

TP2 Bioestadística

Irisarri - Landa

## TP 2: Lectura Crítica de un Ensayo Clínico

**Alumnos:** Malena Irisarri, Román Landa

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE ROSARIO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ECONÓMICAS Y ESTADÍSTICA



UNR

Rosario, Argentina

6 de Mayo de 2025

## Autor principal y afiliación

El artículo titulado “Safety and immunogenicity of a single-shot live-attenuated chikungunya vaccine: a double-blind, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial” fue escrito por la compañía de biotecnología Valneva Austria, ubicada en Vienna, Austria, en colaboración con el instituto de investigaciones Assign Data Management and Biostatistics, Innsbruck, Austria.

## Revista y referencia bibliográfica

El artículo fue publicado en la revista The Lancet en el año 2023 (DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00641-4)

## Información metodológica

### Tipo de estudio

El estudio fue diseñado como un ensayo clínico aleatorizado, controlado con placebo y de grupos paralelos. Esto significa que los participantes fueron asignados al azar a dos grupos, algunos recibieron la vacuna experimental (VLA1553) y otros un placebo. Luego se los siguió a lo largo del tiempo para comparar estos dos grupos independientes.

### Fase del estudio

Se trata de un ensayo en fase 3, es decir, un ensayo con el objetivo principal de evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de la vacuna en una población más amplia, después de haber superado las fases previas de desarrollo clínico.

### Hipótesis estadística

La hipótesis principal del estudio se basó en la superioridad de la vacuna en términos de inmunogenicidad, no en equivalencia. El criterio principal fue la proporción de participantes que alcanzaron niveles seroprotectores de anticuerpos (definidos como  $\mu PRNT_{50}$  mayor o igual a 150) a los 28 días después de la vacunación.

### Enmascaramiento

El estudio se realizó bajo un esquema de doble ciego, ni los participantes ni los investigadores que realizaban las evaluaciones sabían quién recibió la vacuna y quién recibió el placebo. Unidad de aleatorización La aleatorización se realizó a nivel individual en una proporción 3 a 1, es decir, tres participantes recibieron la vacuna por cada uno que recibió placebo. La aleatorización se realizó mediante un sistema de respuesta interactiva o sistema interactivo web (IXRS). Cada participante recibió un número de selección único a través del IXRS en la visita de selección, y fue asignado al tratamiento en la visita 1 (día 1). El personal del estudio no enmascarado preparó la vacuna de acuerdo a la información de IXRS, y las jeringas se enmascararon para ocultar el contenido antes de la administración.

## **Población**

Los participantes elegibles eran voluntarios sanos de 18 años o más. Se excluyeron aquellos con antecedentes de infección por virus de chikungunya, artritis o artralgia inmunomediada o crónica, defectos conocidos o sospechados del sistema inmunológico. Los participantes fueron estratificados por edad (estrato A: 18–64 años; estrato B: 65 años o más). Entre los criterios de exclusión se encontraban haber recibido una vacuna inactivada dentro de las 2 semanas anteriores o una vacuna viva dentro de las 4 semanas previas a la vacunación con VLA1553. El ensayo fue multicéntrico, llevado a cabo en 43 centros de Estados Unidos.

## **Aprobaciones regulatorias y consentimiento informado**

El estudio fue aprobado por el Chesapeake IRB (número de aprobación Pro00045587, fechado el 6 de agosto de 2020). Todos los participantes proporcionaron consentimiento informado por escrito antes de realizar procedimientos del estudio.

## **Registro del protocolo**

El ensayo fue registrado previamente en ClinicalTrials.gov con el identificador NCT04546724.

## **Tratamiento estadístico**

### **Tamaño de muestra**

El tamaño muestral fue calculado para detectar al menos un evento poco frecuente (incidencia 1/1000) con 95% de probabilidad. El subconjunto de inmunogenicidad de 375 vacunados con VLA1553 se calculó para garantizar suficiente poder estadístico con un test binomial exacto unilateral (significancia del 2,5%) contra un umbral de no aceptación del 70% en la proporción de seroprotección. Se asumió una tasa de seroprotección del 80% basándose en resultados previos. Se necesitaban 225 vacunados con VLA1553 considerando una tasa de abandono del 10%. Finalmente, se reclutaron 501 participantes para equilibrar ambos estratos de edad y para seguimiento a largo plazo.

### **Metodología Estadística**

El análisis primario comparó la proporción observada de seroprotección a los 28 días contra el umbral del 70%, aplicando un test binomial exacto y calculando IC del 95% (Clopper-Pearson). También se compararon los grupos de tratamiento mediante test exacto de Fisher para seroprotección y seroconversión. El título medio geométrico (GMT) de anticuerpos se comparó mediante un modelo de ANCOVA incluyendo grupo de tratamiento y estrato de edad como factores. Todos los participantes vacunados en el día 1 se incluyeron en la población de seguridad. Para inmunogenicidad, se incluyeron los vacunados seronegativos basales del subconjunto de inmunogenicidad, sin violaciones mayores de protocolo. También se realizaron análisis de sensibilidad.

### **Procedimiento**

El análisis principal se realizó por protocolo, es decir, se excluyó a los participantes que no completaron estrictamente el protocolo. Incluyó a 362 participantes, 266 en el grupo de la vacuna y 96 en el grupo placebo. Además, se excluyeron los participantes que abandonaron el estudio antes de su finalización. Los participantes recibieron una única vacunación intramuscular en la región deltoidea el día 1. Se realizaron visitas de seguimiento para evaluar seguridad e inmunogenicidad a los 7, 28, 84 (3 meses) y 179 días (6 meses) tras la vacunación. Se extrajo sangre para evaluar química clínica, panel de coagulación y hematología (seguridad),

y ensayos de neutralización (inmunogenicidad). Las muestras de laboratorio de seguridad se analizaron al inicio para todos los participantes, y para el subconjunto de inmunogenicidad también en visitas posteriores. Los participantes fueron monitoreados para síntomas compatibles con un evento agudo relacionado al chikungunya (fiebre súbita con artralgia, dolor de espalda, síntomas neurológicos, cardíacos, rash o edema) hasta 21 días después de la vacunación. Síntomas que duraban 3 días o más se monitorearon como eventos adversos de especial interés (AESI). Los eventos que cumplían criterios de gravedad se reportaron como eventos adversos graves (SAE). Un Comité Independiente de Monitoreo de Datos de Seguridad (DSMB) revisó regularmente la información de seguridad acumulada hasta que el último participante completó la visita final (día 180). La respuesta inmune se midió mediante anticuerpos neutralizantes específicos para el virus chikungunya utilizando un ensayo de neutralización de reducción de placa con micropozo (uPRNT) validado. Se definió seroconversión para participantes negativos al inicio como un  $\mu PRNT50 \geq 20$ , y para participantes positivos como un aumento de al menos 4 veces respecto al valor basal. La seroprotección se definió como un  $\mu PRNT50 \geq 150$ . Las muestras negativas ( $\mu PRNT50 < 20$ ) se imputaron como 10.

### Resultados principales

En términos de inmunogenicidad, el 98.9% (263 de 266) de los participantes que recibieron la vacuna alcanzaron niveles seroprotectores de anticuerpos a los 28 días, con un intervalo de confianza del 95% entre 96.7% y 99.8%. No se observó una diferencia significativa en la tasa de seroprotección entre los pacientes de 18 a 64 años (204 [98,6%] de 207 participantes) y los de 65 años o más (59 [100%] de 59 participantes). Los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus del chikungunya mostraron un aumento de 471 veces en comparación con el valor basal en el día 29, y se mantuvieron con un aumento de 107 veces en el día 180 respecto al valor basal.

Hasta el día 180 después de la vacunación, los eventos adversos se reportaron con mayor frecuencia en el grupo de VLA1553 que en el grupo placebo (1926 [62,5%] de 3082 vs 463 [44,8%] de 1033 participantes;  $p < 0,0001$ ). Un total de 1575 (51,1%) de 3082 participantes del grupo VLA1553 y 322 (31,2%) de 1033 participantes del grupo placebo experimentaron al menos un evento adverso considerado relacionado con la vacunación ( $p < 0,0001$ ). En cuanto a seguridad, se reportaron eventos adversos graves en el 1.5% de los vacunados frente al 0.8% en el grupo placebo. Solo dos de estos eventos se consideraron relacionados con la vacuna (un caso de mialgia leve y otro de SIADH), ambos resueltos sin secuelas.

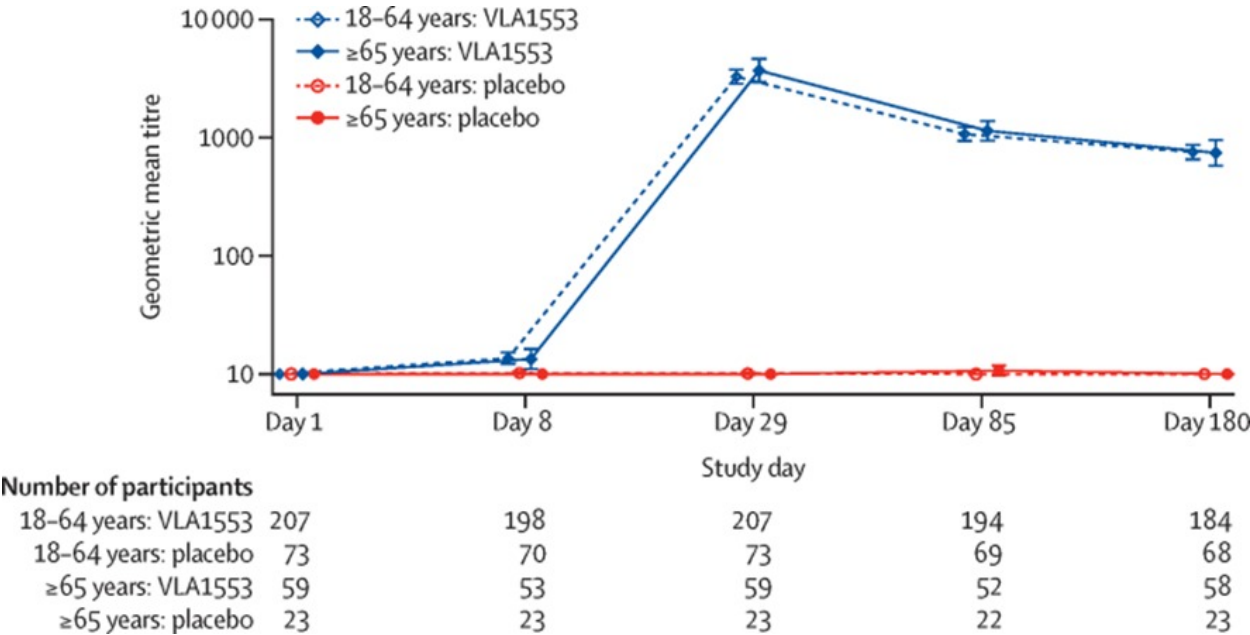


Figure 1: resultados

## Validación externa e interna

Este estudio tuvo varias limitaciones. Primero, el estudio no se realizó en una región endémica, por lo que se desconoce el efecto de la inmunidad preexistente sobre la inmunogenicidad de VLA1553, así como el perfil completo de seguridad en esta población. Segundo, la vacuna se basa en una plataforma de virus vivo atenuado y, por tanto, probablemente no sea utilizable en personas con inmunosupresión severa; cualquier uso durante el embarazo deberá sopesar los riesgos graves para los recién nacidos por la transmisión perinatal del chikunguña frente a la práctica general de evitar o contraindicar las vacunas de virus vivo atenuado durante el embarazo. Tanto las personas embarazadas como las gravemente inmunocomprometidas fueron excluidas del ensayo como medida de precaución. Tercero, la inmunogenicidad se determinó en un subconjunto pequeño de participantes. Sin embargo, la población por protocolo analizada para los desenlaces de inmunogenicidad fue representativa de toda la población del estudio al comparar los datos demográficos. Cuarto, para ser altamente eficaz en el control de una enfermedad endémica, una vacuna contra el chikunguña también debe administrarse a niños

El estudio tiene validez interna sólida porque cumple con las siguientes consideraciones que deben tener los ensayos clínicos:

- Correcta aleatorización
- Enmascaramiento (en este caso doble ciego)
- Cumple con las buenas prácticas médicas
- Los pacientes firman el consentimiento informado
- Las definiciones de los eventos están bien explícitas
- Existe un comité de ética

Pero, por lo mencionado anteriormente la validez externa es criticable, dado que los resultados son aplicables a poblaciones sanas. Se necesitan más datos en contextos endémicos y grupos vulnerables. Para una evaluación definitiva, serían ideales estudios de fase 4 en condiciones reales.

## Propuesta nuevo ensayo

### Cálculo del tamaño de muestra

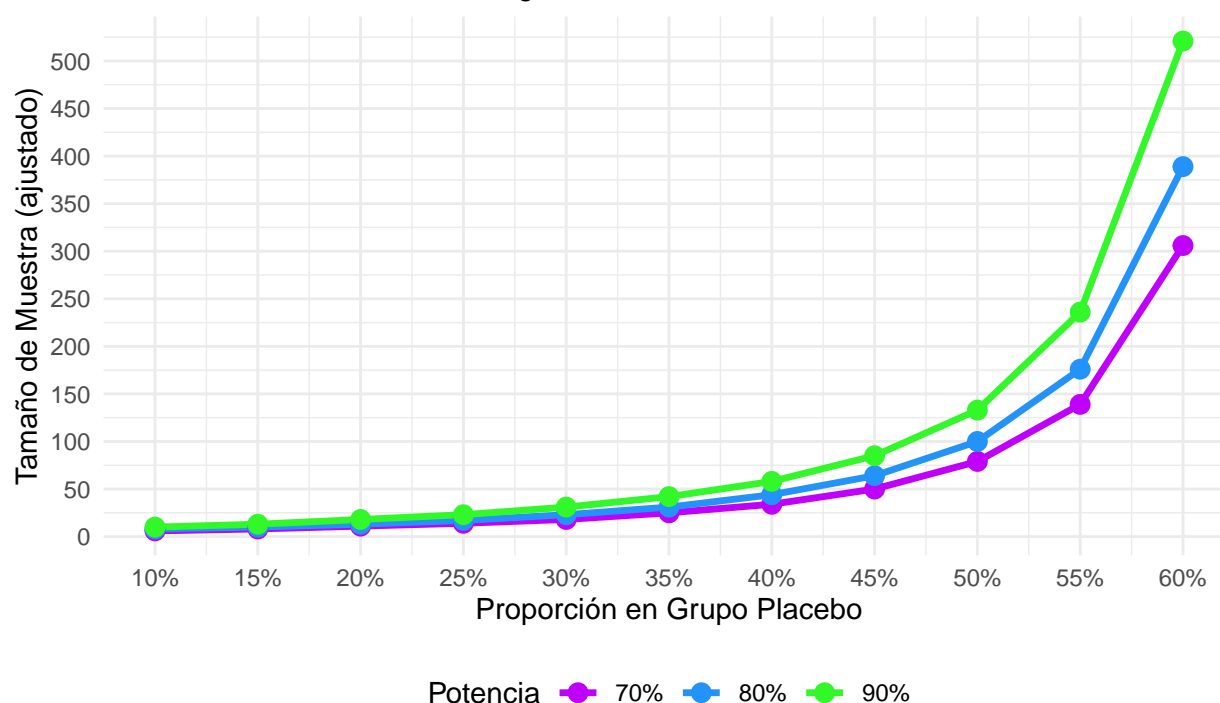
Se definen a continuación los valores utilizados en el artículo:

- Nivel de significación:  $\alpha = 0.05$
- Proporción de seroprotección en el grupo tratado con la vacuna:  $p_{tratamiento} = 0.7$
- Tasa de abandono:  $R_0 = 0.1$

Teniendo en cuenta estos valores se calcula el tamaño de muestra para el grupo placebo para distintos valores de la proporción de seroprotección en el grupo placebo y distintas potencias:

## Tamaño de Muestra Requerido por Grupo

Proporción en tratamiento fija en 70%  
Nivel de significancia = 5%, Pérdidas = 10%



Seleccionamos una potencia del 90% y una proporción para el grupo placebo de 0.4. La elección de una potencia del 90% se debe a que se busca una alta probabilidad de detectar una diferencia real entre grupos, en caso de que exista, lo cual es especialmente relevante en estudios donde la seroprotección tiene importancia clínica. Por otro lado, la proporción de seroprotección del 40% en el grupo placebo se basa en la expectativa de una respuesta inmunológica baja en ausencia de intervención (vacuna), lo que permite detectar una diferencia clínicamente significativa frente al grupo tratado. Con esta combinación de parámetros se obtiene un tamaño de muestra de 58 pacientes para el grupo placebo y  $58 * 3 = 174$  para el grupo tratamiento, considerando una asignación (1:3). En total, se deberán reclutar 232 pacientes.

Si bien en el ensayo clínico plantea más análisis y deberíamos calcular el tamaño de muestra también para los otros, no tenemos los datos suficientes para hacerlo. Además el objetivo principal del estudio es el análisis de la seroprotección por lo que decidimos presentar los tamaños de muestra solo para este propósito.

## Aleatorización

Una vez calculado el tamaño de muestra se necesita el patrón de aleatorización para llevar adelante el ensayo clínico.

```
library(blockrand)
library(randomizeR)
library(writexl)
imprimir_excel= FALSE
set.seed(1889)

generar_aleatorizacion_estratificada <- function(n_placebo, n_tratamiento, estratos, tratamientos, n_cer
  n_total_por_estrato <- n_placebo + n_tratamiento
```

```

resultados_conteo <- list()
secuencias_por_estrato <- list()

for (estrato in estratos) {
  conteo_estrato <- data.frame(
    Estrato = estrato,
    Placebo = 0,
    Tratamiento = 0
  )
  secuencia_lista_completa <- character(0)

  for (i in 1:n_centros) {
    # Definir los parámetros para la aleatorización por bloques
    par_adaptado <- rpbrPar(
      N = n_total_por_estrato,
      rb = c(4),
      K = length(tratamientos),
      ratio = c(1, 3),
      groups = tratamientos,
      filledBlock = FALSE
    )

    # Generar la secuencia de aleatorización
    set.seed(2850 + i + which(estratos == estrato) * 10)
    secuencia_objeto <- genSeq(par_adaptado, 1)
    secuencia_lista <- getRandList(secuencia_objeto)
    secuencia_lista_completa <- c(secuencia_lista_completa, secuencia_lista)

    # Contar las ocurrencias de cada tratamiento
    conteo_placebo <- sum(secuencia_lista == "Placebo")
    conteo_tratamiento <- sum(secuencia_lista == "Tratamiento")

    # Acumular los conteos por estrato
    conteo_estrato$Placebo <- conteo_estrato$Placebo + conteo_placebo
    conteo_estrato$Tratamiento <- conteo_estrato$Tratamiento + conteo_tratamiento
  }
  resultados_conteo[[estrato]] <- conteo_estrato

  # Crear el data frame de la secuencia para este estrato
  secuencia_df_estrato <- data.frame(Secuencia = secuencia_lista_completa)
  colnames(secuencia_df_estrato) <- paste0(estrato, "-", 1:ncol(secuencia_df_estrato)) # Esto no es c

  # La estructura correcta sería una fila por estrato con la secuencia como valores
  secuencias_por_estrato[[estrato]] <- data.frame(t(secuencia_lista_completa))
  colnames(secuencias_por_estrato[[estrato]]) <- paste0("Paciente", 1:length(secuencia_lista_completa))
}

# Combinar los resultados del conteo
tabla_distribucion <- do.call(rbind, resultados_conteo)

# Combinar las secuencias por estrato en un solo data frame
secuencia_aleatorizacion_final <- do.call(rbind, secuencias_por_estrato)
secuencia_aleatorizacion_final$Estrato <- names(secuencias_por_estrato) # Añadir la columna de estrato

```

```

# Reorganizar las columnas para que el estrato sea la primera
secuencia_aleatorizacion_final <- secuencia_aleatorizacion_final[, c("Estrato", setdiff(names(secuencia_aleatorizacion_final), "Estrato"))]

# Devolver una lista con la tabla y la secuencia
return(list(tabla_distribucion = tabla_distribucion, secuencia_aleatorizacion = secuencia_aleatorizacion_final))
}

```

```

## Parámetros del estudio
n_placebo <- 58 # Tamaño grupo placebo
n_tratamiento <- 58 * 3 # Tamaño grupo tratamiento (3:1)
n_total <- n_placebo + n_tratamiento
estratos <- c("18-64", "+65") # Dos estratos de edad
tratamientos <- c("Placebo", "Tratamiento")
n_centros <- 1

# Ejecutar la función
resultados_aleatorizacion <- generar_aleatorizacion_estratificada(
  n_placebo = n_placebo,
  n_tratamiento = n_tratamiento,
  estratos = estratos,
  tratamientos = tratamientos,
  n_centros = n_centros
)

# # Imprimir la tabla de distribución
# print("Tabla de Distribución por Tratamiento y Grupo Etario:")
# print(resultados_aleatorizacion$tabla_distribucion)
#
# # Imprimir la secuencia de aleatorización
# print("\nSecuencia de Aleatorización Completa:")
# print(resultados_aleatorizacion$secuencia_aleatorizacion)

if(imprimir_excel)
  # Opcional: Guardar la secuencia en un archivo Excel
  write_xlsx(resultados_aleatorizacion$secuencia_aleatorizacion,
    path = "secuencia_aleatorizacion.xlsx")

  # Opcional: Guardar la tabla de distribución en un archivo Excel
  write_xlsx(resultados_aleatorizacion$tabla_distribucion,
    path = "tabla_distribucion.xlsx")

```

## Análisis estadístico

Ya que el tamaño de muestra es lo suficientemente grande, se puede realizar la aproximación Normal de la Binomial para realizar un test Z. En este se desea comparar dos proporciones,  $p_1$  y  $p_2$ , observadas en dos grupos distintos de tamaños  $n_1$  y  $n_2$ , respectivamente.

- $H_0) p_{tratamiento} = p_{placebo}$
- $H_1) p_{tratamiento} > p_{placebo}$



**Estadística:**

$$Z = \frac{p_1 - p_2}{EED} = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{\frac{p_1(1-p_1)}{n_1} + \frac{p_2(1-p_2)}{n_2}}}$$

El estadístico Z sigue una distribución Normal (0, 1).

**Regla de decisión:**

Rechazar  $H_0$  si  $p - value < \alpha$

La ventaja de este test es que se puede calcular un intervalo de confianza  $(p_1 - p_2)Z * EED$  donde EED corresponde al error estándar de la diferencia de proporciones como se calcula en la fórmula anterior.