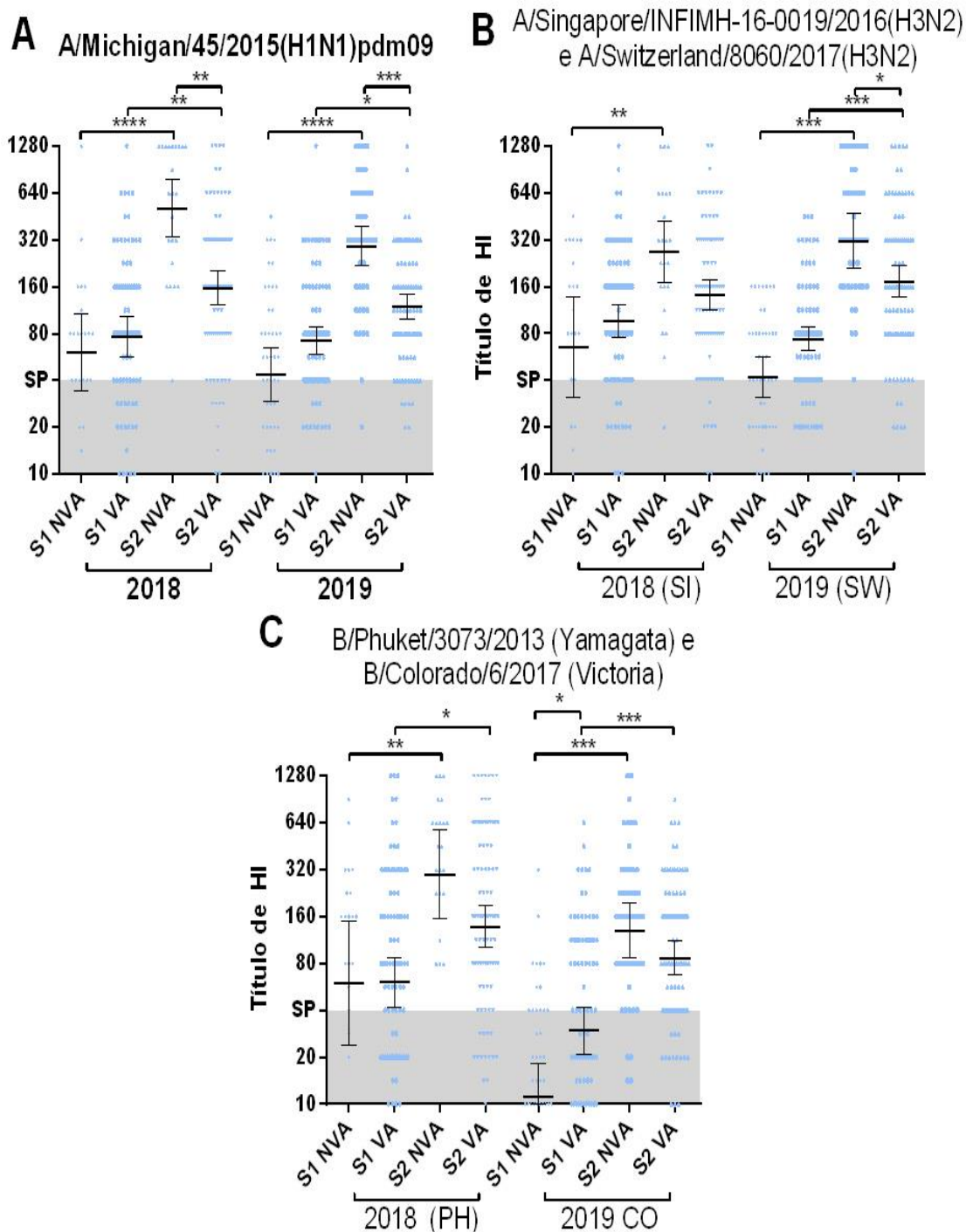


Figura 22: Títulos de inibição da hemaglutinação (HI) para os componentes vacinais de 2018 e 2019 nas populações previamente vacinadas (VA) e vacinadas pela primeira vez (NVA): Nos gráficos pode-se observar os títulos de HI representados em azul, com a média geométrica e os intervalos de confiança 95% destacados pelas linhas pretas. (A) componente vacinal A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), (B) componentes de H3N2: A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2) (SI) e A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW); e (C) componentes de Influenza B: B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH) e B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO). Diferenças significativas detectadas por testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla de Dunn, entre títulos pré-vacinais (S1) e entre pós-vacinais (S2), estão representadas como * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0,001$, com o limiar de soroproteção (SP), igual a 40, destacado em cinza.

Observamos que tanto em 2018 como em 2019 a razão entre títulos pós e pré-vacinais foram significativamente maiores no grupo de NVA, em concordância com as taxas de SC que foram maiores no grupo de NVA (Tabela 7 e Figura 23).

Tabela 7: Porcentagens de soroconversão e de soroproteção pré (S1) e pós-vacinais (S2) para estirpes vacinais de 2018 e 2019 nas populações previamente vacinadas (VA) e vacinadas pela primeira vez (NVA)

Cepas	Soroproteção S1 (%)				Soroproteção S2 (%)				Soroconversão (%)			
	2018		2019		2018		2019		2018		2019	
	NVA	VA	NVA	VA	NVA	VA	NVA	VA	NVA	VA	NVA	VA
A/California/7/2009 (H1N1)	87	87	85	83	100	97	98	94	78	24	65	21
A/Michigan/45/2015 (H1N1)	83	73	61	85	100	90	98	94	65	16	72	13
A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	83	94	-	-	100	99	-	-	61	17	-	-
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	74	85	65	69	96	92	95	80	57	7	57	12
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)	-	-	65	85	-	-	95	93	-	-	70	27
B/Brisbane/60/2008 (Victoria)	61	80	-	-	74	84	-	-	13	9	-	-
B/Phuket/3073/2013 (Yamagata)	74	64	46	67	96	81	87	77	39	21	48	7
B/Colorado/06/2017 (Victoria)	-	-	30	49	-	-	89	81	-	-	76	30

As análises dos índices de SP e SC para os vírus componentes da vacina em cada ano de estudo e os respectivos vírus componentes da vacina em anos anteriores não mostraram nenhum padrão aparente em relação aos índices de SP S2, mas em 2019 os valores de SP S1 foram maiores no grupo de VA, e em 2018 a SP em S1 para MI e PH foi menor nos VA (Tabela 7). Em seguida, procuramos realizar as análises de risco relativo (*Odds Ratio*) para as estirpes componentes na vacina de 2019. Como detalhado na tabela 8, observamos associações positivas entre vacinação prévia (VA) e soroproteção S1 para MI ($p=0,003$), SW ($p=0,008$) e CO ($p=0,045$), mas não para soroproteção S2. Associações inversas entre VA e soroconversão foram observadas para MI ($p<0,001$), SW ($p<0,001$) e CO ($p<0,001$).

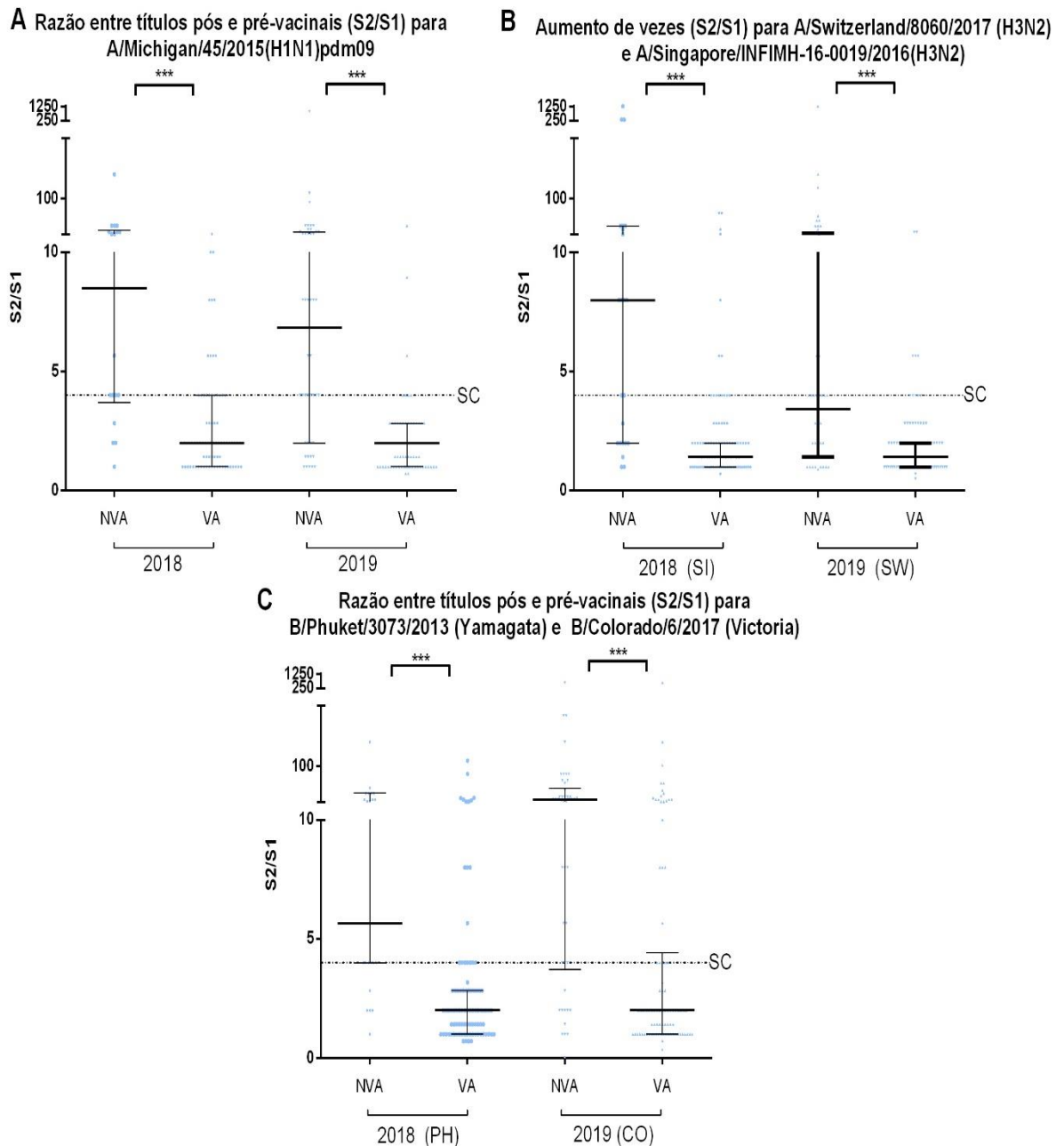


Figura 23: Razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de 2018 e 2019 nas populações previamente vacinadas (VA) e vacinadas pela primeira vez (NVA): Nos gráficos pode-se observar a razão entre títulos pós e pré-vacinais representados em azul, com a mediana e intervalos interquartis destacados pelas linhas pretas. (A) componente vacinal A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), (B) componentes de H3N2: A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2) (SI) e A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW) e (C) componentes de Influenza B: B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH) e B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO). Diferenças significativas detectadas por testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla de Dunn, entre as populações VA e NVA, estão representadas como *** para $p < 0,001$.

Tabela 8: Análises de Risco Relativo entre a variável Vacinação Prévia e a soroproteção S1 (SP S1), S2 (SP S2) e soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019

Componente vacinal	Variável (n)	Vacinação prévia		OR(95% IC)
		VA (%)	NVA (%)	
A/Michigan/45/2015(H1N1)	SP S1 (101)	28 (60,9%)	73 (84,9%)	3,61 (1,57-8,33)*
	SP S2 (125)	49 (97,78%)	80 (93%)	0,29 (0,04-0,54)
	SC (42)	33 (71,7%)	0,29 (0,04-0,54)	0,05 (0,02-0,12)*
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)	SP S1 (102)	29 (63%)	73 (84,7%)	3,29 (1,42-7,72)*
	SP S2 (124)	44 (95,7%)	80 (93%)	0,61 (0,12-3,13)
	SC (54)	31 (67,4%)	23 (26,7%)	0,18(0,08-0,39)*
B/Colorado/06/2017(Victoria)	SP S1 (56)	14 (30,4%)	42 (48,8%)	2,18 (1,02-4,65)*
	SP S2 (111)	41 (89,1%)	70 (81,4%)	0,54 (0,18-1,56)
	SC (61)	35 (76,1%)	0,52 (0,18-1,56%)	0,14 (0,06-0,31)*

* p<0,05 (teste exato de Fischer); VA (previamente vacinados); NVA (vacinados pela primeira vez)

5.7.3 Comparação das taxas de soroconversão, títulos de anticorpos e razão entre títulos pós e pré-vacinais entre a população eutrófica e obesa

Novamente, em nosso estudo piloto em 2018, conseguimos observar indícios de uma menor resposta à vacinação na população de obesos, mas em 2018 esta população consistiu apenas de seis voluntários auto-reportados, sem registros de peso e altura. Esta população também é considerada de risco para influenza, com relatos de resposta vacinal reduzida na literatura. Em 2019 foram recrutados 22 indivíduos obesos (IMC >30), comparando-se então a população eutrófica (IE) com a obesa (OB). Não foram encontradas diferenças entre as populações em relação ao GMT S1 ou S2 (Figura 24). Ao avaliar-se os aumentos entre títulos de S1 e S2 observamos que a população IE apresentou aumentos significativos entre S1 e S2 para todas as estirpes, enquanto a população OB apresentou aumentos para MI e SW, mas não para CO (Figura 24).

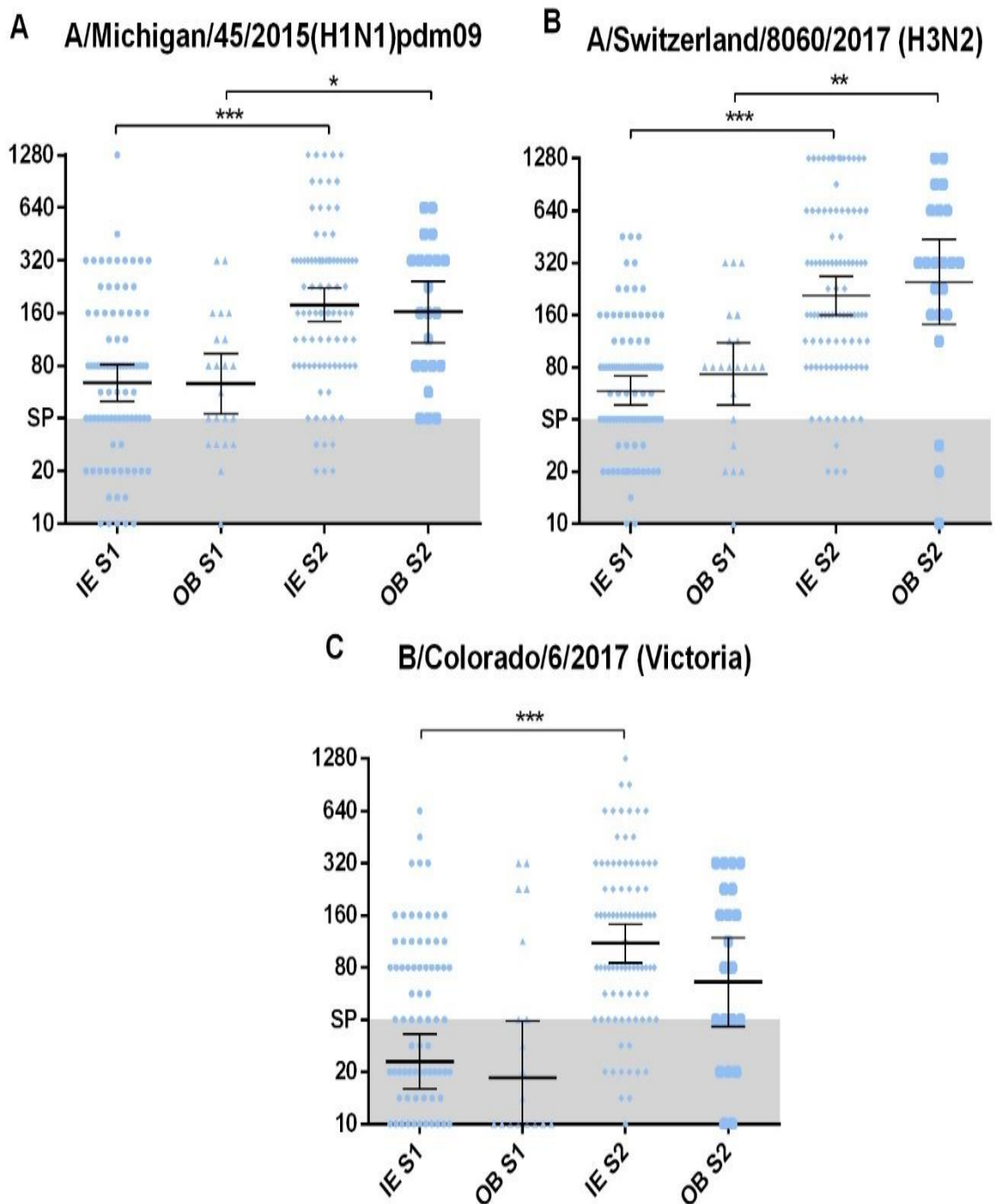


Figura 24: Títulos de Inibição da Hemaglutinação para as estirpes componentes da vacina em 2019 nas populações eutróficas (IE) e obesas (OB): Nos gráficos pode-se observar os títulos de inibição da hemaglutinação (HI) representados em azul, com a média geométrica e os intervalos de confiança 95% destacados pelas linhas pretas. Em (A) observa-se o componente vacinal A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), em (B) o A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW), em (C) o B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO). Diferenças significativas detectadas por testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla de Dunn, entre títulos pré-vacinais (S1) e entre pós-vacinais (S2), estão representadas como * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$, com o limiar de soroproteção (SP), igual a 40, destacado em cinza.

Não observamos diferenças entre a razão entre títulos pós e pré-vacinais (Figura 25) e os índices de SP foram semelhantes, sem um padrão definitivo, mas as

taxas de SC foram menores no grupo OB para todas as estirpes exceto SW (Tabela 9). No entanto, não foram observadas associações significativas nas análises de Risco Relativo (Tabela 10)

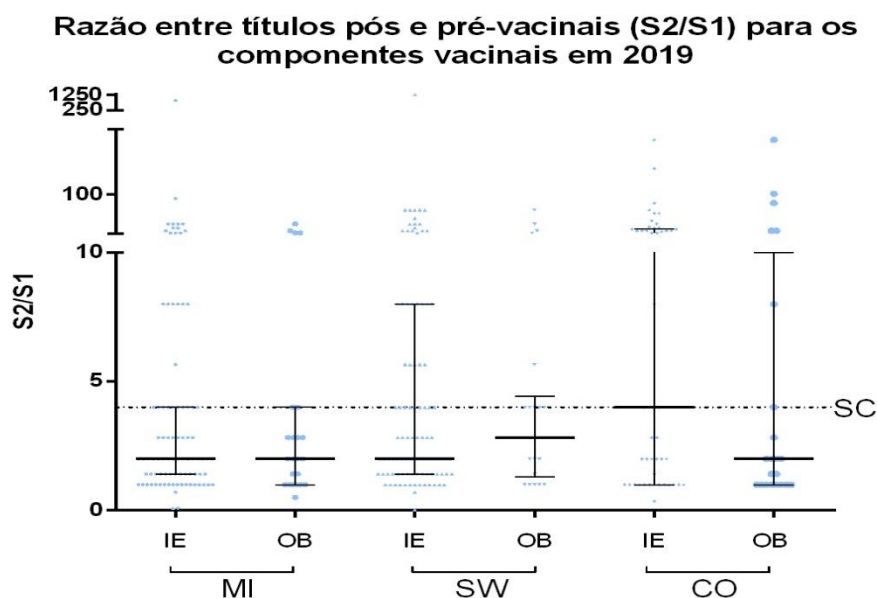


Figura 25: Razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de 2019 na população obesa (OB) e eutrófica (IE): Nos gráficos pode-se observar a razão entre títulos pós e pré-vacinais representados em azul, com a mediana e intervalos interquartis destacados pelas linhas pretas, para as estirpes A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW) e B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO). Não foram detectadas diferenças significativas por testes-t.

Tabela 9: Porcentagens de soroconversão e de soroproteção pré (S1) e pós-vacinais (S2) para estirpes vacinais de 2019 nas populações eutróficas (IE) e obesas (OB)

Cepas	Soroproteção S1 (%)		Soroproteção S2 (%)		Soroconversão (%)	
	IE	OB	IE	OB	IE	OB
A/California/7/2009 (H1N1)	80	95	93	100	40	27
A/Michigan/45/2015 (H1N1)	76	73	93	100	34	27
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	66	55	85	77	27	18
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)	77	77	95	86	40	45
B/Phuket/3073/2013 (Yamagata)	63	45	80	77	25	9
B/Colorado/06/2017 (Victoria)	45	32	86	73	50	32

Tabela 10: Análises de Risco Relativo entre a variável Obesidade e a soroproteção S1 (SP S1), S2 (SP S2) e soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019

Componente vacinal	Variável (n)	Obesidade		OR(95% IC)
		IE (%)	OB (%)	
A/Michigan/45/2015(H1N1)	SP S1 (101)	77 (77%)	16 (72,7%)	0,79(0,28-2,27)
	SP S2 (125)	93 (93%)	22 (100%)	1,24(1,13-1,35)
	SC (42)	35 (35%)	6 (27,3%)	0,69(0,25-1,94)
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)	SP S1 (102)	77 (77%)	17 (77,3%)	1,02 (0,34-3,05)
	SP S2 (124)	95 (95%)	19 (86,4%)	0,33 (0,07-1,52)
	SC (54)	40 (40%)	10 (45,5%)	1,25 (0,49-3,17)
B/Colorado/06/2017(Victoria)	SP S1 (56)	45 (45%)	7 (31,8%)	0,57 (0,21-1,51)
	SP S2 (111)	87 (87%)	16 (72,7%)	0,39 (0,13-1,20)
	SC (61)	49 (49%)	7 (31,8%)	0,49 (0,18-1,29)

* p<0,05 (teste exato de Fischer); OB (obesos); IE (eutróficos)

5.7.4 Comparação das taxas de soroconversão, títulos de anticorpos e razão entre títulos pós e pré-vacinais entre a população idosa e a população jovem

Idade avançada é uma variável muito estudada na resposta imune, inclusive no que se refere à resposta aos vírus e à vacina de influenza, estando associada à maior susceptibilidade à doença e menor resposta vacinal. Procuramos então comparar as populações de jovens (<60 anos) com idosos (>60 anos). No nosso estudo piloto em 2018 foram recrutados 9 idosos e, com base na aparente resposta reduzida nesta subpopulação, procuramos expandir este grupo em 2019, recrutando-se 35 voluntários. Em 2020 não foi possível realizar esta análise devido ao tamanho amostral do grupo de idosos. A vacina foi capaz de induzir aumentos significativos para todas as estirpes vacinais, em 2018 e 2019, no grupo de jovens, enquanto os idosos apenas apresentaram aumentos significativos em 2019 (Figura 26).

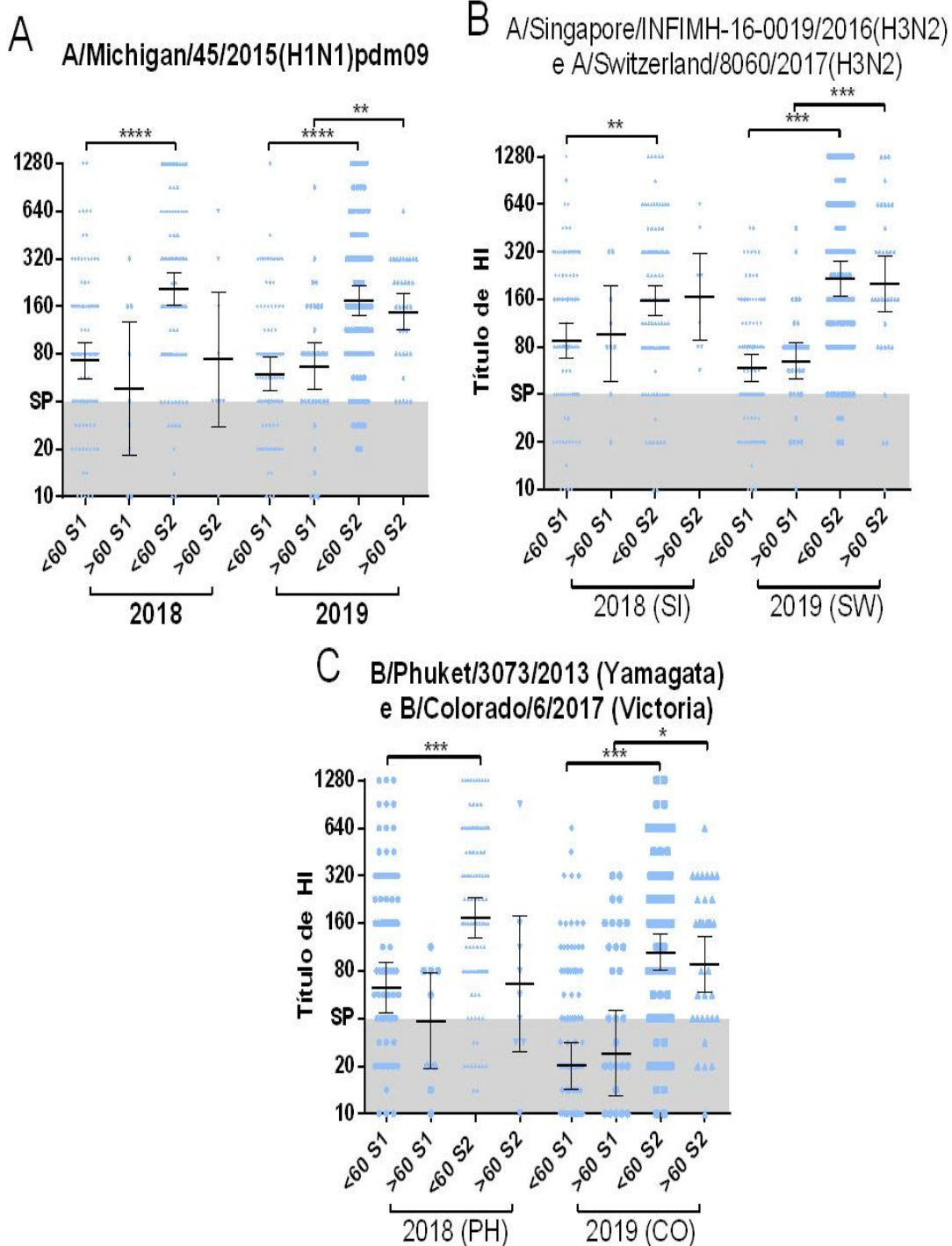
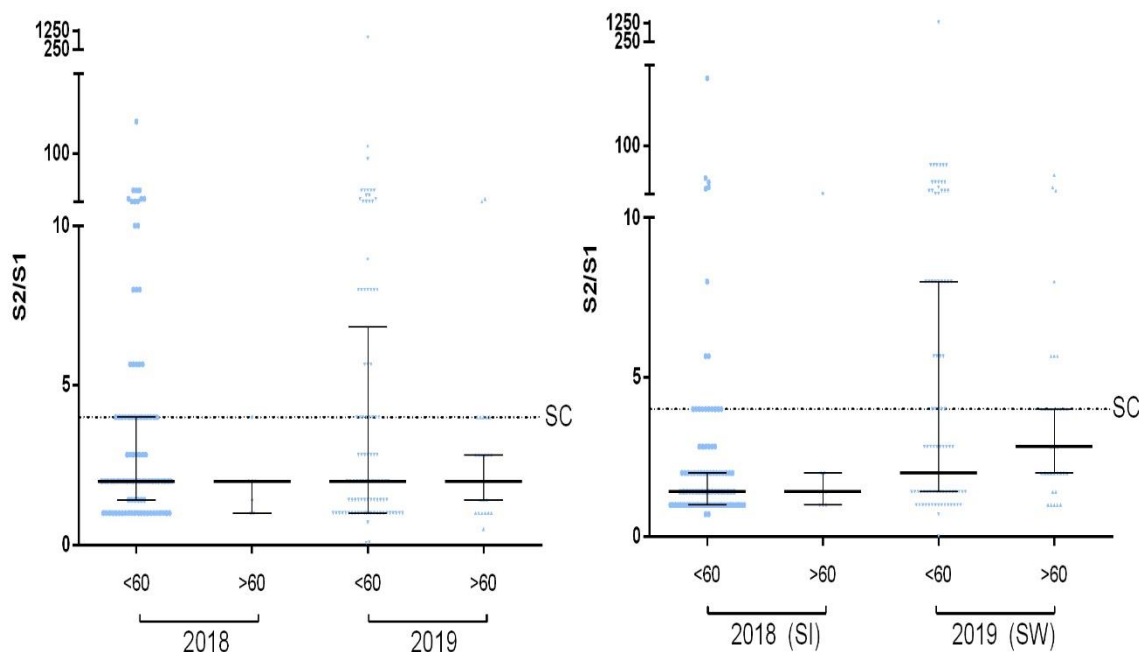


Figura 26: Títulos de Inibição da Hemaglutinação para os componentes vacinais de 2018 e 2019 nas populações jovens (<60 anos) e idosas (>60 anos): Nos gráficos pode-se observar os títulos de inibição da hemaglutinação (HI) representados em azul, com a média geométrica e os intervalos de confiança 95% destacados pelas linhas pretas. Em (A) observa-se o componente vacinal A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), em (B) o A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2) (SI) e o A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW) e em (C) o B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH) e o B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO). Diferenças significativas detectadas por testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla de Dunn, entre títulos pré-vacinais (S1) e entre pós-vacinais (S2), estão representadas como * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$, com o limiar de soroproteção (SP), igual a 40, destacado em cinza.

Não foram observadas diferenças significativas entre a razão entre títulos pós e pré-vacinais dos dois grupos (Figura 27), mas as taxas de SC foram sempre maiores no grupo de jovens, com a exceção do SW em 2019 (Tabela 11).

A Razão entre títulos pós e pré-vacinais (S2/S1) para H1N1 **B** Razão entre títulos pós e pré-vacinais (S2/S1) para H3N2



C Razão entre títulos pós e pré-vacinais (S2/S1) para Influenza B

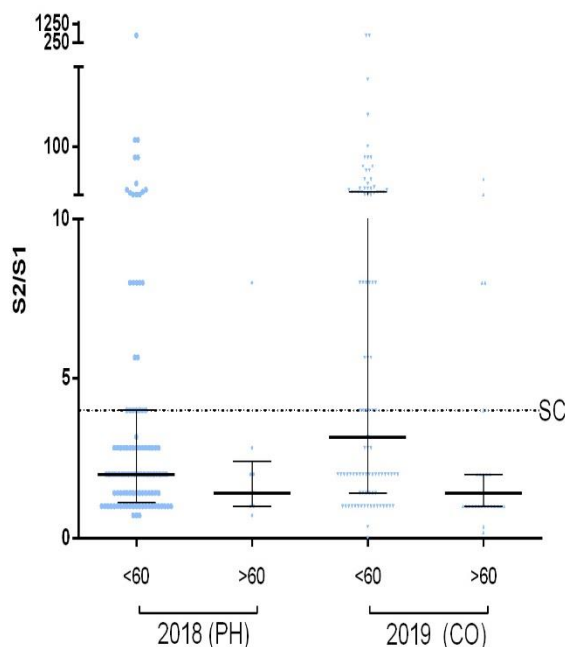


Figura 27: Razão entre títulos pós e pré-vacinais para os componentes vacinais de 2018 e 2019 na população jovem (<60 anos) e idosa (>60 anos): Nos gráficos pode-se observar a razão entre títulos pós e pré-vacinais representados em azul, com a mediana e intervalos interquartis destacados pelas linhas pretas. Em (A) observa-se o componente A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), em (B) os componentes de H3N2: A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2) (SI) e A/Switzerland/8060/2017

(H3N2) (SW); e em (C) as estirpes de influenza B: B/Phuket/3073/2013(Yamagata) (PH) e B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO). Não foram detectadas diferenças significativas por testes-t.

Tabela 11: Porcentagens de soroconversão e de soroproteção pré (S1) e pós-vacinais (S2) para estirpes vacinais de 2018 e 2019 nas populações jovens (<60 anos) e idosas (>60 anos)

Cepas	Soroproteção S1 (%)				Soroproteção S2 (%)				Soroconversão (%)			
	2018		2019		2018		2019		2018		2019	
	<60	≥60	<60	≥60	<60	≥60	<60	≥60	<60	≥60	<60	≥60
A/California/7/2009 (H1N1)	88	78	81	89	97	100	95	97	27	0	41	23
A/Michigan/45/2015 (H1N1)	77	55	75	80	92	88	94	97	37	11	36	20
A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	93	78	-	-	99	100	-	-	27	11	-	-
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	82	89	67	57	91	100	86	74	17	11	30	11
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)	-	-	75	83	-	-	95	91	-	-	39	46
B/Brisbane/60/2008 (Victoria)	75	78	-	-	84	78	-	-	11	0	-	-
B/Phuket/3073/2013 (Yamagata)	68	56	62	54	87	67	82	74	26	11	24	14
B/Colorado/06/2017 (Victoria)	-	-	41	46	-	-	85	83	-	-	49	37

Em relação aos índices de SP, não foi observado nenhum padrão claro, apesar dos valores geralmente maiores nos jovens. Procuramos ainda dividir a população de idosos em >60 (n=21) e >70 (n=14) anos em 2019, observando-se uma resposta ainda mais reduzida na população de maior de 70 anos (Figura 28). A população de >70 anos apresentou aumentos significativos apenas para SW.

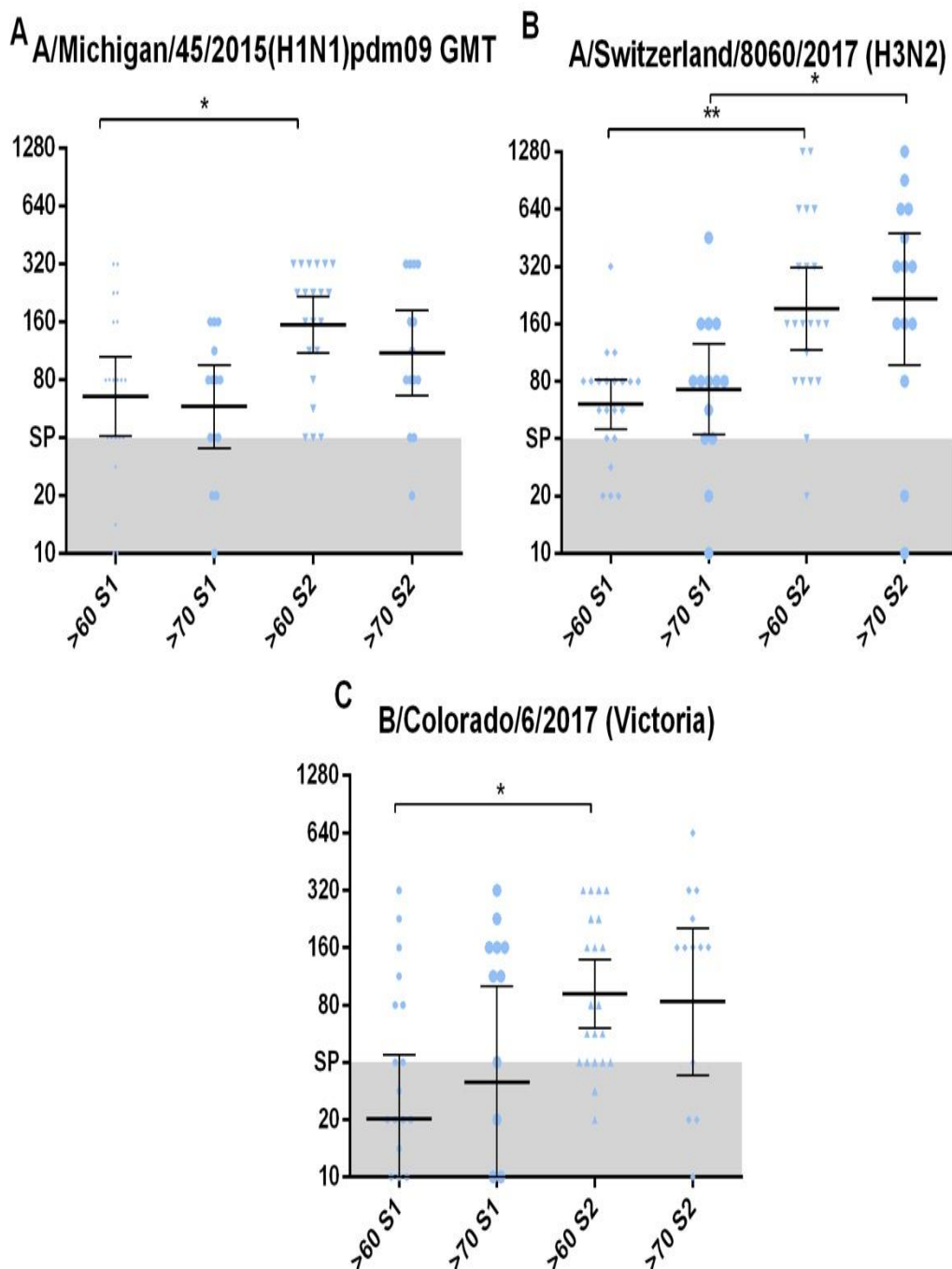


Figura 28: Títulos de inibição da hemaglutinação (HI) para os componentes vacinais de 2019 nas populações com 60 a 69 anos (>60) ou mais de 70 anos de idade (>70): Nos gráficos pode-se observar os títulos de (HI) representados em azul, com a média geométrica e os intervalos de confiança 95% destacados pelas linhas pretas. (A) componente vacinal A/Michigan/45/2015(H1N1) (MI), (B) o A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (SW) e e (C) o B/Colorado/06/2017(Victoria) (CO). Diferenças significativas detectadas por testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla de Dunn, entre títulos pré-vacinais (S1) e entre pós-vacinais (S2), estão representadas como * para $p < 0.05$ e ** para $p < 0.01$, com o limiar de soroproteção (SP), igual a 40, destacado em cinza.

Em seguida, procuramos realizar as análises de risco relativo (*Odds Ratio*) para as estirpes componentes na vacina de 2019, mas não observamos associações significativas para a variável idade (Tabela 12).

Tabela 12: Análises de Risco Relativo entre a variável Idade e a soroproteção S1 (SP S1), S2 (SP S2) e soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019

Componente vacinal	Variável (n)	Idade		OR(95% IC)
		<60 n(%)	>60 n(%)	
A/Michigan/45/2015(H1N1)	SP S1 (101)	73(72,3%)	28(27,7%)	1,53(0,57-4,15)
	SP S2 (125)	91(73,4%)	33(26,6%)	2,18(0,25-18,76)
	SC (42)	35(85,4%)	6(14,6%)	0,38(0,14-1,01)
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)	SP S1 (102)	73(71,6%)	29(28,4%)	1,91(0,66-5,48)
	SP S2 (124)	92(74,8%)	31(25,2%)	0,56(0,13-2,49)
	SC (54)	38(71,7%)	15(28,3%)	1,23(0,56-2,70)
B/Colorado/06/2017(Victoria)	SP S1 (56)	40(71,4%)	16(28,6%)	1,27(0,58-2,78)
	SP S2 (111)	82(74,5%)	28(25,5%)	0,85(0,30-2,41)
	SC (61)	48(80%)	12(20%)	0,56(0,25-1,25)

5.7.5 Comorbidades

Visando avaliar o efeito de diferentes variáveis – vacinação prévia, obesidade, idade, comorbidade, sexo e gripe recente – nas taxas de soroproteção e soroconversão, foram realizadas análises de risco relativo (*Odds Ratio*) para as estirpes componentes na vacina de 2019, anteriormente detalhadas. Apesar de análises anteriores não demonstrarem indícios de respostas reduzidas para as diversas comorbidades avaliadas (considerando o baixo tamanho amostral, dados não mostrados), procuramos também avaliar a presença de associações entre a presença de qualquer comorbidade, sendo esta variável associada inversamente à soroconversão para o vírus MI ($p=0,007$) e o sexo feminino foi associado com a soroproteção S1 ($p=0,021$) e S2 ($p=0,044$) para SW (Tabela 13). Não houve associação entre relatos de gripe recente e as taxas de SP S1, S2 e SC.

Tabela 13: Análises de Risco Relativo entre as variáveis Comorbidade, Sexo e Gripe Recente e as variáveis soroproteção S1 (SP S1), S2 (SP S2) e soroconversão (SC), para os componentes vacinais de 2019

Variável	Categoria	A/Michigan/45/2015(H1N1)			A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)			B/Colorado/06/2017(Victoria)		
		SP S1 (n=101)	SP S2 (n=125)	SC (n=42)	SP S1 (n=102)	SP Sw (n=124)	SC (n=52)	SP S1 (n=56)	SP S2 (n=111)	SC (n=61)
Comorbidade	N	54(74%)	67(91,8%)	31(42,5%)	54(74%)	71(97,3%)	33(45,2%)	31(42,5%)	63(86,3%)	36(49,3%)
	S	41(78,8%)	51(98,1%)	10(19,2%)	43(82,7%)	47(90,4%)	22(38,5%)	20(38,5%)	41(78,8%)	23(44,2%)
	OR (95%)	1,31(0,56-3,06)	4,57(0,53-39,13)	0,32(0,14-0,74)*	1,69(0,69-4,09)	0,27(0,05-1,42)	0,76(0,37-1,56)	0,84(0,41-1,75)	0,59(0,23-1,52)	0,82(0,39-1,67)
Sexo	M	29(76,3%)	36(94,7%)	13(34,2%)	24(63,2%)	33(86,8%)	15(39,5%)	15(39,5%)	33(86,8%)	19(50%)
	F	72(76,6%)	89(94,7%)	29(30,9%)	78(83%)	91(96,8%)	39(41,5%)	41(43,6%)	78(83%)	42(44,7%)
	OR (95%)	1,02(0,42-2,47)	0,99(0,18-5,33)	0,86(0,39-1,91)	2,84(1,22-6,66)*	4,59(1,04-20,31)*	1,09(0,50-2,35)	1,18(0,55-2,55)	0,74(0,25-2,18)	0,81(0,38-1,72)
Gripe Recente	N	82(75,9%)	102(94,4%)	37(34,3%)	82(75,9%)	101(93,5%)	44(40,7%)	45(41,7%)	92(85,2%)	52(48,1%)
	S	11(73,3%)	14(93,3%)	3(20%)	13(86,7%)	15(100%)	8(53,3%)	5(33,3%)	10(66,7%)	7(46,7%)
	OR (95%)	0,87(0,26-2,97)	0,82(0,09-7,35)	0,48(0,13-1,81)	2,06(0,44-9,34)	1,15(1,07-1,23)	1,66(0,56-4,92)	0,7(0,22-2,18)	0,35(1,05-1,15)	0,94(0,32-2,78)

* p<0,05 (teste exato de Fischer)

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, procuramos avaliar a resposta à TIV anti-influenza nas temporadas de 2018, 2019 e 2020, estudando o impacto de variáveis como idade, imunidade e obesidade na resposta vacinal. Visamos também avaliar a resposta induzida pela vacina em relação a estirpes componentes da vacina em anos anteriores e estirpes circulantes representativas.

Comparando-se com a literatura, os valores de SP S1 observados na nossa população de estudo foram altos, com a exceção de B/Colorado em 2019, seja para estirpes componentes da vacina em cada ano de estudo seja para as respectivas estirpes componentes da vacina em anos anteriores. Isto pode ser consequência do perfil etário da nossa população de estudo, jovem, com altas porcentagens de indivíduos previamente vacinados e que incluía profissionais da área da saúde. No entanto, é difícil realizar comparações com a literatura visto que a resposta vacinal não varia apenas com as características da população de estudo (e suas subpopulações), mas também varia de ano para ano, estirpe para estirpe e até entre diferentes regiões geográficas.

Apesar dos elevados níveis de SP em S1, a vacina foi capaz de induzir aumentos nos índices de SP em S2, alcançando porcentagens elevadas, de acima de 90% para a maioria das estirpes testadas. Os níveis elevados de SP S1 podem também explicar os elevados níveis de SP S2, como visto estatisticamente. Na literatura são descritos níveis de SP S1 variando de 11% a 84% (H1N1), de 9% a 100% (H3N2) e de 6% a 100% (FLUBV), de SP S2 variando de 39% a 100% (H1N1), de 52% a 100% (H3N2) e de 33 a 100% (H3N2), com taxas de SC variando de 15% a 85% (H1N1), de 28% a 78% (H3N2) e de 9% a 69% (FLUBV), demonstrando a grande variabilidade na resposta, dependendo da composição vacinal e da população estudada, evidenciando a necessidade de avaliação contínua da resposta vacinal. (142,175–182). Os valores que observamos estavam dentro de parâmetros já descritos. É interessante notar que CO, estirpe com dupla deleção na HA que a distancia antigenicamente das estirpes BR-*like* previamente em circulação, foi a única estirpe com GMT S1 abaixo do limiar de SP (145).

Em contrapartida, as taxas de SC observadas foram baixas. Estes valores baixos estão correlacionados aos altos índices de SP S1, como indicado pela comparação entre as populações de SPV e NSPV, e esse fato pode ser explicado

pela resposta reduzida presente em determinadas subpopulações, como os previamente vacinados.

Respostas cruzadas entre os componentes vacinais de cada ano de estudo e os respectivos componentes da vacina em anos anteriores também foram observadas, seja de influenza A ou B, sendo este efeito especialmente visível entre os H1N1 em 2018 e 2019, sendo que o MI foi a estirpe vacinal analisada com maior permanência ao longo dos anos. Este tipo de resposta cruzada já é detalhado na literatura, mas sem um histórico completo de infecções e vacinações de cada voluntário, não é possível determinar se este fenômeno se deve à estimulação de anticorpos neutralizantes de espectro mais amplo a cada ano, capazes de se ligar à HA de diferentes estirpes, ou se é devido a reações de *backboosting* em relação a estirpes previamente encontradas via infecção ou vacinação (183).

Ao avaliarmos a capacidade dos anticorpos induzidos pela vacina de se ligarem à HA de estirpes circulantes representativas, foi possível observar aumentos significativos para todas as estirpes e, apesar dos níveis de SP S1 relativamente baixos, os níveis de SP S2 foram elevados, com metade das estirpes analisadas atingindo níveis de 90%. Apesar das taxas de SC baixas, semelhantes às estirpes vacinais, estes resultados indicam que a TIV é capaz de induzir proteção contra estirpes circulantes, inclusive entre estirpes que pertencem a diferentes clados, distintos das estirpes vacinais, e até entre diferentes linhagens de influenza B. Estas evidências sugerem que até em caso de não concordância entre as estirpes circulantes e as estirpes contidas na vacina, a vacinação pode oferecer uma proteção significativa.

As campanhas de vacinação pela TIV possuem o objetivo de proteger a população durante a temporada de circulação anual dos FLUV. O nosso estudo observou que, apesar da diminuição significativa nos títulos de anticorpos, os índices de SP permaneceram altos após seis meses, conforme observado em 2018. Em conjunto com a cinética dos títulos de HI observada nos voluntários seguidos no estudo, os nossos dados parecem confirmar que a proteção perdura pela temporada de influenza, mas reforçam a necessidade da vacinação anual, não só pela atualização da vacina como pelo decaimento nos títulos de anticorpos.

A literatura aponta o histórico de vacinação de cada voluntário como uma variável importante na modulação da resposta vacinal, mas este tema ainda é controverso, bem como as suas possíveis explicações (77,172,173). A literatura frequentemente aponta a Teoria do pecado antigênico original (OAS), como uma

possível explicação para a resposta reduzida na população de previamente vacinados, em que a competição entre linfócitos B de memória e *naïve* pelas mesma células apresentadoras de antígenos, resultaria em fenômenos de *backboosting* de estirpes anteriores, para as quais existem linfócitos de memória capazes de reconhecer antígenos da nova estirpe, e na inibição da resposta *de novo* (79,184,185). Este fenômeno poderia então apresentar tanto um efeito benéfico, quando os anticorpos que sofrem o processo de *backboosting* são capazes de neutralizar a nova estirpe, ou pode então deixar o indivíduo mais susceptível, quando os anticorpos produzidos não são neutralizantes e a resposta *de novo* encontra-se inibida (79,184,185). Indícios deste efeito de *imprinting* já foram detalhados, sendo observadas respostas maiores para as estirpes de cada subtipo com as quais o indivíduo foi primeiramente exposto na sua vida, ou seja, com maior *backboosting* de anticorpos quanto mais antiga for a estirpe analisada (mais antiga no histórico de infecção individual) por estimulação dos linfócitos de memória a cada nova exposição (79,184,185).

Relatos na literatura sobre estes fenômenos ainda são controversos e os seus mecanismos ainda não estão completamente elucidados, mas é implícito que o histórico vacinal e de infecção, incluindo a diversidade e sequência das estirpes a que o indivíduo foi exposto ao longo da vida, modulam a sua resposta imune a novas exposições, não existindo uma correlação direta e simples entre número de vacinações e resposta vacinal (150).

No nosso estudo observamos uma resposta reduzida na população VA ao analisar as taxas de SC e a razão entre títulos pós e pré-vacinais, além da resposta reduzida na população SPV, sendo que uma resposta reduzida no grupo VA já é reportada na literatura, mas variando de estirpe para estirpe e dependendo dos histórico de exposições da população estudada (150). Apesar das análises multivariadas demonstrarem que a vacinação prévia estava positivamente associada com a SP S1 mas inversamente associada à SC, não foi detectada influência desta variável na SP S2. Também é interessante notar que a resposta à estirpe SI (H3N2) em 2018 foi menor que à estirpe HK, sendo que SI era o componente vacinal atual. Já no ano seguinte, o SI não era componente vacinal mas induziu uma resposta maior do que em 2018.

Para todos os subtipos detectamos também respostas cruzadas para componentes de anos anteriores, inclusive com respostas muito semelhantes entre os H1N1 em 2018 e 2019. Uma correlação negativa entre títulos de HAI pré-vacinais

e taxas de soroconversão também já foi reportada na literatura (141). Estes dados em conjunto parecem apontar para a OAS como uma possível explicação, mas também existe a possibilidade desta resposta reduzida ser devido à presença de altos níveis pré-vacinais de anticorpos capazes de neutralizar o novo antígeno e impedindo a formação de nova resposta e, conseqüentemente, amplificação da memória. Sem um histórico completo de vacinação e infecção de cada voluntário não foi possível averiguar de forma definitiva os mecanismos responsáveis por esta resposta reduzida, mas, devido ao caráter anual das campanhas de vacinação para influenza, esta variável necessita ser avaliada para que as estratégias mais eficazes possam ser utilizadas. De qualquer modo, a vacinação anual segue sendo importante e recomendada, tendo como argumento as altas taxas de SP observadas no grupo de VA.

A influência da idade na resposta imune em geral é bem documentada, apesar de nem todos detalhes serem conhecidos, com a maior parte dos óbitos por gripe ocorrendo nesta população (186,187). A idade é também considerada um fator de risco para o desenvolvimento de formas graves de gripe e uma resposta inibida nesta população em relação à TIV também é relatada na literatura (186). Os processos envolvidos no declínio da resposta imune, tanto humoral como celular, com o progredir da idade são geralmente denominados de imunosenescência (186,187). Esta disfunção do sistema imune também está associada a um estado inflamatório crônico em indivíduos idosos denominado *inflammaging*, causando dano tecidual e interferindo nas vias de sinalização das células imunes (187,188). Vários aspectos da resposta celular são afetados, desde as funções de células do sistema imune inato como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, na apresentação de antígenos, produção de citocinas, atividade de células NK, dentre outras (187,188). Os linfócitos T também se encontram muito alterados nas populações idosas. Isto se deve principalmente à involução tímica que ocorre nestes indivíduos, resultando em um aumento da proporção de linfócitos T CD8 de memória em relação aos *naive* e a uma perda da molécula coestimulatória CD28, encurtamento de telômeros e resistência aos mecanismos regulatórios de apoptose (189,190). Uma diminuição da população de células T CD4 *helper* foliculares, importantes reguladoras da resposta humoral, também já foi reportada na população idosa, e disfunções nestas células podem também estar associadas à indução de um estado pró-inflamatório e a uma redução na resposta por linfócitos B e, conseqüentemente, na produção de anticorpos (189,191). Existem também evidências de que esta inflamação crônica (*inflammaging*)

diminua a capacidade de linfócitos B de responder a estímulos antigênicos, induzindo aumento de perfis pró-inflamatórios e diminuição nos fenótipos anti-inflamatórios, com exaustão das células B, podendo existir uma correlação com os processos inflamatórios do tecido adiposo, detalhados abaixo, que tendem a aumentar com o progredir da idade (192). Além disso existem relatos de menor diversidade de linfócitos B *naive*, menor mudança de classe em linfócitos B de memória e aumento de linfócitos B com perfil de exaustão (191).

Quanto maior a idade maior a probabilidade de um histórico de infecção mais diverso, com mais exposições ao longo da vida, bem como maiores as chances de esta população pertencer ao grupo de VA (193). Todas estas variáveis influenciam-se entre si. Um exemplo clássico pode ser observado a partir da pandemia de H1N1 em 2009, em que indivíduos nascidos em torno da década de 1970 demonstraram-se mais protegidos para a estirpe pandêmica em 2009 mas ficaram mais susceptíveis para a estirpe sazonal da temporada de 2013/2014, quando os H1N1 adquiriram uma mutação em um epítipo da HA previamente conservado (185). Por outro lado, indivíduos idosos, não expostos à estirpe de H1N1 na infância, apresentaram-se vulneráveis à estirpe pandêmica mas não à estirpe de 2013/2014 (185). Isolar quais variáveis modulam a resposta vacinal e como elas interagem entre si é uma tarefa complexa, dificultando a avaliação das vacinas e o desenvolvimento de estratégias mais eficazes, considerando a heterogeneidade da população vacinada.

As nossas análises iniciais apontaram uma possível resposta reduzida na população idosa, ao avaliarmos os aumentos de GMT e GMT S2, porém análises multivariadas não encontraram associações entre esta variável e a SP ou SC, provavelmente devido ao número amostral reduzido dessa população. Em concordância com o que pode ser visto na literatura, observamos que este efeito da idade pode ser cumulativo, como observado na população de >70 anos (194). No entanto, existem relatos de que a resposta neste grupo não seja bem representada por títulos de HI, sendo sim melhor correlacionada com uma resposta celular, principalmente por linfócitos T, já que anticorpos circulantes podem não ser o suficiente para controlar a infecção se a resposta celular não for eficaz (190).

Alguns estudos apontam que, especificamente, a resposta por linfócitos T CD4 e CD8 a proteínas virais internas (M1 e NP) se correlacione com o desfecho clínico a uma exposição pelo FLUV (189,190,195,196). É sugerido na literatura que vacinas contendo antígenos mais conservados ou uso de adjuvantes específicos para estimular esta resposta possam ultrapassar esta dificuldade, reestimulando os

linfócitos de memória específicos para influenza (189,196). De qualquer forma, sendo uma população de risco incluída no plano de vacinação anual, a resposta nesta população necessita ser averiguada para que possam ser aplicadas estratégias e vacinas mais eficazes.

A obesidade é uma comorbidade em relação a diversas doenças, estando relacionada com diversas disfunções da resposta imune e com outras comorbidades (como doenças cardiovasculares e metabólicas), que por sua vez também podem afetar a resposta imunológica (197–200). Os níveis de obesidade na população estão crescendo a um ritmo acelerado, com estimativas de que mais de 13% da população global e mais de 20% da população adulta brasileira sejam obesos, chegando a ser considerada uma “epidemia” pela OMS (201–203). A obesidade foi determinada como um fator de risco para a influenza durante a pandemia de H1N1 em 2009 e no momento é reconhecida como um importante fator de risco para influenza (204–206). A obesidade também já foi correlacionada com reduzidas respostas vacinais para outros patógenos, mas para influenza este assunto ainda demonstra-se controverso, com relatos na literatura tanto de uma resposta sorológica reduzida nesta população como de uma resposta equivalente à população saudável, ou então uma resposta equivalente mas com um maior decaimento nos títulos de anticorpos ao longo do tempo (181,207–210). Existem inclusive relatos de maior susceptibilidade à infecção por influenza em indivíduos obesos vacinados, mesmo que não sejam detectadas diferenças na resposta sorológica (181,198).

A obesidade está associada à indução de um estado de inflamação crônica por desregulação na produção de citocinas, com menor atividade de células NK, alterações nas populações de linfócitos T CD4 e CD8, com redução na ativação e diminuição da secreção de IFN e granzimas (198,209,211–213). São poucos os estudos avaliando as populações de linfócitos B e a resposta sorológica para influenza na população obesa, mas alguns relatos apontam possíveis alterações nas populações de linfócitos B, com indução de fenótipos pró-inflamatórios, contribuindo para a inflamação crônica, mas uma sobrestimulação destas populações levando à sua exaustão e redução na sua capacidade de responder a estímulos antigênicos e produzir anticorpos (192,214,215). A obesidade está também correlacionada com o aumento de leptinas, hormônio produzido por adipócitos que apresenta importantes funções imunomodulatórias, podendo influenciar de variadas formas tanto a resposta inata como adaptativa frente a patógenos ou vacinas, por exemplo modulando a sobrevivência de linfócitos por inibição da via de apoptose mediada por Fas, pela

inibição da proliferação de células T reg e participando na maturação e diferenciação de linfócitos B (216–218). O tecido adiposo é um ambiente imune complexo e as células e vias de sinalização que sofrem alterações devido à obesidade são diversas (208,219).

Os nossos resultados indicam uma resposta sorológica levemente reduzida na população obesa ao avaliarmos os aumentos de GMT, o que parece estar em concordância com a sua classificação como grupo de risco e com as alterações que a obesidade pode induzir na resposta imune, com relatos de respostas sorológicas reduzidas tanto para vacinas de influenza como de outros patógenos, apesar de não ter sido possível avaliar os títulos de anticorpos ao longo do tempo ou a resposta celular nesta população (208). No entanto, as análises multivariadas não evidenciaram associações desta variável com a SP ou SC, provavelmente devido ao número amostral reduzido da população de obesos no estudo. Tratando-se de uma população de risco, faz-se necessário estabelecer de forma definitiva como a resposta vacinal é modulada por esta condição, para que então seja possível elucidar os mecanismos responsáveis e guiar o desenvolvimento de vacinas mais eficazes.

As estirpes contidas na vacina de cada ano são fruto de um esforço global de vigilância dos FLUV, com caracterização genética e antigênica de milhares de isolados de forma a prever qual estirpe circulará na temporada seguinte e deve ser incluída na vacina, mas esta previsão nem sempre demonstra-se verdadeira, podendo existir não concordância entre as estirpes circulando na população e as estirpes contidas na vacina (220,221). A produção da vacina em ovos embrionados de galinhas também pode induzir adaptação dos vírus assim cultivados, podendo surgir mutações que alterem a sua antigenicidade em comparação aos vírus circulantes (222). Essas alterações se mostraram especialmente importantes nos componentes H3N2 das vacinas de 2017 (Hong Kong) e 2018 (Singapura), que apresentam uma substituição T160K ao serem crescidos em ovos embrionados, o que gera perda de um sítio de glicosilação no sítio antigênico da HA e tem levado a baixas taxas de eficácia vacinal contra o componente H3N2, podendo inclusive estas adaptações estarem associadas a fenômenos de *backboosting* entre as estirpes, de forma semelhante ao OAS (223,224).

Ao considerar-se a baixa resposta ao componente Singapura, é interessante notar que estudos indicam que esta estirpe seja antigenicamente semelhante à estirpe Hong-Kong, apesar das três mutações na HA, sendo que a temporada de 2017 no Brasil foi caracterizada por ampla circulação de H3N2 e um alto percentual da nossa

população foi vacinada em 2017, observando-se uma resposta mais intensa nos NVA (225). Também é necessário notar que os FLUV possuem uma enorme diversidade, com grande diversidade de estirpes dentro de cada subtipo circulando na população, sendo que a elaboração da vacina baseia-se na estimativa de qual grupo antigênico predominará (226). Sendo assim, ao avaliarmos a resposta induzida pela vacina frente a estirpes circulantes buscamos avaliar a possível eficiência da vacina frente a estes fatores. Em relação aos H1N1, observamos que uma resposta muito semelhante entre a estirpe vacinal e as estirpes circulantes estudadas, inclusive com maiores níveis de SP S2 nas estirpes de subclados distintos da estirpe vacinal. Nos influenza B, a resposta entre a estirpe vacinal e as estirpes circulantes pertencentes à mesma linhagem foi novamente semelhante, e mesmo assim foi induzida uma resposta para a estirpe circulante pertencente à linhagem Yamagata, com elevados níveis de SP S2. Os nossos resultados apontam que a vacinação não só é eficaz para estirpes circulantes representativas dos mesmos subclados vacinais como também pode ser uma medida de proteção eficaz mesmo que ocorra não concordância entre as estirpes circulantes e as estirpes vacinais, apesar desta resposta não ser tão eficaz.

O nosso acompanhamento dos voluntários aponta para uma elevada eficácia vacinal, com apenas um caso de infecção identificado, no entanto, com o tamanho amostral reduzido e a impossibilidade de um grupo placebo (por se tratar de populações para as quais a vacinação é recomendada), não foi possível estimar a eficiência vacinal. No entanto, o caso de infecção demonstrou que é possível haver um escape à imunidade vacinal, mesmo em um indivíduo jovem, saudável e sem comorbidades, que foi infectado por uma estirpe semelhante à vacinal. Mas essa infecção não pode ser tomada como evidência contra a vacinação, devendo-se considerar os altos níveis de soroproteção induzidos pela vacina e o potente efeito da imunidade de rebanho ao se considerar um vírus tão ubíquo na população humana como o influenza (227). No entanto, essa infecção nos demonstra a necessidade de entender os mecanismos que modulam a resposta imune para que seja possível atingir não apenas altos níveis de cobertura vacinal, mas sim altos níveis de proteção na população, estabelecendo o efeito de imunidade de rebanho e protegendo os indivíduos mais susceptíveis (228).

7. PERSPECTIVAS

No presente trabalho foi possível avaliar a resposta sorológica à vacina contra a gripe em diferentes anos. No entanto, não foi feita a avaliação funcional dos anticorpos produzidos pela vacinação e nem avaliamos os mecanismos responsáveis pelas alterações na resposta vacinal. Uma perspectiva do trabalho é realizar uma avaliação da atividade de neutralização dos anticorpos, através da técnica de microneutralização e estabelecer uma correlação com os títulos de HI. Adicionalmente, constitui perspectiva deste estudo, investigar os mecanismos de ativação e frequência de linfócitos B nas diferentes subpopulações aqui avaliadas. Além dessas novas análises, o acompanhamento dos voluntários do estudo por mais anos poderá fornecer informações importantes sobre o papel das repetidas vacinações sobre o repertório imune contra o FLUV.

Tendo em vista a queda drástica na circulação do FLUV e a importância de se conhecer a resposta à vacina contra a Covid-19, pretendemos extrapolar as perguntas do estudo para o contexto da atual pandemia, estudando o papel de fatores como obesidade e imunidade prévia na resposta vacinal, comparando os dados com os obtidos aqui.

8. CONCLUSÕES

1- De forma geral, concluímos que as vacinas anti-influenza estudadas foram capazes de induzir uma resposta sorológica eficaz para cada uma das estirpes vacinais, induzindo aumentos dos títulos pré para pós-vacinais e mantendo-se acima do limiar de soroproteção.

2- A vacina proporcionou altos níveis de soroproteção pré e pós-vacinais, apesar das taxas de soroconversão relativamente baixas.

3- A vacina também induziu respostas cruzadas, com aumentos nos títulos para estirpes componentes da vacina em anos anteriores e para estirpes circulantes representativas, com elevados índices de soroproteção.

4- O estabelecimento de uma coorte de voluntários, com a possibilidade de seguimento de uma parcela desses indivíduos, permitiu observar o padrão de aumento e posterior decaimento de imunidade ao longo do tempo, indicando que a vacina ofereça proteção durante a temporada de influenza, mas sendo necessária a vacinação anual.

5- O acompanhamento dos voluntários ofereceu suporte a estas observações, indicando uma elevada eficácia, com apenas uma infecção detectada.

6- A comparação entre diferentes coortes – Fiocruz e USP – evidenciou padrões semelhantes de resposta para o componente vacinal avaliado (Singapura), que apresentou uma resposta reduzida em ambas coortes, quando comparada a outros componentes vacinais e diferentes anos.

7- Apesar de observarmos alguns parâmetros de reduzida resposta vacinal em obesos e idosos, populações que também são consideradas de risco para o desenvolvimento de formas graves da doença, o nosso número amostral baixo não permitiu maiores conclusões sobre essa menor resposta vacinal. Em relação ao histórico vacinal, foi possível demonstrar que a vacinação repetida anualmente, por um lado permite índices mais elevados de soroproteção antes da vacinação, mas por outro leva a índices de soroconversão mais baixos e uma parcela dos indivíduos permanece abaixo dos níveis de soroproteção.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jung HE, Lee HK. Host protective immune Responses against influenza A virus infection. *Viruses*. 2020 May 1 [Citado em:2021 Mar 5];12(5):504. Disponível em: www.mdpi.com/journal/viruses DOI:10.3390/v12050504
2. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology* [Internet]. 6th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013 [Citado em:2018 Jun 8]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=L2uDtgEACAAJ&dq=fields+virology&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwi86sWp28nbAhUKiZAKHYhIAJUQ6AEILzAB>
3. Steinhauer DA, Skehel JJ. Genetics of Influenza Viruses. *Annu Rev Genet*. 2002 [Citado em:2018 Jun 7];36(1):305–32. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.genet.36.052402.152757> DOI:10.1146/annurev.genet.36.052402.152757
4. CDC. Types of Influenza Viruses [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Mar 27]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
5. Bodewes R, Morick D, de Mutsert G, Osinga N, Bestebroer T, van der Vliet S, et al. Recurring influenza B virus infections in seals. *Emerg Infect Dis*. 2013 Mar [Citado em:2021 Mar 29];19(3):511–2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/> DOI:10.3201/eid1903.120965
6. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008 [Citado em:2021 Feb 10];26(SUPPL. 4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19230160/> DOI:10.1016/j.vaccine.2008.07.039
7. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet*. 1999;354(9186):1277–82. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673699012416> DOI:10.1016/S0140-6736(99)01241-6
8. Shaw MW, Xu X, Li Y, Normand S, Ueki RT, Kunimoto GY, et al. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons. *Virology*. 2002 [Citado em:2018 Jun 7];303(1):1–8. Disponível em: https://ac.els-cdn.com/S0042682202917198/1-s2.0-S0042682202917198-main.pdf?_tid=7e88822e-eeefb-4c06-874d-aad637264a6e&acdnat=1528381008_67bc722e9a739373ef958b75f1eb261f DOI:10.1006/viro.2002.1719
9. Biere B, Bauer B, Schweiger B. Differentiation of influenza b virus lineages yamagata and victoria by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1425–7.

Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/48/4/1425> DOI:10.1128/JCM.02116-09

10. Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, Woo JC, Wu X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. *Vaccine*. 2010 [Citado em:2018 Jun 8];28:2149–56. Disponível em: https://ac.els-cdn.com/S0264410X09018714/1-s2.0-S0264410X09018714-main.pdf?_tid=697620ee-fac4-4c6d-9a36-444a2d5fd9be&acdnat=1528464685_454a78c6ff3883dceed226f890f8d14b DOI:10.1016/j.vaccine.2009.11.068
11. Virk RK, Jayakumar J, Mendenhall IH, Moorthy M, Lam P, Linster M, et al. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jan 7 [Citado em:2021 Mar 29];117(1):619–28. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1916585116 DOI:10.1073/pnas.1916585116
12. Potter CW. A history of influenza. *J Appl Microbiol*. 2001;91(4):572–9. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2001.01492.x> DOI:10.1046/j.1365-2672.2001.01492.x
13. Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S, Chen JL. Evolution of influenza A virus by mutation and re-assortment. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 7 [Citado em:2021 Mar 19];18(8). Disponível em: [/pmc/articles/PMC5578040/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3578040/) DOI:10.3390/ijms18081650
14. Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*. 2010;28(31):4895–902. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.031> DOI:10.1016/j.vaccine.2010.05.031
15. Fonville JM, Wilks SH, James SL, Fox A, Ventresca M, Aban M, et al. Antibody landscapes after influenza virus infection or vaccination. *Science* (80-). 2014 Nov 21 [Citado em:2018 Nov 24];346(6212):996–1000. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/346/6212/996.short%5Cnpapers2://publication/uuid/FD683B11-A276-4584-B221-524CEA2AF2B0> DOI:10.1126/science.1256427.Antibody
16. Islam S, Mohn KG-II, Krammer F, Sanne M, Bredholt G, Jul-Larsen Å, et al. Influenza A haemagglutinin specific IgG responses in children and adults after seasonal trivalent live attenuated influenza vaccination. *Vaccine*. 2017 Oct

- [Citado em:2018 Jun 7];35(42):5666–73. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X17311325>
DOI:10.1016/j.vaccine.2017.08.044
17. Kwok KO, Riley S, Perera RAPM, Wei VWI, Wu P, Wei L, et al. Relative incidence and individual-level severity of seasonal influenza A H3N2 compared with 2009 pandemic H1N1. *BMC Infect Dis.* 2017 Dec 11 [Citado em:2018 May 18];17(1):337. Disponível em: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2432-7>
DOI:10.1186/s12879-017-2432-7
 18. Monto AS, Webster RG. Influenza pandemics: History and lessons learned. In: *Textbook of Influenza*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [Citado em:2021 Mar 27]. p. 20–34. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118636817.ch2>
DOI:10.1002/9781118636817.ch2
 19. Guerra F. The Earliest American Epidemic: The Influenza of 1493. *Soc Sci Hist.* 1988 [Citado em:2021 Mar 27];12(3):305. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/1171451?seq=1>
DOI:<https://doi.org/10.1157/13089669>
 20. Muñoz-Sanz A. La gripe de Cristóbal Colón. Hipótesis sobre una catástrofe ecológica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006 [Citado em:2021 Mar 27];24(5):326–34. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16762260/>
DOI:10.1157/13089669
 21. K Shimizu. History of influenza epidemics and discovery of influenza virus. *Nihon Rinsho.* 1997 [Citado em:2021 Mar 2];55(10):2505–11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9360364/>
 22. Nickol ME, Kindrachuk J. A year of terror and a century of reflection: perspectives on the great influenza pandemic of 1918 – 1919. *BMC Infect Dis.* 2019;19(117):1–10. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-3750-8#citeas> DOI:<https://doi.org/10.1186/s12879-019-3750-8>
 23. CDC. 1957-1958 Pandemic (H2N2 virus)- Pandemic Influenza (Flu) [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Mar 2]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1957-1958-pandemic.html>
 24. CDC. The Deadliest Flu: The Complete Story of the Discovery and Reconstruction of the 1918 Pandemic Virus - Pandemic Influenza (Flu) [Internet].

- 2021 [Citado em:2021 Mar 2]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/reconstruction-1918-virus.html>
25. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar P V., Zeng H, Solórzano A, Swayne DE, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* (80-). 2005 Oct 7 [Citado em:2021 Mar 2];310(5745):77–80. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16210530/> DOI:10.1126/science.1119392
 26. Barclay W, Openshaw P. The 1918 Influenza Pandemic: one hundred years of progress, but where now? *Lancet Respir Med*. 2018 [Citado em:2021 Mar 2];6(8):588–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/> DOI:10.1016/S2213-2600(18)30272-8
 27. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. *Lancet*. 1933 Jul 8;222(5732):66–8. DOI:10.1016/S0140-6736(00)78541-2
 28. Shope RE. Swine influenza: filtration experiments and etiology. *J Exp Med*. 1931 Sep 1 [Citado em:2021 Mar 3];54(3):373–85. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19869924/> DOI:10.1084/jem.54.3.373
 29. Plotkin SL, Plotkin SA. *Vaccines - A short history of vaccines*. In: 6th ed. Elsevier; 2013. DOI:10.1016/b978-0-323-35761-6.00001-8
 30. CDC. Influenza Historic Timeline - Pandemic Influenza (Flu) [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Mar 3]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/pandemic-timeline-1930-and-beyond.htm>
 31. Westgeest KB, Russell CA, Lin X, Spronken MIJ, Bestebroer TM, Bahl J, et al. Genomewide Analysis of Reassortment and Evolution of Human Influenza A(H3N2) Viruses Circulating between 1968 and 2011. *J Virol*. 2014;88(5):2844–57. Disponível em: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02163-13> DOI:10.1128/JVI.02163-13
 32. Zakstelskaja LJ, Yakhno MA, Isačenko VA, Molibog E V, Hlustov SA, Antonova I V, et al. Influenza in the USSR in 1977: recurrence of influenzavirus A subtype H1N1. *Bull World Health Organ*. 1978;56(6):919–22. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/261814>
 33. Doshi P. Trends in recorded influenza mortality: United States, 1900-2004. *Am J Public Health*. 2008 May 1 [Citado em:2021 Mar 2];98(5):939–45. Disponível em: </pmc/articles/PMC2374803/> DOI:10.2105/AJPH.2007.119933
 34. Zhang A, Stacey HD, Mullarkey CE, Miller MS. Original Antigenic Sin: How First Exposure Shapes Lifelong Anti-Influenza Virus Immune Responses. *J Immunol*. 2019 Jan 15 [Citado em:2021 May 15];202(2):335–40. Disponível em:

- <http://www.jimmunol.org/content/202/2/335> DOI:10.4049/jimmunol.1801149
35. CDC. 2009 H1N1 Pandemic (H1N1pdm09 virus) - Pandemic Influenza (Flu) [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Mar 2]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/2009-h1n1-pandemic.html>
 36. CDC. 2009 H1N1 Pandemic Timeline - Pandemic Influenza (Flu) [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Mar 2]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/2009-pandemic-timeline.html>
 37. Mena I, Nelson MI, Quezada-Monroy F, Dutta J, Cortes-Fernández R, Lara-Puente JH, et al. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. *Elife*. 2016 Jun 28 [Citado em:2021 Mar 2];5(JUN). Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4957980/#:~:text=Although the most straightforward explanation,been detected in the Americas.&text=Thus%2C this region is the,that started the 2009 pandemic.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4957980/#:~:text=Although%20the%20most%20straightforward%20explanation,been%20detected%20in%20the%20Americas.&text=Thus%2C%20this%20region%20is%20the,that%20started%20the%202009%20pandemic.) DOI:10.7554/eLife.16777
 38. Lam TT-Y, Zhu H, Wang J, Smith DK, Holmes EC, Webster RG, et al. Reassortment Events among Swine Influenza A Viruses in China: Implications for the Origin of the 2009 Influenza Pandemic. *J Virol*. 2011 Oct 1 [Citado em:2021 Mar 2];85(19):10279–85. Disponível em: <http://jvi.asm.org/> DOI:10.1128/JVI.05262-11
 39. Simonsen L, Spreeuwenberg P, Lustig R, Taylor RJ, Fleming DM, Kroneman M, et al. Global Mortality Estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLaMOR Project: A Modeling Study. *PLoS Med*. 2013 Nov [Citado em:2021 Mar 2];10(11). Disponível em: </pmc/articles/PMC3841239/> DOI:10.1371/journal.pmed.1001558
 40. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: A modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2012 Sep 1 [Citado em:2021 Mar 2];12(9):687–95. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S1473309912701214/fulltext> DOI:10.1016/S1473-3099(12)70121-4
 41. Van Kerkhove MD, Hirve S, Koukounari A, Mounts AW. Estimating age-specific cumulative incidence for the 2009 influenza pandemic: a meta-analysis of A(H1N1)pdm09 serological studies from 19 countries. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013 Sep 1 [Citado em:2018 Jun 7];7(5):872–86. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/irv.12074> DOI:10.1111/irv.12074

42. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* (80-). 2009 Jul 10 [Citado em:2021 Mar 2];325(5937):197–201. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19465683/> DOI:10.1126/science.1176225
43. Carnaccini S, Perez DR. H9 influenza viruses: An emerging challenge. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020 Jun 1 [Citado em:2021 Apr 3];10(6). Disponível em: [/pmc/articles/PMC7263090/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/) DOI:10.1101/cshperspect.a038588
44. Nuñez IA, Ross TM. A review of H5Nx avian influenza viruses. *Ther Adv Vaccines Immunother*. 2019 Jan [Citado em:2021 Apr 3];7:251513551882162. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6391539/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/) DOI:10.1177/2515135518821625
45. Shan X, Lai S, Liao H, Li Z, Lan Y, Yang W. The epidemic potential of avian influenza A (H7N9) virus in humans in mainland China: A two-stage risk analysis. *PLoS One*. 2019 Apr 19 [Citado em:2021 Apr 3];14(4):e0215857. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0215857> DOI:10.1371/journal.pone.0215857
46. Glaser L, Stevens J, Zamarin D, Wilson IA, García-Sastre A, Tumpey TM, et al. A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity. *J Virol*. 2005 Sep 1 [Citado em:2021 Mar 19];79(17):11533–6. Disponível em: [/pmc/articles/PMC1193621/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15111111/) DOI:10.1128/jvi.79.17.11533-11536.2005
47. Obadan AO, Santos J, Ferreri L, Thompson AJ, Carnaccini S, Geiger G, et al. Flexibility In Vitro of Amino Acid 226 in the Receptor-Binding Site of an H9 Subtype Influenza A Virus and Its Effect In Vivo on Virus Replication, Tropism, and Transmission . *J Virol*. 2018 Dec 19 [Citado em:2021 Mar 19];93(6). Disponível em: [/pmc/articles/PMC6401463/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/) DOI:10.1128/jvi.02011-18
48. Tamerius JD, Shaman J, Alonso WJ, Bloom-Feshbach K, Uejio CK, Comrie A, et al. Environmental Predictors of Seasonal Influenza Epidemics across Temperate and Tropical Climates. *PLoS Pathog*. 2013 Mar 7 [Citado em:2019 Jun 11];9(3):e1003194. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003194> DOI:10.1371/journal.ppat.1003194
49. Perdigão ACB, Siqueira MM, Moura FEA. Seasonality of Influenza in the Tropics: A Distinct Pattern in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Jul 1 [Citado em:2019 Jun 11];81(1):180–3. Disponível em:

<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2009.81.180>

DOI:10.4269/ajtmh.2009.81.180

50. Yang W, Elankumaran S, Marr LC. Relationship between humidity and influenza A viability in droplets and implications for influenza's seasonality. *PLoS One*. 2012 [Citado em:2019 Jun 11];7(10):e46789. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056454>
DOI:10.1371/journal.pone.0046789
51. Lowen AC, Steel J. Roles of Humidity and Temperature in Shaping Influenza Seasonality. Schultz-Cherry S, editor. *J Virol*. 2014 Jul 15 [Citado em:2019 Jun 11];88(14):7692–5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789791> DOI:10.1128/JVI.03544-13
52. CANNELL JJ, VIETH R, UMHAU JC, HOLICK MF, GRANT WB, MADRONICH S, et al. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect*. 2006 Dec 7 [Citado em:2019 Jun 11];134(6):1129–40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959053>
DOI:10.1017/S0950268806007175
53. Eccles R. An Explanation for the Seasonality of Acute Upper Respiratory Tract Viral Infections. *Acta Otolaryngol*. 2002 Jan 8 [Citado em:2021 Mar 19];122(2):183–91. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11936911/>
DOI:10.1080/00016480252814207
54. Kudo E, Song E, Yockey LJ, Rakib T, Wong PW, Homer RJ, et al. Low ambient humidity impairs barrier function and innate resistance against influenza infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 May 28 [Citado em:2019 Jun 11];116(22):10905–10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31085641> DOI:10.1073/pnas.1902840116
55. Pica N, Chou Y-Y, Bouvier NM, Palese P. Transmission of influenza B viruses in the guinea pig. *J Virol*. 2012 Apr 15 [Citado em:2019 Jun 11];86(8):4279–87. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22301149>
DOI:10.1128/JVI.06645-11
56. Anderson G, Reiter RJ. Melatonin: Roles in influenza, Covid-19, and other viral infections. *Rev Med Virol*. 2020 May 21 [Citado em:2021 Mar 21];30(3). Disponível em: </pmc/articles/PMC7235470/> DOI:10.1002/rmv.2109
57. Münch M, Goldbach R, Zumstein N, Vonmoos P, Scartezzini JL, Wirz-Justice A, et al. Enhancing daily light exposure increases the antibody response to influenza vaccination in patients with dementia. *bioRxiv*. 2020 [Citado em:2021

- Mar 21]; Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.11.30.405175>
DOI:10.1101/2020.11.30.405175
58. Sundar IK, Ahmad T, Yao H, Hwang JW, Gerloff J, Lawrence BP, et al. Influenza A virus-dependent remodeling of pulmonary clock function in a mouse model of COPD. *Sci Rep.* 2015 Apr 29 [Citado em:2021 Mar 21];4. Disponível em: </pmc/articles/PMC4413879/> DOI:10.1038/srep09927
 59. Lofgren E, Fefferman NH, Naumov YN, Gorski J, Naumova EN. Influenza Seasonality: Underlying Causes and Modeling Theories. *J Virol.* 2007 Jun 1 [Citado em:2021 Mar 21];81(11):5429–36. Disponível em: <http://jvi.asm.org/> DOI:10.1128/jvi.01680-06
 60. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet.* 2018;391(10127):1285–300. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29248255/> DOI:10.1016/S0140-6736(17)33293-2
 61. WHO. Global Influenza Strategy 2019-2030 [Internet]. 2019 [Citado em:2021 Mar 27]. Disponível em: https://www.who.int/influenza/global_influenza_strategy_2019_2030/en/#:~:text=The Global Influenza Strategy for,control and preparedness for future
 62. Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Panatto D. Clinical and socioeconomic impact of seasonal and pandemic influenza in adults and the elderly. *Hum Vaccin Immunother.* 2012 Jan 5;8(1):21–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252007> DOI:10.4161/hv.8.1.17622
 63. Ministério da Saúde. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 49 de 2019 [Internet]. 2019 [Citado em:2021 Mar 25]. Disponível em: <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-38-2-interativo.pdf>
 64. Ministério da Saúde. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. 2018.
 65. Vinícius Araújo Fraça G, Carolina de Medeiros F, Matheus Bremm J, Souza Rocha M, Fernandes Santos Alves R, Fontana Sutile Tardetti Fantinato F, et al. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL 43 [Internet]. 2020 [Citado em:2021 May 13]. Disponível em: <https://ourworldindata.org/coronavirus>
 66. Vinícius Araújo Fraça G, Carolina de Medeiros F, Matheus Bremm J, Souza Rocha M, Fernandes Santos Alves R, Fontana Sutile Tardetti Fantinato F, et al.

- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL 58 [Internet]. Vol. 14, Semana Epidemiológica. 2021 [Citado em:2021 May 13]. Disponível em: <https://ourworldindata.org/coronavirus>
67. Monto AS. Reflections on The Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) at 65 Years: An Expanding Framework for Influenza Detection, Prevention and Control. *Influenza Other Respi Viruses*. 2018 Jan 1 [Citado em:2021 Mar 19];12(1):10–2. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/irv.12511> DOI:10.1111/irv.12511
 68. WHO. Protocolo para a vigilância sentinela da gripe [Internet]. 2015 [Citado em:2021 Mar 29]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/187143?locale-attribute=pt&locale=fr>
 69. CDC. Influenza Virus Testing Methods [Internet]. 2020. [Citado em:2021 Aug 15]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/table-testing-methods.htm>
 70. Sriwilaijaroen N, Nakakita S, Kondo S, Yagi H, Kato K, Murata T, et al. *N*-glycan structures of human alveoli provide insight into influenza A virus infection and pathogenesis. *FEBS J*. 2018 May 11 [Citado em:2019 Jun 13];285(9):1611–34. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.14431> DOI:10.1111/febs.14431
 71. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 2000 [Citado em:2021 Mar 15];69:531–69. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10966468/> DOI:10.1146/annurev.biochem.69.1.531
 72. Heaton NS, Sachs D, Chen CJ, Hai R, Palese P. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 10 [Citado em:2021 Mar 15];110(50):20248–53. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24611110/> DOI:10.1073/pnas.1320524110
 73. Crowe JE. Influenza Virus–Specific Human Antibody Repertoire Studies. *J Immunol*. 2019 Jan 15 [Citado em:2019 Jul 5];202(2):368–73. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1801459> DOI:10.4049/jimmunol.1801459
 74. Altman MO, Angeletti D, Yewdell JW. Antibody Immunodominance: The Key to Understanding Influenza Virus Antigenic Drift. *Viral Immunol*. 2018 Mar 1 [Citado em:2019 Jul 5];31(2):142–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/> DOI:10.1089/vim.2017.0011

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5863095/>
DOI:10.1089/vim.2017.0129
75. Imai M, Kawaoka Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. *Curr Opin Virol.* 2012 Apr [Citado em:2019 Jun 24];2(2):160–7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445963>
DOI:10.1016/j.coviro.2012.03.003
76. Watanabe Y, Arai Y, Kawashita N, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, et al. Characterization of H5N1 Influenza Virus Quasispecies with Adaptive Hemagglutinin Mutations from Single-Virus Infections of Human Airway Cells. *J Virol.* 2018 [Citado em:2019 Jun 24];92(11). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5952156/>
DOI:10.1128/JVI.02004-17
77. Air GM. Influenza virus-glycan interactions. *Curr Opin Virol.* 2014 Aug [Citado em:2019 Jun 12];7:128–33. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25061947>
DOI:10.1016/j.coviro.2014.06.004
78. Walther T, Karamanska R, Chan RWY, Chan MCW, Jia N, Air G, et al. Glycomic Analysis of Human Respiratory Tract Tissues and Correlation with Influenza Virus Infection. Pekosz A, editor. *PLoS Pathog.* 2013 Mar 14 [Citado em:2021 Mar 19];9(3):e1003223. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003223>
DOI:10.1371/journal.ppat.1003223
79. Vatti A, Monsalve DM, Pacheco Y, Chang C, Anaya JM, Gershwin ME. Original antigenic sin: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2017;83:12–21. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2017.04.008>
DOI:10.1016/j.jaut.2017.04.008
80. Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Einfeld AJ, Neumann G, Hase T, et al. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol.* 2013 Oct 2 [Citado em:2021 Mar 15];7:97. Disponível em: </pmc/articles/PMC3819658/> DOI:10.1186/1752-0509-7-97
81. Stegmann T. Membrane Fusion Mechanisms: The Influenza Hemagglutinin Paradigm and its Implications for Intracellular Fusion. *Traffic.* 2000 Aug 1 [Citado em:2021 Mar 15];1(8):598–604. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0854.2000.010803.x> DOI:10.1034/j.1600-0854.2000.010803.x

82. Einfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. At the centre: Influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Jan 11 [Citado em:2021 Mar 15];13(1):28–41. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25417656/> DOI:10.1038/nrmicro3367
83. Klemm C, Boergeling Y, Ludwig S, Ehrhardt C. Immunomodulatory Nonstructural Proteins of Influenza A Viruses. *Trends Microbiol.* 2018 Jul 1 [Citado em:2019 Jun 28];26(7):624–36. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X17302792?via%3Dihub#bib0055> DOI:10.1016/j.tim.2017.12.006
84. Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. *J Biomol Chem.* 2010 [Citado em:2018 Jun 7];285(37):28403–28409. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/285/37/28403.full.pdf> DOI:10.1074/jbc.R110.129809
85. Hussain M, Galvin H, Haw TY, Nutsford A, Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist.* 2017 Apr [Citado em:2018 Jun 7];Volume 10:121–34. Disponível em: <https://www.dovepress.com/drug-resistance-in-influenza-a-virus-the-epidemiology-and-management-peer-reviewed-article-IDR> DOI:10.2147/IDR.S105473
86. Kucharski AJ, Lessler J, Read JM, Zhu H, Jiang CQ, Guan Y, et al. Estimating the Life Course of Influenza A(H3N2) Antibody Responses from Cross-Sectional Data. Read AF, editor. *PLOS Biol.* 2015 Mar 3 [Citado em:2018 May 18];13(3):e1002082. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002082> DOI:10.1371/journal.pbio.1002082
87. WHO. Data and statistics [Internet]. World Health Organization; 2021 [Citado em:2021 Mar 25]. Disponível em: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/data-and-statistics>
88. Carrat F, Vergu E, Ferguson NM, Lemaître M, Cauchemez S, Leach S, et al. Time Lines of Infection and Disease in Human Influenza: A Review of Volunteer Challenge Studies. *Am J Epidemiol.* 2008 Apr 1 [Citado em:2020 Dec 28];167(7):775–85. Disponível em: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwm375> DOI:10.1093/aje/kwm375
89. Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. Clinical Signs and Symptoms Predicting Influenza Infection. *Arch Intern Med.* 2000 Nov 27 [Citado

- em:2018 Jun 7];160(21):3243–7. Disponible em:
<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.160.21.3243>
 DOI:10.1001/archinte.160.21.3243
90. Eccles R. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis.* 2005 Nov;5(11):718–25. Disponible em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16253889> DOI:10.1016/S1473-3099(05)70270-X
 91. PLOS Medicine Staff. Correction: Global Role and Burden of Influenza in Pediatric Respiratory Hospitalizations, 1982-2012: A Systematic Analysis. *PLoS Med.* 2016 Jun 8 [Citado em:2018 Jun 7];13(6):e1002060. Disponible em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27275597>
 DOI:10.1371/journal.pmed.1002060
 92. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2019 Jun 1 [Citado em:2021 Mar 18];19(6):383–97. Disponible em: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0143-6> DOI:10.1038/s41577-019-0143-6
 93. Kreijtz JHCM, Fouchier RAM, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* 2011 Dec 22 [Citado em:2021 Mar 18];162(1–2):19–30. Disponible em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170211003753>
 DOI:10.1016/j.virusres.2011.09.022
 94. Cassotta A, Papanoditis P, Geiger R, Mettu RR, Landry SJ, Donati A, et al. Deciphering and predicting CD4+ T cell immunodominance of influenza virus hemagglutinin. *J Exp Med.* 2020 Jul 9 [Citado em:2021 Aug 15];217(10). Disponible em: [/pmc/articles/PMC7537397/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34512345/) DOI:10.1084/JEM.20200206
 95. Gentles LE, Wan H, Eichelberger MC, Bloom JD. Antibody Neutralization of an Influenza Virus that Uses Neuraminidase for Receptor Binding. *Viruses* 2020, Vol 12, Page 597. 2020 May 30 [Citado em:2021 Aug 15];12(6):597. Disponible em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/6/597/htm> DOI:10.3390/V12060597
 96. Ana-Sosa-Batiz F, Vanderven H, Jegaskanda S, Johnston A, Rockman S, Laurie K, et al. Influenza-Specific Antibody-Dependent Phagocytosis. *PLoS One.* 2016 Apr 1 [Citado em:2021 Aug 15];11(4):e0154461. Disponible em:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0154461>
 DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0154461
 97. Ekiert DC, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. *Curr Opin Virol.* 2012 [Citado em:2021 Mar

- 27];2(2):134–41. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3368890/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/)
DOI:10.1016/j.coviro.2012.02.005
98. Winarski KL, Tang J, Klenow L, Lee J, Coyle EM, Manischewitz J, et al. Antibody-dependent enhancement of influenza disease promoted by increase in hemagglutinin stem flexibility and virus fusion kinetics. *Proc Natl Acad Sci*. 2019 Jul 23 [Citado em:2021 Aug 15];116(30):15194–9. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/116/30/15194> DOI:10.1073/PNAS.1821317116
99. P M, G K, S S, HE M, F A, A B, et al. Influenza Virus Infection Induces a Narrow Antibody Response in Children but a Broad Recall Response in Adults. *MBio*. 2020 Jan 1 [Citado em:2021 Aug 15];11(1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31964741/> DOI:10.1128/MBIO.03243-19
100. Biondo C, Lentini G, Beninati C, Teti G. The dual role of innate immunity during influenza. *Biomed J*. 2019 Feb 1 [Citado em:2021 Jan 24];42(1):8–18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987709/>
DOI:10.1016/j.bj.2018.12.009
101. Wang Q, Fang P, He R, Li M, Yu H, Zhou L, et al. O-GlcNAc transferase promotes influenza A virus-induced cytokine storm by targeting interferon regulatory factor-5. *Sci Adv*. 2020 Apr 1 [Citado em:2021 Jan 24];6(16):eaaz7086. Disponível em: <https://advances.sciencemag.org/content/6/16/eaaz7086>
DOI:10.1126/sciadv.aaz7086
102. Liu Q, Zhou Y, Yang Z. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol*. 2016 Jan 20 [Citado em:2021 Jan 24];13(1):3–10. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4711683/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/) DOI:10.1038/cmi.2015.74
103. Délia R V., Harrison K, Oyston PC, Lukaszewski RA, Clark GC. Targeting the “Cytokine Storm” for Therapeutic Benefit. *Clin Vaccine Immunol*. 2013 Mar 1 [Citado em:2021 Jan 24];20(3):319–27. Disponível em: <http://cvi.asm.org/>
DOI:10.1128/CVI.00636-12
104. Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, Huang S, Chen J-L. Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front Immunol*. 2018 Mar 5 [Citado em:2019 Jun 11];9:320. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00320/full>
DOI:10.3389/fimmu.2018.00320
105. Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2

- protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog.* 2005 [Citado em:2021 Jan 24];1(1):0040–54. Disponível em: [/pmc/articles/PMC1238739/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1238739/)
DOI:10.1371/journal.ppat.0010004
106. De Vlugt C, Sikora D, Pelchat M. Insight into influenza: A virus cap-snatching. *Viruses.* 2018 Nov 16 [Citado em:2021 Mar 29];10(11). Disponível em: [/pmc/articles/PMC6266781/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30110641/) DOI:10.3390/v10110641
107. Beale R, Wise H, Stuart A, Ravenhill BJ, Digard P, Randow F. A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe.* 2014 Feb 12 [Citado em:2021 Mar 27];15(2):239–47. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.006>
DOI:10.1016/j.chom.2014.01.006
108. Doolittle LM, Davis IC. Influenza in smokers: More than just a cause of symptom exacerbations? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018 Dec 1 [Citado em:2021 Mar 27];59(6):670–1. Disponível em: www.atsjournals.org. DOI:10.1165/rcmb.2018-0253ED
109. Dhakal S, Klein SL. Host Factors Impact Vaccine Efficacy: Implications for Seasonal and Universal Influenza Vaccine Programs. *J Virol.* 2019 Aug 7 [Citado em:2021 Mar 27];93(21). Disponível em: [https://doi.org/](https://doi.org/10.1128/jvi.00797-19) DOI:10.1128/jvi.00797-19
110. Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. Immunogenetics of seasonal influenza vaccine response. *Vaccine.* 2008;26(SUPPL. 4). DOI:10.1016/j.vaccine.2008.07.065
111. Prabhu SS, Chakraborty TT, Kumar N, Banerjee I. Association between IFITM3 rs12252 polymorphism and influenza susceptibility and severity: A meta-analysis. *Gene.* 2018;674. DOI:10.1016/j.gene.2018.06.070
112. Chertow DS, Memoli MJ. Bacterial coinfection in influenza: A grand rounds review. *JAMA.* 2013 Jan 16 [Citado em:2021 Jan 16];309(3):275–82. Disponível em: www.jama.com. DOI:10.1001/jama.2012.194139
113. Rice TW, Rubinson L, Uyeki TM, Vaughn FL, John BB, Miller RR, et al. Critical illness from 2009 pandemic influenza A virus and bacterial coinfection in the United States. *Crit Care Med.* 2012 May [Citado em:2021 Jan 16];40(5):1487–98. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511131/>
DOI:10.1097/CCM.0b013e3182416f23
114. Grabowska K, Högberg L, Penttinen P, Svensson Å, Ekdahl K. Occurrence of

- invasive pneumococcal disease and number of excess cases due to influenza. *BMC Infect Dis.* 2006 [Citado em:2021 Jan 24];6:58. Disponível em: </pmc/articles/PMC1534049/?report=abstract> DOI:10.1186/1471-2334-6-58
115. van der Sluijs KF, van der Poll T, Lutter R, Juffermans NP, Schultz MJ. Bench-to-bedside review: Bacterial pneumonia with influenza - pathogenesis and clinical implications. *Crit Care.* 2010 Apr 19 [Citado em:2021 Jan 24];14(2):1–8. Disponível em: <https://link.springer.com/articles/10.1186/cc8893> DOI:10.1186/cc8893
 116. Kumar A. Critically Ill Patients With 2009 Influenza A(H1N1) Infection in Canada. *JAMA.* 2009 Nov 4 [Citado em:2021 Jan 24];302(17):1872. Disponível em: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2009.1496> DOI:10.1001/jama.2009.1496
 117. Stegemann S, Dahlberg S, Kröger A, Gereke M, Bruder D, Henriques-Normark B, et al. Increased susceptibility for superinfection with *Streptococcus pneumoniae* during influenza virus infection is not caused by TLR7-mediated lymphopenia. *PLoS One.* 2009 Mar 17 [Citado em:2021 Jan 16];4(3). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19290047/> DOI:10.1371/journal.pone.0004840
 118. Jia L, Xie J, Zhao J, Cao D, Liang Y, Hou X, et al. Mechanisms of Severe Mortality-Associated Bacterial Co-infections Following Influenza Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Aug 3;0(AUG):338. DOI:10.3389/FCIMB.2017.00338
 119. CDC. Influenza Antiviral Medications: Summary for Clinicians [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Feb 16]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>
 120. Ministério da Saúde. Protocolo de tratamento de Influenza: 2017 [Internet]. [Citado em:2021 Feb 16]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/publicacoes/protocolo_tratamento_
 121. Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng Y-M, Studies MOBN. GDL, Gehrig N, et al. Community Transmission of Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29 [Citado em:2021 Feb 17];365(26):2541–2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22204735/> DOI:10.1056/nejmc1111078
 122. Principi N, Camilloni B, Alunno A, Polinori I, Argentiero A, Esposito S. Drugs for Influenza Treatment: Is There Significant News? *Front Med.* 2019 May 28 [Citado em:2021 Feb 17];6:109. Disponível em: </pmc/articles/PMC6546914/>

DOI:10.3389/fmed.2019.00109

123. CDC. Influenza Antiviral Drug Resistance [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Feb 16]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/treatment/antiviralresistance.htm>
124. Clark MP, Ledebor MW, Davies I, Byrn RA, Jones SM, Perola E, et al. Discovery of a novel, first-in-class, orally bioavailable azaindole inhibitor (VX-787) of influenza PB2. *J Med Chem*. 2014 Aug 14 [Citado em:2021 Feb 17];57(15):6668–78. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25019388/> DOI:10.1021/jm5007275
125. Gupta P, Kamath A V., Park S, Chiu H, Lutman J, Maia M, et al. Preclinical pharmacokinetics of MHAA4549A, a human monoclonal antibody to influenza A virus, and the prediction of its efficacious clinical dose for the treatment of patients hospitalized with influenza A. *MAbs*. 2016 Jul 3 [Citado em:2021 Feb 17];8(5):991–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27031797/> DOI:10.1080/19420862.2016.1167294
126. Koshimichi H, Ishibashi T, Kawaguchi N, Sato C, Kawasaki A, Wajima T. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of the Novel Anti-influenza Agent Baloxavir Marboxil in Healthy Adults: Phase I Study Findings. *Clin Drug Investig*. 2018 Dec 1 [Citado em:2021 Feb 17];38(12):1189–96. Disponível em: </pmc/articles/PMC6267547/> DOI:10.1007/s40261-018-0710-9
127. Furuta Y, Komeno T, Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017 [Citado em:2021 Feb 17];93(7):449–63. Disponível em: </pmc/articles/PMC5713175/> DOI:10.2183/pjab.93.027
128. Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, Lee N, de Jong MD, Hurt AC, et al. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med*. 2018 Sep 6 [Citado em:2021 Feb 17];379(10):913–23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30184455/> DOI:10.1056/nejmoa1716197
129. Nguyen HT, Fry AM, Gubareva L V. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther*. 2012 [Citado em:2021 Feb 17];17(1 Pt B):159–73. Disponível em: <http://www.intmedpress.com/journals/avt/abstract.cfm?id=2067&pid=88> DOI:10.3851/IMP2067
130. Kumar A, Singh S. Editorial: Influenza Virus Vaccines and Immunotherapies. *Front Immunol*. 2015 Nov 24 [Citado em:2021 Mar 25];6(NOV):1. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00599/abstract>

- DOI:10.3389/fimmu.2015.00599
131. Shriver Z, Trevejo JM, Sasisekharan R. Antibody-Based Strategies to Prevent and Treat Influenza. *Front Immunol.* 2015 Jul 13 [Citado em:2021 Mar 25];6(JUN):315. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00315/abstract>
DOI:10.3389/fimmu.2015.00315
 132. Wong SS, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jul [Citado em:2021 May 15];26(3):476–92. Disponível em: </pmc/articles/PMC3719499/> DOI:10.1128/CMR.00097-12
 133. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2020 southern hemisphere influenza season. 2020 [Citado em:2021 Mar 27]; Disponível em: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2020_south/en/
 134. Zost SJ, Wu NC, Hensley SE, Wilson IA. Immunodominance and Antigenic Variation of Influenza Virus Hemagglutinin: Implications for Design of Universal Vaccine Immunogens. *J Infect Dis.* 2019;219. DOI:10.1093/infdis/jiy696
 135. Barros ENC de, Cintra O, Rossetto E, Freitas L, Colindres R. Patterns of influenza B circulation in Brazil and its relevance to seasonal vaccine composition. *Brazilian J Infect Dis.* 2016 Jan 1;20(1):81–90. DOI:10.1016/j.bjid.2015.09.009
 136. WHO. FluNet - CHARTS. 2021 [Citado em:2021 Mar 27]; Disponível em: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/charts/en/
 137. Butantan I. Vacinas [Internet]. 2020 [Citado em:2021 Jan 14]. Disponível em: <https://www.butantan.gov.br/soros-e-vacinas/vacinas>
 138. Crépey P, Boiron L, Araujo RR, Lopez JG, Petitjean A, de Albuquerque Luna EJ. Impact of quadrivalent influenza vaccines in Brazil: A cost-effectiveness analysis using an influenza transmission model. *BMC Public Health.* 2020 Sep 9 [Citado em:2021 Mar 25];20(1):1–11. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09409-7> DOI:10.1186/s12889-020-09409-7
 139. Hill EM, Petrou S, Forster H, de Lusignan S, Yonova I, Keeling MJ. Optimising age coverage of seasonal influenza vaccination in England: A mathematical and health economic evaluation. *PLOS Comput Biol.* 2020 Oct 6 [Citado em:2021 Apr 3];16(10):e1008278. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1008278>
DOI:10.1371/journal.pcbi.1008278

140. Milne GJ, Halder N, Kelso JK, Barr IG, Moyes J, Kahn K, et al. Trivalent and quadrivalent influenza vaccination effectiveness in Australia and South Africa: results from a modelling study. *Influenza Other Respi Viruses*. 2016 Jul 1 [Citado em:2021 Apr 3];10(4):324–32. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26663701/> DOI:10.1111/irv.12367
141. Koutsakos M, Wheatley AK, Loh L, Clemens EB, Sant S, Nüssing S, et al. Circulating TFH cells, serological memory, and tissue compartmentalization shape human influenza-specific B cell immunity. *Sci Transl Med*. 2018 Feb 14 [Citado em:2021 Jan 14];10(428):8405. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29444980/> DOI:10.1126/scitranslmed.aan8405
142. Huang K-YA, Chang S-C, Huang Y-C, Chiu C-H, Lin T-Y. Antibody Responses to Trivalent Inactivated Influenza Vaccine in Health Care Personnel Previously Vaccinated and Vaccinated for The First Time. *Sci Rep*. 2017 Jan 18 [Citado em:2018 Jun 8];7(JAN):40027. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep40027.pdf> DOI:10.1038/srep40027
143. Sridhar S, Begom S, Hoschler K, Bermingham A, Adamson W, Carman W, et al. Longevity and determinants of protective humoral immunity after pandemic influenza infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Feb 1 [Citado em:2018 May 18];191(3):325–32. Disponível em: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201410-1798OC> DOI:10.1164/rccm.201410-1798OC
144. WHO. Influenza vaccine viruses and reagents [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Mar 27]. Disponível em: <https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/en/>
145. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season [Internet]. 2018 [Citado em:2021 Apr 13]. Disponível em: https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201809_recommendation.pdf
146. Raymond DD, Stewart SM, Lee J, Ferdman J, Bajic G, Do KT, et al. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat Med*. 2016 Dec 1 [Citado em:2021 Jan 14];22(12):1465–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27820604/> DOI:10.1038/nm.4223
147. CDC. Past Seasons Vaccine Effectiveness Estimates [Internet]. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/past-seasons-estimates.html>

148. Bridges CB, Thompson WW, Meltzer MI, Reeve GR, Talamonti WJ, Cox NJ, et al. Effectiveness and Cost-Benefit of Influenza Vaccination of Healthy Working Adults. *Jama*. 2000;284(13):1655. Disponible em: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.284.13.1655>
DOI:10.1001/jama.284.13.1655
149. Tricco AC, Chit A, Soobiah C, Hallett D, Meier G, Chen MH, et al. Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: A systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2013 [Citado em:2018 Jun 8];11(1):1. Disponible em: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/11/153>
DOI:10.1186/1741-7015-11-153
150. Belongia EA, Skowronski DM, McLean HQ, Chambers C, Sundaram ME, De Serres G. Repeated annual influenza vaccination and vaccine effectiveness: review of evidence. *Expert Rev Vaccines*. 2017 Jul 3 [Citado em:2018 Jun 8];16(7):723–36. Disponible em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2017.1334554>
DOI:10.1080/14760584.2017.1334554
151. Dawood FS, Chung JR, Kim SS, Zimmerman RK, Nowalk MP, Jackson ML, et al. Interim Estimates of 2019–20 Seasonal Influenza Vaccine Effectiveness - United States. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020 Feb 21 [Citado em:2020 Apr 18];69(7):177–82. Disponible em: http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6907a1.htm?s_cid=mm6907a1_w
DOI:10.15585/mmwr.mm6907a1
152. Gostic KM, Bridge R, Brady S, Viboud C, Worobey M, Lloyd-Smith JO. Childhood immune imprinting to influenza A shapes birth year-specific risk during seasonal H1N1 and H3N2 epidemics. *PLOS Pathog*. 2019 [Citado em:2021 Jan 14];15(12):e1008109. Disponible em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1008109>
DOI:10.1371/journal.ppat.1008109
153. Glezen WP. Influenza Control—Unfinished Business. *JAMA*. 1999 Mar 10 [Citado em:2018 Jun 7];281(10):944. Disponible em: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.281.10.944>
DOI:10.1001/jama.281.10.944
154. Rolfes MA, Foppa IM, Garg S, Flannery B, Brammer L, Singleton JA, et al. Estimated Influenza Illnesses, Medical Visits, Hospitalizations, and Deaths Averted by Vaccination in the United States - Seasonal Influenza (Flu) [Internet].

- CDC, NCIRD. 2016 [Citado em:2018 Jun 8]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/disease/2016-17.htm>
155. Gomez Lorenzo MM, Fenton MJ. Immunobiology of influenza vaccines. *Chest*. 2013 [Citado em:2019 Dec 11];143(2):502–10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23381315/#:~:text=Vaccine adjuvants and live attenuated,of a universal influenza vaccine. DOI:10.1378/chest.12-1711>
 156. Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Panato D. Live attenuated influenza vaccine - A review. *J Prev Med Hyg*. 2011 Sep 1 [Citado em:2021 Mar 27];52(3):95–101. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/22010534> DOI:10.15167/2421-4248/jpmh2011.52.3.257
 157. Sridhar S, Brokstad KA, Cox RJ. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines*. 2015 Apr 24 [Citado em:2018 Jun 7];3(2):373–89. Disponível em: www.mdpi.com/journal/vaccines DOI:10.3390/vaccines3020373
 158. DiazGranados CA, Dunning AJ, Kimmel M, Kirby D, Treanor J, Collins A, et al. Efficacy of High-Dose versus Standard-Dose Influenza Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med*. 2014 Aug 14 [Citado em:2018 Nov 24];371(7):635–45. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1315727> DOI:10.1056/NEJMoa1315727
 159. ANVISA. Anvisa aprova vacina influenza para idosos [Internet]. ANVISA. 2018 [Citado em:2020 Apr 18]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/anvisa-aprova-vacina-influenza-para-idosos>
 160. CDC. Fluzone High-Dose Seasonal Influenza Vaccine [Internet]. 2021 [Citado em:2021 Mar 27]. Disponível em: https://www.cdc.gov/flu/prevent/qa_fluzone.htm
 161. Berlanda Scorza F, Tsvetnitsky V, Donnelly JJ. Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines. *Vaccine*. 2016;34(26):2926–33. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.085> DOI:10.1016/j.vaccine.2016.03.085
 162. Osterhaus A, Fouchier R, Rimmelzwaan G. Towards universal influenza vaccines? *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2011 [Citado em:2018 May 18];366(1579):2766–73. Disponível em: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/royptb/366/1579/2766.full.pdf> DOI:10.1098/rstb.2011.0102
 163. Coughlan L, Palese P. Overcoming Barriers in the Path to a Universal Influenza

- Virus Vaccine. *Cell Host Microbe*. 2018;24(1):18–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30001520/> DOI:10.1016/j.chom.2018.06.016
164. Nabel GJ, Fauci AS. Induction of unnatural immunity: Prospects for a broadly protective universal influenza vaccine. *Nat Med*. 2010 Dec 6 [Citado em:2021 Mar 20];16(12):1389–91. Disponível em: <http://www.nature.com/naturemedicine/>. DOI:10.1038/nm1210-1389
165. Wang W, Li R, Deng Y, Lu N, Chen H, Meng X, et al. Protective efficacy of the conserved NP, PB1, and M1 proteins as immunogens in DNA- and vaccinia virus-based universal influenza A virus vaccines in mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(6):618–30. DOI:10.1128/CVI.00091-15
166. Nachbagauer R, Feser J, Naficy A, Bernstein DI, Guptill J, Walter EB, et al. A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial. *Nat Med* 2020 271. 2020 Dec 7 [Citado em:2021 Aug 15];27(1):106–14. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-1118-7> DOI:10.1038/s41591-020-1118-7
167. Laurie KL, Engelhardt OG, Wood J, Heath A, Katz JJM, Peiris M, et al. International Laboratory Comparison of Influenza Microneutralization Assays for A(H1N1)pdm09, A(H3N2), and A(H5N1) Influenza Viruses by CONSISE. Hodinka RL, editor. *Clin Vaccine Immunol*. 2015 Aug 1 [Citado em:2018 May 18];22(8):957–64. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108286> DOI:10.1128/CVI.00278-15
168. Truelove S, Zhu H, Lessler J, Riley S, Read JM, Wang S, et al. A comparison of hemagglutination inhibition and neutralization assays for characterizing immunity to seasonal influenza A. *Influenza Other Respi Viruses*. 2016 Nov 1 [Citado em:2018 May 18];10(6):518–24. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/irv.12408> DOI:10.1111/irv.12408
169. Ward BJ, Pillet S, Charland N, Trepanier S, Couillard J, Landry N. The establishment of surrogates and correlates of protection: Useful tools for the licensure of effective influenza vaccines? *Hum Vaccines Immunother*. 2018;14(3):647–56. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29252098/> DOI:10.1080/21645515.2017.1413518
170. Tannock GA, Paul JA, Herd R, Barry RD, Reid ALA, Hensley MJ, et al. Improved colorimetric assay for detecting influenza B virus neutralizing antibody responses to vaccination and infection. *J Clin Microbiol*. 1989 Mar [Citado em:2018 May

- 18];27(3):524–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2715324>
DOI:10.1128/JCM.27.3.524-528.1989
171. Grund S, Adams O, Wählisch S, Schweiger B. Comparison of hemagglutination inhibition assay, an ELISA-based micro-neutralization assay and colorimetric microneutralization assay to detect antibody responses to vaccination against influenza A H1N1 2009 virus. *J Virol Methods*. 2011 Feb [Citado em:2021 Apr 3];171(2):369–73. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21146560/>
DOI:10.1016/j.jviromet.2010.11.024
172. Castrucci MR. Factors affecting immune responses to the influenza vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Mar 4 [Citado em:2018 Nov 12];14(3):1–10. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2017.1338547>
DOI:10.1080/21645515.2017.1338547
173. Kim H-R, Lee K-K, Kwon Y-K, Kang M-S, Moon O-K, Park C-K. Comparison of serum treatments to remove nonspecific inhibitors from chicken sera for the hemagglutination inhibition test with inactivated H5N1 and H9N2 avian Influenza A virus subtypes: <http://dx.doi.org/101177/1040638712452732>. 2012 Jul 17 [Citado em:2021 Aug 15];24(5):954–8. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638712452732>
DOI:10.1177/1040638712452732
174. Matos AR, Resende PC, Miranda MD, Garcia CC, Caetano BC, Lopes JCO, et al. Susceptibility of Brazilian influenza A(H1N1)pdm09 viruses to neuraminidase inhibitors in the 2014–2016 seasons: Identification of strains bearing mutations associated with reduced inhibition profile. *Antiviral Res*. 2018 Jun 1 [Citado em:2021 May 15];154:35–43. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29601892/> DOI:10.1016/j.antiviral.2018.03.010
175. Kieninger D, Sheldon E, Lin W-YY, Yu C-JJ, Bayas JM, Gabor JJ, et al. Immunogenicity, reactogenicity and safety of an inactivated quadrivalent influenza vaccine candidate versus inactivated trivalent influenza vaccine: a phase III, randomized trial in adults aged ≥ 18 years. *BMC Infect Dis*. 2013 Jul 24 [Citado em:2018 Nov 25];13(1):343. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23883186> DOI:10.1186/1471-2334-13-343
176. Young B, Zhao X, Cook AR, Parry CM, Wilder-Smith A, I-Cheng MC. Do antibody responses to the influenza vaccine persist year-round in the elderly? *A*

- systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2017;35(2):212–21. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.013>
DOI:10.1016/j.vaccine.2016.11.013
177. Olafsdottir TA, Alexandersson KF, Sveinbjornsson G, Lapini G, Palladino L, Montomoli E, et al. Age and influenza-specific pre-vaccination antibodies strongly affect influenza vaccine responses in the icelandic population whereas disease and medication have small effects. *Front Immunol*. 2018;8(DEC). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29358933/>
DOI:10.3389/fimmu.2017.01872
178. Mondini G, Braga PE, Lopes MH, Sartori AMC, Miyaji KT, Infante V, et al. Prospective cohort studies to evaluate the safety and immunogenicity of the 2013, 2014, and 2015 seasonal influenza vaccines produced by Instituto Butantan. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018 [Citado em:2018 Nov 25];60:e37. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30066805>
DOI:10.1590/S1678-9946201860037
179. Ross TM, Lin CJ, Nowalk MP, Huang H-H, Spencer SM, Shay DK, et al. Influence of pre-existing hemagglutination inhibition titers against historical influenza strains on antibody response to inactivated trivalent influenza vaccine in adults 50–80 years of age. *Hum Vaccin Immunother*. 2014 May 8 [Citado em:2021 Mar 29];10(5):1195–203. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/hv.28313> DOI:10.4161/hv.28313
180. Seidman JC, Richard SA, Viboud C, Miller MA. Quantitative review of antibody response to inactivated seasonal influenza vaccines. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012 Jan 1 [Citado em:2021 Mar 29];6(1):52–62. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-2659.2011.00268.x> DOI:10.1111/j.1750-2659.2011.00268.x
181. Neidich SD, Green WD, Rebeles J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Noah TL, et al. Increased risk of influenza among vaccinated adults who are obese. *Int J Obes*. 2017 Sep 25 [Citado em:2018 Nov 12];41(9):1324–30. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28584297> DOI:10.1038/ijo.2017.131
182. Song JY, Lee J, Woo HJ, Wie SH, Lee JS, Kim SW, et al. Immunogenicity and safety of an egg-based inactivated quadrivalent influenza vaccine (GC3110A) versus two inactivated trivalent influenza vaccines with alternate B strains: A phase III randomized clinical trial in adults. *Hum Vaccines Immunother*. 2019 [Citado em:2021 Mar 29];15(3):710–6. Disponível em:

<https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1536589>

DOI:10.1080/21645515.2018.1536589

183. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Oct 30 [Citado em:2018 Dec 14];16(1):47–60. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro.2017.118>
DOI:10.1038/nrmicro.2017.118
184. Monto AS, Malosh RE, Petrie JG, Martin ET. The Doctrine of Original Antigenic Sin: Separating Good from Evil. *J Infect Dis.* 2017 Jun 15 [Citado em:2018 Nov 17];215(12):1782–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28398521> DOI:10.1093/infdis/jix173
185. Cobey S, Hensley SE. Immune history and influenza virus susceptibility. *Curr Opin Virol.* 2017 Feb 1 [Citado em:2021 Mar 19];22:105–11. Disponível em: </pmc/articles/PMC5467731/> DOI:10.1016/j.coviro.2016.12.004
186. Haq K, McElhaney JE. Immunosenescence: influenza vaccination and the elderly. *Curr Opin Immunol.* 2014 Aug [Citado em:2018 Oct 30];29:38–42. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769424>
DOI:10.1016/j.coi.2014.03.008
187. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *J Am Med Assoc.* 2003 Jan 8 [Citado em:2021 Mar 19];289(2):179–86. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12517228/>
DOI:10.1001/jama.289.2.179
188. Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol.* 2012 Oct [Citado em:2021 Jan 15];24(5):331–41. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22560929/#:~:text=The analysis of innate immunity,and functions of these cells.&text=These alterations can be responsible,cytotoxicity observed in the elderly.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22560929/#:~:text=The%20analysis%20of%20innate%20immunity,and%20functions%20of%20these%20cells.&text=These%20alterations%20can%20be%20responsible,cytotoxicity%20observed%20in%20the%20elderly.)
DOI:10.1016/j.smim.2012.04.008
189. McElhaney JE, Coler RN, Baldwin SL. Immunologic correlates of protection and potential role for adjuvants to improve influenza vaccines in older adults. *Expert Rev Vaccines.* 2013 Jul [Citado em:2021 Jan 15];12(7):759–66. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23885821/>
DOI:10.1586/14760584.2013.811193

190. Wagar LE, Gentleman B, Pircher H. Influenza-Specific T Cells from Older People Are Enriched in the Late Effector Subset and Their Presence Inversely Correlates with Vaccine Response. *PLoS One*. 2011 Aug 22 [Citado em:2021 Jan 15];6(8):e23698. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0023698>
DOI:10.1371/journal.pone.0023698
191. Dugan HL, Henry C, Wilson PC. Aging and influenza vaccine-induced immunity. *Cell Immunol*. 2020 Feb 1 [Citado em:2021 Mar 19];348:103998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874919304125#:~:text=Several independent studies have confirmed,to influenza vaccination %5B48%5D>. DOI:10.1016/j.cellimm.2019.103998
192. Frasca D, Diaz A, Romero M, Vazquez T, Blomberg BB. Obesity induces pro-inflammatory B cells and impairs B cell function in old mice. *Mech Ageing Dev*. 2017 Mar 1 [Citado em:2021 Feb 16];162:91–9. Disponível em: </pmc/articles/PMC5560850/> DOI:10.1016/j.mad.2017.01.004
193. Höpping AM, Mcelhaney J, Fonville JM, Powers DC, Beyer WEP, Smith DJ. The confounded effects of age and exposure history in response to influenza vaccination. *Vaccine*. 2016 [Citado em:2018 Jun 7];34:540–6. Disponível em: https://ac.els-cdn.com/S0264410X15017247/1-s2.0-S0264410X15017247-main.pdf?_tid=cd3982af-f9f0-4fd5-8a26-8946ded83e9b&acdnat=1528372809_fb7e8bf772165d1894e452933e0e9ce2
DOI:10.1016/j.vaccine.2015.11.058
194. Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: A quantitative review. *Vaccine*. 2006 Feb 20;24(8):1159–69. DOI:10.1016/j.vaccine.2005.08.105
195. Wilkinson TM, Li CKFF, Chui CSCC, Huang AKYY, Perkins M, Liebner JC, et al. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med*. 2012 Feb 29 [Citado em:2018 Jun 11];18(2):274–80. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nm.2612>
DOI:10.1038/nm.2612
196. Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Hoschler K, Adamson W, Carman W, et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat Med*. 2013 Oct 22 [Citado em:2018 Jun 7];19(10):1305–12. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nm.3350> DOI:10.1038/nm.3350
197. Berbudi A, Rahmadika N, Tjahjadi AI, Ruslami R. Type 2 Diabetes and its Impact

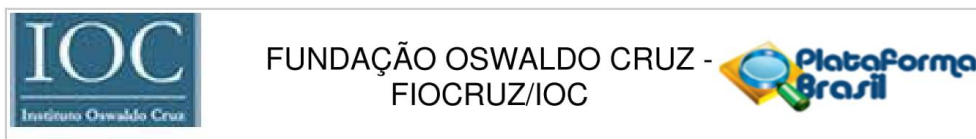
- on the Immune System. *Curr Diabetes Rev.* 2019 Oct 28 [Citado em:2021 Feb 15];16(5):442–9. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7475801/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/) DOI:10.2174/1573399815666191024085838
198. Honce R, Schultz-Cherry S. Impact of Obesity on Influenza A Virus Pathogenesis, Immune Response, and Evolution. *Front Immunol.* 2019 [Citado em:2019 Jun 28];10(MAY):1071. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6523028/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/) DOI:10.3389/fimmu.2019.01071
 199. Green WD, Beck MA. Obesity Impairs the Adaptive Immune Response to Influenza Virus. *Ann Am Thorac Soc.* 2017 Nov [Citado em:2018 Nov 17];14(Supplement_5):S406–9. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29161078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29161078/) DOI:10.1513/AnnalsATS.201706-447AW
 200. Park H-L, Shim S-H, Lee E-Y, Cho W, Park S, Jeon H-J, et al. Obesity-induced chronic inflammation is associated with the reduced efficacy of influenza vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 2014 [Citado em:2018 Nov 17];10(5):1181–6. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24614530/) DOI:10.4161/hv.28332
 201. WHO. Controlling the global obesity epidemic [Internet]. [Citado em:2021 Feb 15]. Disponível em: <https://www.who.int/activities/controlling-the-global-obesity-epidemic>
 202. Ferreira AP de S, Szwarcwald CL, Damacena GN. Prevalência e fatores associados da obesidade na população brasileira: estudo com dados aferidos da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Rev Bras Epidemiol.* 2019 Apr 1 [Citado em:2021 Feb 15];22:e190024. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2019000100420&lng=en&nrm=iso&tIng=en DOI:10.1590/1980-549720190024
 203. WHO. Obesity and overweight [Internet]. [Citado em:2021 Feb 15]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
 204. Louie JK, Acosta M, Winter K, Jean C, Gavali S, Schechter R, et al. Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2009 Nov 4 [Citado em:2021 Feb 15];302(17):1896–902. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19887665/> DOI:10.1001/jama.2009.1583
 205. CDC. People at High Risk For Flu Complications [Internet]. 2021 [Citado

- em:2021 Feb 15]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/index.htm>
206. Jain S, Chaves SS. Obesity and influenza. *Clin Infect Dis*. 2011 Sep 1 [Citado em:2021 Feb 15];53(5):422–4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21844025/> DOI:10.1093/cid/cir448
207. Fan W, Chen X fang, Shen C, Guo Z rong, Dong C. Hepatitis B vaccine response in obesity: A meta-analysis. *Vaccine*. 2016 [Citado em:2021 Feb 15];34(40):4835–41. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27546877/> DOI:10.1016/j.vaccine.2016.08.027
208. Painter SD, Ovsyannikova IG, Poland GA. The weight of obesity on the human immune response to vaccination. *Vaccine*. 2015 Aug 26 [Citado em:2021 Feb 15];33(36):4422–9. Disponível em: </pmc/articles/PMC4547886/> DOI:10.1016/j.vaccine.2015.06.101
209. Sheridan PA, Paich HA, Handy J, Karlsson EA, Hudgens MG, Sammon AB, et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *Int J Obes*. 2012 Aug [Citado em:2018 Nov 17];36(8):1072–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22024641/> DOI:10.1038/ijo.2011.208
210. Talbot HK, Coleman LA, Crimin K, Zhu Y, Rock MT, Meece J, et al. Association between obesity and vulnerability and serologic response to influenza vaccination in older adults. *Vaccine*. 2012 Jun 6 [Citado em:2021 Feb 15];30(26):3937–43. Disponível em: </pmc/articles/PMC3770527/> DOI:10.1016/j.vaccine.2012.03.071
211. Paich HA, Sheridan PA, Handy J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Hudgens MG, et al. Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 Influenza a virus. *Obesity*. 2013 Nov [Citado em:2018 Nov 17];21(11). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23512822/> DOI:10.1002/oby.20383
212. Richard C, Wadowski M, Goruk S, Cameron L, Sharma AM, Field CJ. Individuals with obesity and type 2 diabetes have additional immune dysfunction compared with obese individuals who are metabolically healthy. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2017 May 1 [Citado em:2021 Feb 16];5(1):e000379. Disponível em: <http://drc.bmj.com/> DOI:10.1136/bmjdr-2016-000379
213. Karlsson EA, Beck MA. The burden of obesity on infectious disease. *Exp Biol Med*. 2010 Dec [Citado em:2021 Feb 16];235(12):1412–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21127339/> DOI:10.1258/ebm.2010.010227

214. Kosaraju R, Guesdon W, Crouch MJ, Teague HL, Sullivan EM, Karlsson EA, et al. B Cell Activity Is Impaired in Human and Mouse Obesity and Is Responsive to an Essential Fatty Acid upon Murine Influenza Infection. *J Immunol*. 2017 Jun 15 [Citado em:2021 Feb 15];198(12):4738–52. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/198/12/4738> DOI:10.4049/jimmunol.1601031
215. Frasca D, Ferracci F, Diaz A, Romero M, Lechner S, Blomberg BB. Obesity decreases B cell responses in young and elderly individuals. *Obesity*. 2016 Mar 1 [Citado em:2021 Feb 15];24(3):615–25. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/oby.21383> DOI:10.1002/oby.21383
216. White SJ, Taylor MJ, Hurt RT, Jensen MD, Poland GA. Leptin-based adjuvants: An innovative approach to improve vaccine response. *Vaccine*. 2013 Mar 25 [Citado em:2021 Feb 15];31(13):1666–72. Disponível em: </pmc/articles/PMC3596421/> DOI:10.1016/j.vaccine.2013.01.032
217. Luzi L, Radaelli MG. Influenza and obesity: its odd relationship and the lessons for COVID-19 pandemic. *Acta Diabetol*. 2020 Jun 1 [Citado em:2021 Feb 16];57(6):759–64. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00592-020-01522-8> DOI:10.1007/s00592-020-01522-8
218. Zhang AJX, To KKW, Li C, Lau CCY, Poon VKM, Chan CCS, et al. Leptin Mediates the Pathogenesis of Severe 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Infection Associated With Cytokine Dysregulation in Mice With Diet-Induced Obesity. *J Infect Dis*. 2013 Apr 15 [Citado em:2021 Feb 16];207(8):1270–80. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jit031> DOI:10.1093/infdis/jit031
219. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2014 Mar 1 [Citado em:2021 Feb 15];1842(3):446–62. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23707515/> DOI:10.1016/j.bbadis.2013.05.017
220. CDC. Yearly Lab Work on Flu Viruses Infographic [Internet]. 2019 [Citado em:2021 Feb 14]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/resource-center/freeresources/graphics/infographic-lab-work.htm>
221. Heikkinen T, Ikonen N, Ziegler T. Impact of Influenza B Lineage-Level Mismatch Between Trivalent Seasonal Influenza Vaccines and Circulating Viruses, 1999–2012. *Clin Infect Dis*. 2014 Dec 1 [Citado em:2018 Nov 24];59(11):1519–24. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article->

- lookup/doi/10.1093/cid/ciu664 DOI:10.1093/cid/ciu664
222. Zost SJ, Parkhouse K, Gumina ME, Kim K, Perez SD, Wilson PC, et al. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Nov 21;114(47):12578–83. DOI:10.1073/pnas.1712377114
 223. Kissling E, Pozo F, Buda S, Vilcu AM, Rizzo C, Gherasim A, et al. Effectiveness of influenza vaccine against influenza A in Europe in seasons of different A(H1N1)pdm09 and the same A(H3N2) vaccine components (2016–17 and 2017–18). *Vaccine X*. 2019 Dec 10;3:100042. DOI:10.1016/j.jvacx.2019.100042
 224. Liu F, Gross FL, Jefferson SN, Holiday C, Bai Y, Wang L, et al. Age-specific effects of vaccine egg-adaptation and immune priming on A(H3N2) antibody responses following influenza vaccination. *J Clin Invest*. 2021 Apr 15 [Citado em:2021 Apr 21];131(8). Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI146138> DOI:10.1172/jci146138
 225. Kawakami C, Yamayoshi S, Akimoto M, Nakamura K, Miura H, Fujisaki S, et al. Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons. *Eurosurveillance*. 2019 [Citado em:2021 Apr 20];24(6):1800467. Disponível em: </pmc/articles/PMC6373070/> DOI:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.6.1800467
 226. Korsun N, Daniels R, Angelova S, Ermetal B, Grigorova I, Voleva S, et al. Genetic diversity of influenza A viruses circulating in Bulgaria during the 2018–2019 winter season. *J Med Microbiol*. 2020 May 27 [Citado em:2021 Jan 14];69(7):986–98. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001198;jsessionid=MPrhGlikyna8YaCMX-c1HKqS.mbslive-10-240-10-154> DOI:10.1099/JMM.0.001198
 227. P P-R. The vaccination coverage required to establish herd immunity against influenza viruses. *Prev Med (Baltim)*. 2012 Jul [Citado em:2021 Aug 15];55(1):72–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22414740/> DOI:10.1016/J.YPMED.2012.02.015
 228. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol* 2020 212. 2020 Dec 22 [Citado em:2021 Aug 15];21(2):83–100. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-00479-7> DOI:10.1038/s41577-020-00479-7

10. ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudos virológicos e imunológicos de infecções respiratórias e exantemáticas na rede de vigilância do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo

Pesquisador: Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 68118417.6.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
CNPQ
Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.590.783

Apresentação do Projeto:

Projeto aprovado pelo CEP Fiocruz/IOC sob número 2.453.470, datado de 21 de dezembro de 2017.

Justificativa da Emenda:

Vacinas contra os subtipos de Influenza mais frequentes em circulação, Influenza A H1N1, H3N2 e Influenza B, estimulam a produção de anticorpos específicos. A campanha de vacinação anual contra os vírus influenza tem como característica especial em relação a outras campanhas de vacinação a mudança na composição a cada ano e a menor duração da imunidade. Diversos estudos pelo mundo avaliam a eficácia vacinal em diferentes populações e tem demonstrado que a eficácia vacinal, medida a partir da soroconversão e soroproteção, varia de acordo com os componentes da vacina trivalente inativada. Por isso, as coleções sorológicas representativas têm sido amplamente utilizadas para investigar a emergência de novas infecções e monitorar o impacto nos programas de vacinação. Tais estudos detectam anticorpos desenvolvidos em resposta a novo vírus, antigenicamente distinto daqueles em prévia circulação. Dentro do programa nacional de vigilância epidemiológica do vírus influenza faz-se necessário o desenvolvimento de estudos sorológicos para avaliar a eficácia da vacina contra o vírus influenza

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.590.783

na população brasileira. Dessa maneira, o objetivo desse estudo é avaliar a produção de anticorpos contra os vírus influenza componentes da vacina trivalente inativada, administrada na campanha de vacinação anual em voluntários adultos que venham a ser vacinados. Os voluntários serão recrutados principalmente na Fiocruz, pois trabalhadores da área da saúde são contemplados nas campanhas de vacinação. Posteriormente esse estudo poderá ser ampliado para outras populações (idosos, crianças, imunossuprimidos), mediante nova submissão ao CEP, com objetivo de comparação da eficácia vacinal em diferentes grupos. O estudo aqui proposto soma-se ao projeto já aprovado pelo CEP, pois faz parte do escopo de vigilância epidemiológica do vírus influenza. Os resultados alcançados podem auxiliar no entendimento da duração da imunidade alcançada pela vacinação, através do acompanhamento dos voluntários quanto à presença de infecções respiratórias após a vacinação. Portanto, solicitamos a apreciação da emenda ao projeto "Estudos virológicos e imunológicos de infecções respiratórias e exantemáticas na rede de vigilância do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo" para que essas informações sejam adquiridas ainda esse ano, para o fortalecimento da rede de vigilância do vírus influenza.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é avaliar a produção de anticorpos contra os vírus influenza componentes da vacina trivalente inativada, administrada na campanha de vacinação anual em voluntários adultos que venham a ser vacinados.

Os voluntários serão recrutados principalmente na Fiocruz, pois trabalhadores da área da saúde são contemplados nas campanhas de vacinação. Posteriormente esse estudo poderá ser ampliado para outras populações (idosos, crianças, imunossuprimidos), mediante nova submissão ao CEP, com objetivo de comparação da eficácia vacinal em diferentes grupos. O estudo aqui proposto soma-se ao projeto já aprovado pelo CEP, pois faz parte do escopo de vigilância epidemiológica do vírus influenza. Os resultados alcançados podem auxiliar no entendimento da duração da imunidade alcançada pela vacinação, através do acompanhamento dos voluntários quanto à presença de infecções respiratórias após a vacinação.

Em caso de amostras provenientes da rede de vigilância epidemiológica dos vírus influenza, sarampo, rubéola, ou demais vírus respiratórios, o TCLE é dispensado devido ao caráter de vigilância na coleta da amostra. Em casos de fechamento de diagnóstico sob solicitação médica, haverá o preenchimento do TCLE (anexo I), TALE (anexo III) ou TCLE para responsáveis de menores de idade (anexo IV). No caso do estudo de eficácia vacinal, será preenchido o TCLE respectivo (anexo V) antes da coleta das amostras.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.590.783

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já avaliados na ocasião da aprovação do projeto sob número 2.453.470, datado de 21 de dezembro de 2017.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda está clara em seus propósitos e devidamente fundamentada, e tem relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram encaminhados ao CEP e aprovados.

Recomendações:

De acordo com a emenda o objetivo desse estudo é avaliar a produção de anticorpos contra os vírus influenza componentes da vacina trivalente inativada, administrada na campanha de vacinação anual em voluntários adultos que venham a ser vacinados. Os voluntários serão recrutados principalmente na Fiocruz, pois trabalhadores da área da saúde são contemplados nas campanhas de vacinação. Será necessária aplicação do TCLE para esses voluntário que participarão do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 237ª Reunião Ordinária, realizada em 10.04.2018, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação da emenda ao projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1104907_É1.pdf	03/04/2018 19:31:00		Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.590.783

Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2453470.pdf	03/04/2018 19:05:16	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Cronograma	cronogramacomvacina.pdf	03/04/2018 19:04:09	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexosabril18.pdf	03/04/2018 19:02:34	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoLVRScomvacinaabril18comanexos.pdf	03/04/2018 19:01:54	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoCEPLVRScomvacinaabril18marcado.pdf	03/04/2018 19:01:04	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_resposta_22_11_17.pdf	30/11/2017 11:30:22	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração do Patrocinador	Financiamentos_LVRS_completo_atual_Set_17.pdf	05/09/2017 10:00:30	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Orçamento	orcamento_detalhado.pdf	05/09/2017 10:00:15	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_Sigilo_LVRS_assinado.pdf	03/05/2017 21:00:30	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regimento_Biorrepositorio_LVRS_assinado.pdf	03/05/2017 20:56:44	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao_assinada.pdf	03/05/2017 20:53:49	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_LVRS.pdf	03/05/2017 20:51:36	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.590.783

RIO DE JANEIRO, 10 de Abril de 2018

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Página 05 de 05

11.1 APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Gostaríamos de solicitar sua participação na pesquisa intitulada:

**Estudos virológicos e imunológicos de infecções respiratórias e exantemáticas
na rede de vigilância do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo –
Avaliação da eficácia vacinal contra o Vírus Influenza**

Justificativa e objetivos: Vacinas contra os subtipos de Influenza mais frequentes em circulação, Influenza A H1N1, H3N2 e Influenza B, estimulam a produção de anticorpos específicos. Coleções sorológicas representativas têm sido amplamente utilizadas para investigar a emergência de novas infecções e monitorar o impacto nos programas de vacinação. Tais estudos detectam anticorpos desenvolvidos em resposta a novo vírus, antígenicamente distinto daqueles em prévia circulação. O objetivo desse estudo é avaliar a produção de anticorpos contra os vírus influenza componentes da vacina trivalente inativada, administrada na campanha de vacinação do ano corrente.

Proposta do Estudo: Este estudo será desenvolvido para que possamos estudar a soroconversão atingida pela vacinação anual contra os vírus influenza. Para isso, a sua participação é muito importante, e ela se daria da seguinte forma:

Explicação dos Procedimentos

- **Entrevista:** Caso você decida participar neste estudo, nós iremos, em primeiro lugar, fazer uma entrevista com você. Nessa entrevista, nós faremos perguntas sobre seu histórico de infecções respiratórias nos

Versão 1.0 - 02/04/2018

últimos seis meses e de vacinações prévias contra o vírus influenza. Também perguntaremos sobre suas condições sociais e sanitárias, sobre a sua saúde e uso de medicamentos. Registraremos também o seu contato telefônico para as demais coletas. As respostas que você nos der serão utilizadas exclusivamente para fins científicos neste estudo. A entrevista levará em torno de 15 minutos.

- **Coleta de amostras de sangue:** Após a entrevista, vamos coletar uma amostra de cerca de 12mL de sangue via punção periférica da veia do antebraço utilizando material estéril e identificado com a data e as iniciais do seu nome. De posse do comprovante da vacinação, solicitaremos um retorno ao laboratório após 21 dias da vacinação, para que uma segunda amostra de sangue seja coletada da mesma maneira. Após seis meses, faremos um novo contato para uma terceira coleta de sangue. Todo o procedimento será feito por profissional treinado e experiente. Esse procedimento é simples e dura menos de 5 minutos.
- **Coleta de amostra respiratória:** Em caso de, dentro de um ano da data da vacinação, ocorrer o aparecimento de febre de início súbito, acompanhada de tosse e/ou dor de garganta e pelo menos um dos sintomas: dores musculares, de cabeça, nas articulações, falta de ar, conjuntivite, mal-estar geral e perda do apetite, você poderá procurar o laboratório para coleta de uma amostra respiratória para investigação da presença de vírus influenza. Iremos então coletar amostras de secreção respiratória pelo seu nariz e boca. Isto significa que um cotonete longo será inserido em cada uma de suas narinas e um cotonete será introduzido pela boca, para coleta de material. Esse procedimento é simples e dura menos de 1 minuto. Esse procedimento não causa dor e não oferece riscos a sua saúde. Em alguns casos, esse procedimento pode causar um pouco de incômodo e pode

causar ânsia de vômito. Porém isso não acontece com frequência, pois a coleta é feita por um profissional treinado e experiente. Em casos muito raros, o procedimento pode causar um pequeno sangramento nasal, que acaba sozinho e muito rapidamente.

Benefícios: Este estudo não gera nenhum benefício imediato aos participantes, mas pode ajudar a entender melhor a resposta à vacinação contra os vírus influenza e, futuramente, pode contribuir para o desenvolvimento de uma melhor vacina.

Desconfortos e Riscos: De alguma maneira, riscos psicológico, moral, cultural ou espirituais podem existir de forma imediata ou tardia, por isso você pode em qualquer momento entrar em contato com o responsável pela pesquisa para resolução dessas questões. A coleta das amostras de sangue pode causar um pouco de dor, hematoma transitório ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. A coleta da amostra respiratória pode causar um pouco de incômodo e pequena ânsia de vômito, mas ela não oferece risco à sua saúde física. Os devidos cuidados serão tomados para minimizar esses riscos pelo profissional que realiza a coleta. Você pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados.

Participação voluntária no estudo: Gostaríamos de esclarecer que a sua participação é totalmente voluntária. Você pode se recusar a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa.

Confidencialidade: Esclarecemos ainda que as informações que você nos der serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa, e serão tratadas com o mais

absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Seu nome não será mencionado em publicações ou relatórios produzidos para este estudo. Entretanto o seu formulário de entrevista poderá ser consultado pelos profissionais envolvidos no estudo.

Armazenamento de amostras biológicas: As amostras de células do sangue e soro serão armazenadas no biorepositório do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Marilda Siqueira, pelo tempo de duração desta pesquisa.

Custos de Participação: A participação no estudo não acarretará nenhum custo para você. A participação no estudo também não gera nenhuma compensação financeira.

Consentimento para a Participação no Estudo:

A sua assinatura significa que você leu este formulário, ou que ele foi lido para você, que você recebeu todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, que você está satisfeito com as informações que foram dadas e que você concordou em participar do estudo.

Eu, _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O profissional de pesquisa deste projeto _____ me certificou de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Receberei uma via de igual valor assinada e rubricada por mim e pelo pesquisador, para o meu registro.

Em caso de dúvidas sobre questões éticas da participação na pesquisa, como regras de participação, deveres do pesquisador, direitos do participante, reclamações ou

denúncias, eu poderei contatar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) do Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, no telefone (21) 3882-9011, pelo e-mail cepfiocruz@ioc.fiocruz, ou no endereço à Avenida Brasil, 4036, sala 705 (Expansão), Manguinhos, Rio de Janeiro/RJ, CEP 21.040-360. O CEP visa defender os interesses dos participantes de uma pesquisa e é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Em caso de dúvidas, reclamações e notificações de qualquer natureza relacionadas à pesquisa, poderei contatar a pesquisadora responsável:

- Dra. Marilda Siqueira, coordenadora geral do estudo, nos telefones (21) 2562-1778 ou (21) 2562-1754, no e-mail mmsiq@ioc.fiocruz.br, ou no endereço à Av. Brasil, 4365, Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP), Sala B106, Manguinhos, Rio de Janeiro/RJ, CEP 21040-360.

Declaro que li este formulário de consentimento, todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em participar deste estudo fornecendo meu material biológico (sangue e amostra respiratória) para depósito, armazenamento e utilização para essa pesquisa, assinando meu nome abaixo e rubricando todas as folhas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

11.2 APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo

ENTREVISTA

PROJETO: Avaliação da eficácia vacinal contra o Vírus Influenza

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/_____ Telefone: (___) _____

Bairro/Cidade: _____

Laboratório: _____

Já tomou a vacina contra a gripe em anos anteriores?

Sim Não Quando? _____

Faz uso de algum medicamento?

Sim Não Qual? _____

Apresenta alguma dessas condições?

Gestante Sim Não

Trimestre:

Pneumopatia Sim Não

Hipertensão Sim Não

Pneumonia Sim Não

Tabagismo Sim Não

Câncer Sim Não

Leucemia Sim Não

Alergia Sim Não

A quê?

Peso _____ kg

Altura _____

Cardiopatia Sim Não

Imunodepressão Sim Não

Doença Hepática Sim Não

Doença Neurológica Sim Não

Doença Renal Sim Não

Diabetes Sim Não

Doença metabólica Sim Não

HIV Sim Não

Outras doenças Sim Não

Qual?

Apresentou nos últimos meses febre de início súbito, acompanhada de tosse e/ou dor de garganta e pelo menos um dos sintomas: dores musculares, de cabeça, nas articulações, falta de ar, conjuntivite, mal-estar geral e perda do apetite?

Quando? ___/___/_____ Teve diagnóstico? _____

Assinatura do Participante

Data