

# TESIS DOCTORAL

## SEGURIDAD DE LA VACUNA DE LA GRIPE EN EL RECEPTOR DE TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

Ángel Bulnes Ramos

Licenciado en Biología

Directoras de la Tesis

Dra. Pilar Pérez Romero, Dra. Elisa Cordero Matía.

Tutor de la Tesis

Dr. Jerónimo Pachón Díaz

"Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica"

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla







Pilar Pérez Romero, investigadora posdoctoral "Nicolás Monardes" de la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena, Elisa Cordero Matía, Facultativo Especialista de Área de la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena, como Directoras de la Tesis Doctoral, y Jerónimo Pachón Díaz, Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla y Jefe de Servicios de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen del Rocío, como Tutor de la Tesis Doctoral,

#### **CERTIFICAN**

Que el trabajo de investigación que lleva por título "Seguridad de la vacuna de la gripe en el receptor de trasplante de órgano sólido" ha sido realizado bajo su dirección y tutela, respectivamente, por el Licenciado Don Ángel Bulnes Ramos, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para los efectos oportunos, expiden la presente en Sevilla a 7 de Octubre de 2016.

Mª Pilar Pérez Romero  
Directora

Mª Elisa Cordero Matía  
Directora

Jerónimo Pachón Díaz  
Tutor



Por fin el esperado momento, y al final del camino, es fundamental agradecerlo a todas las personas que en mayor o menor medida lo han hecho posible.

En primer lugar a Jerónimo Pachón, que me ha permitido formar parte de este grupo de investigación durante todo este tiempo. Y como no a mis directoras de tesis, Elisa y Pilar, por ayudarme a crecer profesionalmente. Especialmente a ésta última, que me ha ayudado a formarme como investigador, dándome la oportunidad cuando pensaba que todos mis trenes ya habían pasado. Espero haber estado a la altura.

Me gustaría agradecer a mi familia, mis padres, mis hermanos, mi hermana, mi sobrino y mi perro. Gracias por ayudarme y estar siempre ahí, soy lo que soy gracias a vosotros.

Gracias a Marta, la mujer de mi vida, por estar siempre a mi lado, por tu apoyo y comprensión, por animarme y hacerme sentir afortunado cada día.

Por supuesto todo este trabajo no hubiese sido posible sin todos y cada uno de los compañeros del laboratorio, todos ellos han aportado algún granito de arena en esta tesis. Javi, Menia y Younes, por sus consejos de Post-Doc. El brillante Mike, al que tengo que confesar que también he imitado en más de una ocasión.

Gracias al consejo de sabias del 217: Mery, de las mejores personas con las que me haya cruzado nunca; Malu con su risa y expresiones contagiosas y Marina por supuesto, siempre dispuesta a ayudar y además recompensarte con un sincero abrazo. Patri, siempre servicial y Ani, la última gran incorporación

A "la gente de bacterias": Rafa, bohemio y sincero, Rachel por su alegría, la risueña Marta, Tania sin quien todo esto no hubiese sido lo mismo, sin su alegría y "sandungueo", la constante Gema y Andrea, que en poco tiempo se ha convertido en una más.

Al "Adenogrupo", No me voy a olvidar de los fantásticos ratos que hemos pasado delante de "una marinera", los mejores. Con el ocurrente Josan, que siempre tiene la respuesta perfecta para todo, mi compañero y gran amigo Pablo y Ana Serna, que no se imagina lo importante que es para mí en el grupo, por su ayuda, por su visión particular de la ciencia y sus consejos más allá del trabajo.

A los compañeros del 208, a Bea por los increíbles ratos en cultivos a deshoras y a Damián por todos los buenos momentos que hemos pasado, gracias al sabio Juan, y a

Tere, sin su ayuda con la estadística, este trabajo hubiese sido mucho más imposible. Cecilia por animarme siempre y Ale, que es mejor cuanto más lo conoces. Y por supuesto Pili, mi amiga, mi compañera de fatigas y alegrías, hemos formado un equipo perfecto dentro y fuera del laboratorio, lástima que tenga que acabarse. Solo espero que esta amistad sea para siempre y que nuestros caminos se crucen muchas veces en la vida.

A todos los alumnos de prácticas, seguro que yo he aprendido más cosas de vosotros que vosotros de mí, Alba, Carmen, Antonio, Venancio y Pejenaute.

En un mundo perfecto, estaría siempre trabajando al lado de todos y cada uno de vosotros. Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado en estos años.

Y gracias a todas las personas que, no han tenido la suerte de dedicarse a la ciencia, y sin saberlo han formado parte de ella empujándome en el camino, desde J. Antonio Arenas, quien me inculcó la pasión por la Biología, hasta mis amigos de siempre, Ana, Carlos, Sara, Kike, Ana O., Santi, Javi, David, a todos, gracias por estar siempre ahí.

*"La fórmula del éxito es un viaje de obstáculos  
donde la inteligencia no camina sola.  
El esfuerzo es su mejor aliado".*

R. Ayerbe



## FINANCIACIÓN

- Estudio multicéntrico de la infección por el virus de la influenza A(H1N1)v en pacientes receptores de trasplante de órgano sólido en España. Instituto de Salud Carlos III - Investigación Comisionada. Expediente: GR09/0041
- Influencia de la vacunación gripal en la producción de anticuerpos donante-específicos anti-HLA y su posible implicación en eventos de rechazo en pacientes con trasplante de órgano sólido. Consejería de Salud y Bienestar Expediente: PI0119-2012. Red Española de Investigación en Patología Infecciosa. Instituto de Salud Carlos III Expediente: RD12/0015/0001.
- Ensayo clínico prospectivo aleatorizado comparativo de la eficacia y seguridad de una dosis de vacuna estacional respecto a dos dosis de vacunas como prevención de la gripe en receptores de trasplante de órgano sólido. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad – Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios. Expediente: EC11-456.
- Red Española de Investigación en Patología Infecciosa. Instituto de Salud Carlos III Expediente: RD12/0015/0001.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 Biología del virus influenza.	19
1.2 Variabilidad genética del virus de la gripe.	22
1.2.1 Deriva génica.	22
1.2.2 Cambio antigénico.	22
1.3 Respuesta inmune frente al virus influenza.	25
1.3.1 Respuesta innata inespecífica.	25
1.3.2 Respuesta celular.	25
1.3.3 Respuesta humoral.	26
1.4 Epidemiología del virus influenza.	27
1.4.1 Prevalencia.	27
1.5 Tratamiento y prevención.	31
1.5.2 Prevención.	33
1.6 Medidas para evaluar la respuesta a la vacunación.	38
1.6.1 Hemaglutinación.	38
1.6.2 Microneutralización.	39
1.6.3 Variables de cuantificación de la respuesta inmune frente a la vacunación.	39
1.7 Eficacia de la vacuna de la gripe en pacientes receptores de TOS.	40
1.8.1 Seguridad de la vacunación en el receptor de TOS.	41
1.8.2 Sistemas de histocompatibilidad.	41
1.8.4 Rechazo.	44
1.8.5 Relación entre la vacuna de la gripe y el rechazo del injerto.	44
1.9 Eficacia de la vacunación en los receptores de TOS.	45
1.10.1 Adición de un adyuvante a la composición de la vacuna.	46
1.10.2 Vacunación en los primeros meses tras el trasplante.	47
1.10.3 Aumento del número de dosis.	47

1.10.4 Otras estrategias.	48
1.11 Relación de la vacuna de la gripe y el rechazo en el receptor de TOS	49
2 JUSTIFICACIÓN	51
3. HIPÓTESIS	55
4. OBJETIVOS	59
5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	63
6. RESULTADOS	67
7. RESUMEN DE RESULTADOS	117
6.1 Artículo 1.	119
6.2 Artículo 2.	123
8. DISCUSIÓN	129
8.1 Vacunación gripal en pacientes receptores de TOS.	132
8.2 Factores relacionados con la respuesta a la vacuna de la gripe.	133
8.2.1 Relación de las comorbilidades y la respuesta a la vacunación en el receptor de TOS.	133
8.2.2. Relación entre la inmunosupresión y la respuesta a la vacunación en el receptor de TOS.	134
8.2.3. Relación entre el tipo de órgano trasplantado y la respuesta a la vacunación en el receptor de TOS.	134
8.2.4. Vacunación en los primeros meses tras el trasplante.	135
8.4 Relación de la vacunación gripal durante los primeros seis meses del trasplante con el rechazo y la producción de anticuerpos anti-HLA <i>de novo</i> .	138
8.6 Uso de varias dosis de vacuna de la gripe.	140
9. CONCLUSIONES	143
10.BIBLIOGRAFÍA	147

## ABREVIATURAS

- ACIP: Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización, del inglés "*Advisory Commitee on Immunization Practices*".
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: ARN mensajero.
- ARNv: ARN viral.
- CDC: Centro de Control y prevención, del inglés "*Centers for Disease Control and Prevention*".
- DSA: Anticuerpos donante específicos, del inglés "*Donor Specific Antibodies*".
- ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima, del inglés "*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*".
- EMEA: Agencia Europea de Medicamentos.
- GISN: Red Mundial de Vigilancia de Gripe, del inglés "*Global Influenza Surveillance Network*".
- HA: Hemaglutinina.
- HLA: Antígeno leucocitario humano, del inglés "*huma leucocyte antigen*".
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés "*Major Histocompatibility Complex*".
- mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero, del inglés "*Mammalian Target of Rapamycin*".
- NA: Neuraminidasa.
- NIs: Inhibidores de la Neuraminidasa, del inglés "*Neuraminidase Inhibitors*".
- NK: Linfocitos T citolíticos naturales, del inglés "*Natural Killer*".
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ORF: Pautas abiertas de lectura, del inglés "*Open Reading Frames*".

- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés "*Polimerase Chain Reaction*".
- REIPI: Red Española de Investigación en Patologías Infecciosas
- RNP: Ribonucleoproteína.
- TOS: Trasplante de órgano sólido.
- UCI: Unidad de cuidados intensivos.
- VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

# **1. INTRODUCCIÓN**

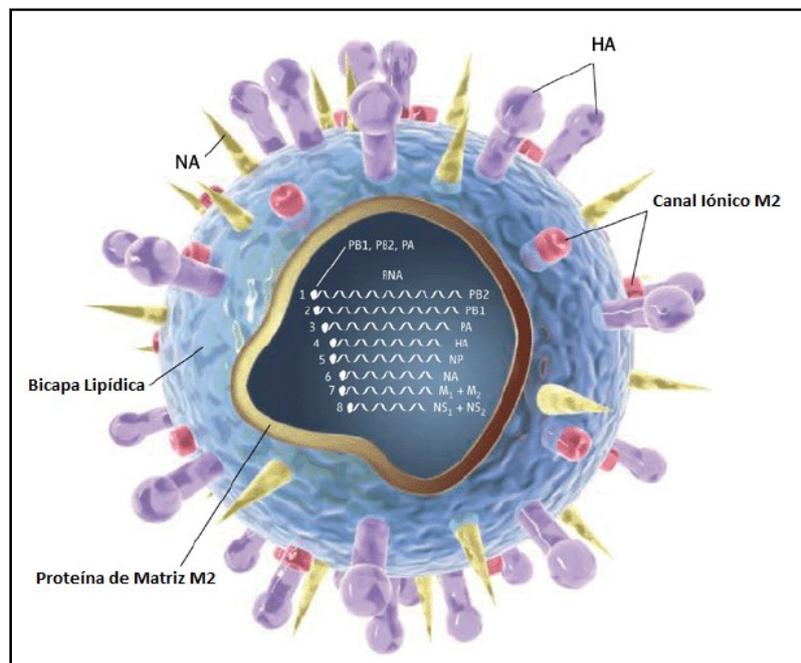


## 1.1 Biología del virus influenza.

El virus influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* es un virus esférico de hasta 120 nm y presenta una envuelta derivada de la célula huésped en la que se encuentran las proteínas neuraminidasa (NA), hemaglutinina (HA) y la proteína M2.

La familia *Orthomyxoviridae* está compuesta por cinco géneros, *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Influenza virus C*, *Thogotovirus* e *Isavirus*. Los virus influenza A se clasifican en función de la composición y antigenicidad de las proteínas de membrana, con 16 subtipos de hemaglutinina (H1 a H16) y 9 subtipos de neuraminidasa.

**Figura 1. Estructura del virus influenza.**



**Representación esquemática de la estructura del virus influenza.** HA: Hemaglutinina; NA Neuraminidasa, PB1, PB2 y PA: complejo polimerasa; NS, NS2: ribonucleoproteínas. Modificado de Beckel *et al.* Science 2006

El genoma del virus influenza A está compuesto por 8 segmentos de ARN lineal, de una sola cadena y sentido negativo, conteniendo entre 10 y 11 pautas abiertas de lectura (ORFs) que codifican 11 proteínas, entre las que se encuentran las proteínas de superficie HA, NA y las proteínas de la cápsida M1 y M2; el complejo polimerasa PB2,

PB1 y PA y las ribonucleoproteínas (RNP) y NS1, NS2 y PB-1-F2; todas esenciales para que se pueda completar el ciclo de vida del virus (Figura 1) (1).

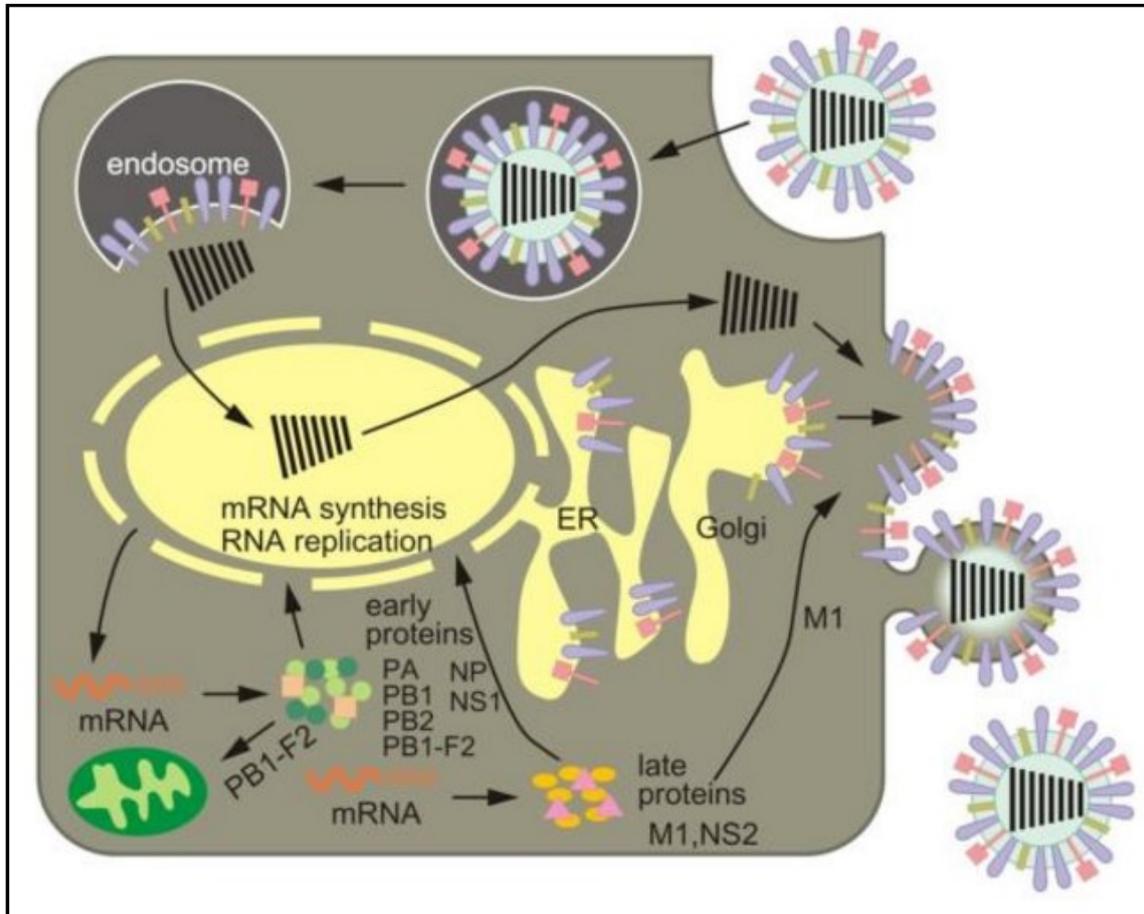
La polimerasa de ARN viral no posee el mecanismo de corrección de errores, lo que provoca que algunas proteínas no esenciales como la proteína HA tengan una elevada tasa de mutación, generando un cambio de base en cada progenie viral producida durante la infección (2). Los cambios genotípicos originados en las proteínas HA y NA por este fenómeno son conocidos con el término de deriva génica, que define la variación genética en las cepas virales de los virus influenza A y la infectividad, ya que estas proteínas son reconocidas por el ácido siálico de la membrana de la célula huésped, por lo que cambios en la estructura de estas proteínas pueden generar cambios en la infectividad del virus (3).

Es importante conocer el ciclo de vida del virus durante la infección para entender la patogenicidad, y para trabajar en la prevención y tratamiento del virus de la gripe.

El ciclo de vida del virus comienza con la unión del virus a la superficie celular, mediante el reconocimiento de los receptores de ácido siálico de la célula por parte de la hemaglutinina viral y se produce la entrada en la célula por endocitosis mediada por receptor. Posteriormente, el dominio terminal de la proteína HA queda expuesto en la cara citosólica del endosoma, y media la fusión con el endosoma celular (Figura 2). El interior de la partícula vírica se acidifica por la acción del canal iónico viral M2, lo que provoca la disociación de la proteína de la matriz M1 del complejo de ribonucleoproteína vRNP. La proteína M1 sale al citoplasma y es transportada al núcleo celular, donde comienza la replicación del ARN viral (ARNv). La replicación y transcripción del ARNv es catalizada por la polimerasa de ARN del virus. El ARN mensajero (ARNm) sintetizado es traslocado al citoplasma, donde la maquinaria celular de la célula hospedadora lo traducirá a proteína. Las nuevas proteínas virales sintetizadas, HA, NA, y M2 son transportadas e insertadas en la membrana plasmática. La membrana del virus procede de la membrana plasmática de la célula huésped donde las proteínas virales se agrupan en balsas lipídicas de colesterol y esfingolípidos. Esta asociación podría favorecer la liberación de las nuevas partículas de la célula hospedadora y la adhesión a la nueva célula. Por otra parte, la proteína M1 participa en el ensamblaje de los nuevos viriones, la proteína M2 mantiene el correcto pH del retículo endoplásmico para la correcta conformación de la HA durante su síntesis. La

proteína NA es la segunda proteína más abundante de la superficie del virus y es esencial para la liberación de los nuevos viriones de la membrana de la célula huésped, mediado también por la acción de M2 (4, 5).

**Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida del virus influenza.**



**Ciclo de vida del virus influenza.** El ciclo comienza con la internalización del virus en la célula hospedadora mediante endocitosis. Las ribonucleoproteínas virales se liberan al citoplasma y son transportadas al núcleo celular, donde tiene lugar la replicación y la transcripción. El ARNm viral se exporta al citoplasma donde se traduce a proteínas. El ensamblaje de los nuevos viriones se produce en la membrana plasmática de la célula hospedadora y las nuevas partículas se liberan por gemación. Neumann *et al.* Nature 2010.

## **1.2 Variabilidad genética del virus de la gripe.**

Los cambios que se generan en las cepas de virus influenza se deben a la deriva antigénica o cambio de antigenicidad de las proteínas superficiales utilizadas (HA, NA) por la elevada tasa de mutación generada por la polimerasa viral. Si los cambios genéticos originados modifican la estructura de las proteínas NA y HA, pueden tener un importante efecto en el reconocimiento del virus por el sistema inmunológico del hospedador, ya que pueden afectar al reconocimiento de éstas por parte del sistema inmune. Estos cambios genéticos en las proteínas HA y NA generan nuevas cepas de virus influenza capaces de originar diferencias en la tasa de infección anual e incluso producir brotes epidémicos.

Estos cambios pueden ser de dos tipos, cambios menores generados por deriva antigénica, o cambios mayores generados por un cambio antigénico.

### **1.2.1 Deriva génica.**

Este proceso genera pequeños cambios que afectan generalmente a las proteínas superficiales del virus HA y NA. Se producen por acumulación de mutaciones que producen cambios en los aminoácidos de las regiones antigénicas de las proteínas. Debido a estos cambios, los anticuerpos producidos en una infección previa no son capaces de reconocer al nuevo virus generado, seleccionándose de esta manera una nueva variante de cepa viral para la siguiente temporada gripal (3). Esta teoría ha sido demostrada *in vitro* generando nuevas cepas de virus mediante la selección por cantidades limitantes de anticuerpos monoclonales en varios ciclos de infección del virus (6).

### **1.2.2 Cambio antigénico.**

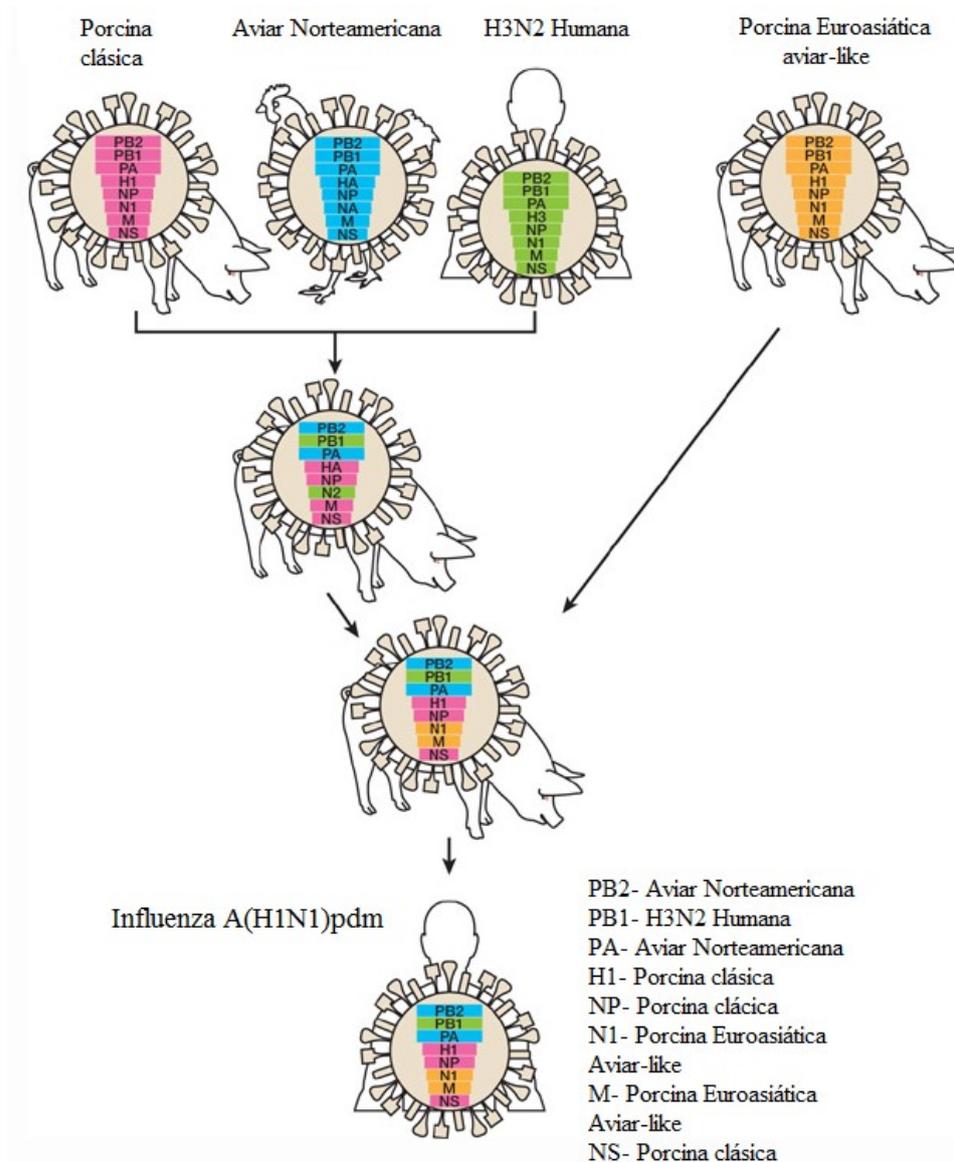
Son cambios mayores en el que se generan cepas de influenza A con proteínas completas diferentes a las anteriores. Es un mecanismo menos frecuente y por el que se generan las pandemias de gripe. Este proceso se realiza por medio de una zoonosis, bien porque dos o más cepas virales infecten simultáneamente la misma célula hospedadora generando una nueva cepa por reordenamiento genético ya que se intercambian segmentos completos de ARN, o bien por la selección de una mutación que permita a un virus de la gripe animal infectar a un humano y transmitirse de persona a persona.

Son fenómenos que se ven favorecidos por el carácter segmentado del genoma de los virus influenza.

En ambos casos, se genera una cepa viral, con una nueva glicoproteína HA o con una nueva combinación de las proteínas HA y NA, contra las que la mayoría de la población no tienen inmunidad previa, no han generado anticuerpos previos y serán susceptibles de infección. Si además, esta nueva cepa obtiene alguna ventaja en la propagación de persona a persona, podría extenderse rápidamente a nivel mundial, generando epidemias y pandemias, como ya ha ocurrido varias veces a lo largo de la historia, la última en la pandemia de gripe A(H1N1)pdm en el año 2009 (7, 8).

Concretamente, la cepa de influenza pandémica A(H1N1)pdm se originó por una recombinación triple de genes nunca descritos en cepas humanas (Figura 3). La cepa pandémica se originó a partir de tres eventos de reordenación genética. El primero de ellos ocurrió entre 1997 y 1998, con la generación de un virus H3N2 triple recombinante (trH3N2) que partió de la combinación de un virus H1N1 porcino (H1N1 tipo clásico relacionado con la cepa causante de la pandemia de 1918), un virus aviar perteneciente al linaje norteamericano y un virus humano H3N2 estacional. En esta reordenación cada uno de ellos aportó distintos segmentos del genoma. El segundo evento genera dos virus triple recombinantes (H1N1 y H1N2) a partir de la introducción de la proteína NA y/o la HA del virus H1N1 porcino al virus H3N2 aviar norteamericano. Finalmente, cerca del año 2009 se produjo el tercer evento de reordenación entre el virus H1N2 y el virus H1N1 porcino “tipo aviar” (aviar-like) (H1N1) euroasiático, el cual aporta los genes de la NA y la matriz. Con esta última reordenación se generó la cepa A(H1N1)pdm que se transmitió al ser humano en abril de 2009 iniciando la pandemia (4).

**Figura 3. Generación de la cepa de virus influenza A(H1N1)pdm**



**Representación esquemática de la generación de la cepa de virus influenza A(H1N1)pdm, por reordenamiento genético.**

Las características genéticas del virus de la gripe, que hacen que se den fácilmente estos procesos de cambio genético, ya sean leves o abruptos, provocan que las cepas de virus circulantes sean diferentes cada año, limitando la capacidad de reconocimiento del sistema inmune de los individuos infectados. Por ello, la composición de las vacunas antigripales recomendadas por la OMS debe revisarse y reformularse prácticamente todas las temporadas gripales. Neumann *et al.* Nature 2010.

### **1.3 Respuesta inmune frente al virus influenza.**

La respuesta inmune frente a las infecciones víricas es un proceso complejo que engloba tanto a la respuesta innata inespecífica como a la respuesta específica adaptativa humoral y celular.

#### **1.3.1 Respuesta innata inespecífica.**

La respuesta innata frente al virus influenza incluye procesos físicos y celulares que protegen frente a cualquier patógeno invasor. Esta respuesta se produce a través del reconocimiento de dominios conservados en los patógenos que no se encuentran normalmente en el huésped. Un claro ejemplo de este proceso es la producción de interferón de tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (9) en respuesta a la infección, con propiedades antivirales que inhiben la replicación viral (10). En la respuesta innata frente al virus de la gripe participan además otros componentes del sistema inmune como los macrófagos y las células natural killer (NK) (11, 12).

#### **1.3.2 Respuesta celular.**

La respuesta específica de células T se produce cuando las células T naïve reconocen a antígenos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II en las células infectadas por el virus influenza (13, 14). Durante la infección, la degradación de las proteínas virales por parte de la célula infectada facilita la carga de los antígenos en los MHC que son presentados a las células T circulantes (15, 16).

El reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T naïve promueve la proliferación y diferenciación a linfocitos T efectores y de memoria. Esta unión específica al antígeno es fundamental para que se desencadene la respuesta inmune específica y posteriormente de memoria (17). El papel principal de las células T citotóxicas es el reconocimiento y posterior eliminación de las células infectadas por el virus influenza, de modo que la respuesta celular es capaz de reducir los síntomas derivados de la infección, pero no evitar la infección inicial (18).

Los linfocitos TCD8<sup>+</sup> específicos son los encargados del reconocimiento de las células infectadas por el virus influenza que reconocen antígenos intracelulares del virus presentados por el sistema HLA, en particular, las proteínas M1 y NP, altamente

expresadas durante las primeras etapas de la infección (17, 19, 20). Recientemente también se ha descrito una relación entre el aumento de linfocitos TCD4+ y una menor replicación viral y menor gravedad de enfermedad en pacientes infectados (21, 22).

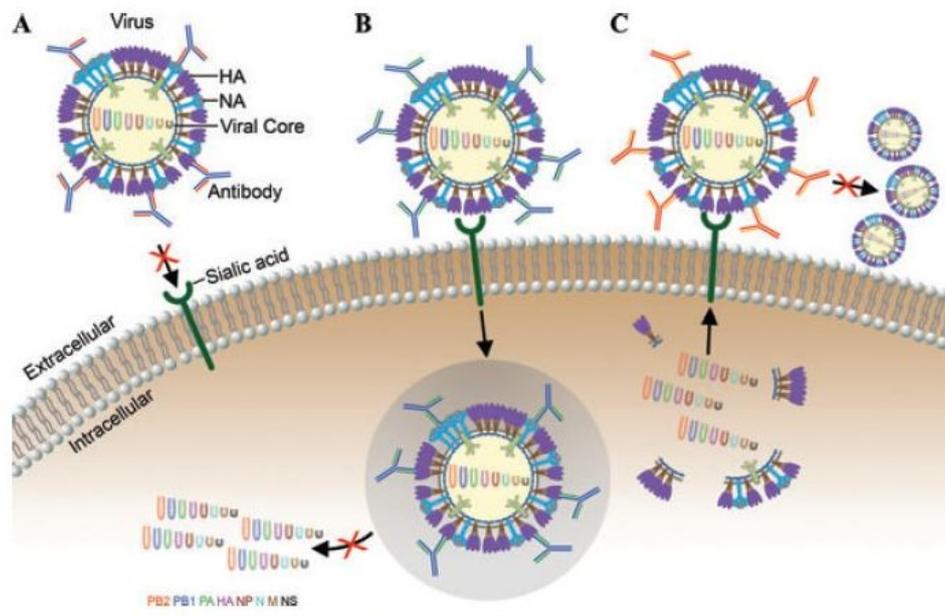
### **1.3.3 Respuesta humoral.**

La respuesta inmune mediada por anticuerpos juega un papel crucial en el control y reducción de la gravedad de la infección por el virus influenza, evitando así la infección primaria en infecciones posteriores.

Esta respuesta mediada por anticuerpos se genera frente al virus de la gripe tras la infección o la vacunación y consiste en la producción de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes. Los anticuerpos no neutralizantes no son funcionales en su mayoría sin embargo, los anticuerpos no neutralizantes funcionales, se unen específicamente a proteínas superficiales como HA y NA y proteínas internas como M1, M2 y NP y aunque no evitan la infección de la célula huésped, participan en el aclaramiento viral y el control de la enfermedad (23-25). También participan en la activación de las células NK, que promueven la eliminación de las células infectadas, mediante un mecanismo denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (26, 27)

Por otro lado, los anticuerpos neutralizantes tienen un dominio de unión específico frente a proteínas superficiales del virus e impiden la unión del virus a la célula huésped, y/o la liberación de la progenie vírica de la célula infectada. En el caso de los anticuerpos neutralizantes que reconocen específicamente a la hemaglutinina de la envuelta viral bloquean la unión a los receptores de ácido siálico de la superficie de la célula huésped, que constituye el primer paso de la adhesión del virus con el hospedador (Figura 4). El bloqueo de esta proteína viral por parte de los anticuerpos neutralizantes generados por el huésped evita la infección primaria y la reinfección del virus de la gripe (26, 28). Los anticuerpos neutralizantes específicos frente a la proteína NA, evitan la liberación de la nueva progenie vírica de la célula hospedadora, y aunque no previenen la infección primaria, contribuyen a controlar la gravedad de la infección disminuyendo los casos de reinfección (29).

**Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de acción de los anticuerpos neutralizantes.**



**Mecanismo de acción de los anticuerpos neutralizantes frente al virus influenza. A.** Los anticuerpos neutralizantes se unen a la proteína HA1, bloqueando el reconocimiento del receptor celular. **B.** Los anticuerpos específicos anti-HA2 bloquean la fusión de la membrana del virus con la del endosoma, impidiendo la liberación en el citoplasma. **C.** Los anticuerpos que reconocen a la proteína NA superficial bloquean la liberación de los nuevos viriones de la célula huésped. Modificado de Han, T. *et al.* Science, 2011.

## 1.4 Epidemiología del virus influenza.

### 1.4.1 Prevalencia.

El resfriado común y la gripe son las enfermedades infecciosas más frecuentes en la población mundial. El diagnóstico es fundamentalmente clínico, siendo los síntomas más comunes fiebre, malestar, escalofríos, dolor de cabeza y dolores musculares (30).

La infección por el virus influenza causa la enfermedad gripal, una enfermedad infecciosa leve, que se caracteriza por el inicio súbito de fiebre, intenso malestar, dolores musculares y articulares, dolor de cabeza y garganta, tos, y secreción nasal. El periodo de incubación suele ser de dos días, y los síntomas desaparecen al cabo de dos semanas aproximadamente, sin necesidad de intervención clínica ni originando complicaciones graves en la mayoría de los casos. En las poblaciones de riesgo, como

los pacientes diabéticos, mujeres en estado de gestación, pacientes con hepatopatías, cardiopatías o nefropatías, y pacientes inmunodeprimidos, la infección por el virus influenza puede causar complicaciones graves, cómo neumonía viral primaria o secundaria, neumonía bacteriana secundaria y otras complicaciones extrapulmonares e incluso la muerte del paciente (31).

La gripe se distribuye a nivel mundial, siguiendo un patrón epidémico estacional. En climas templados en el hemisferio norte, la gripe ocurre entre los meses de Octubre y Abril, mientras que en el hemisferio sur ocurre entre Mayo y Agosto, en ambos casos coincide con la temporada invernal de ambas regiones del planeta (32). Este comportamiento estacional podría deberse a las condiciones climatológicas de estos meses, de humedad y frío, que favorecen la supervivencia del virus y su estabilidad (33, 34).

Durante los períodos epidémicos, la prevalencia de infección por influenza oscila entre el 10 y el 20% de la población total no vacunada, pudiendo llegar a tasas de hasta un 50% en poblaciones de riesgo (35). Asimismo, las tasas de infección y enfermedad varían en función del tipo de población, de la edad, de las comorbilidades, del estado inmunológico de los pacientes, la coincidencia entre la cepa vacunal y la circulante, entre otras.

La gripe es responsable de entre 250.000 y 500.000 muertes al año en todo el mundo y más de 200.000 hospitalizaciones (36). Como ejemplo reciente, concretamente en España, en la temporada 2015-2016, la actividad gripal fue moderada, y asociada a una circulación mayoritaria del virus de la gripe A(H1N1)pdm, con una creciente contribución del virus de la gripe B a medida que avanzaba la temporada. La epidemia gripal se inició de forma tardía. Los menores de 15 años de edad fueron el grupo más afectado, con mayores tasas de infección en el grupo de población de 0 a 4 años.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1947 la Red Mundial de Vigilancia de Gripe (GISN), para monitorizar el desarrollo y migración de las variantes del virus de la gripe circulante en cada temporada gripal. En base a los resultados de vigilancia se revisa anualmente la composición vacunal para adaptarse a los cambios en función de los virus circulantes detectados. Dentro de cada temporada gripal se recogen muestras en distintas áreas geográficas a nivel mundial para realizar determinaciones

centinelas y determinar las estirpes circulantes en dicha temporada. De las 2.716 determinaciones realizadas en España a lo largo de la temporada 2015-2016, el 66% fueron virus de la gripe A, 98% de A(H1N1)pdm entre los subtipos obtenidos. A nivel global, se pudo distinguir una primera onda de virus circulante A(H1N1)pdm, y en un periodo epidémico más tardío una mayor contribución de virus B.

Se notificaron 12 brotes confirmados de gripe, el 92% de los cuales se asoció a virus tipo A. Además, se notificaron 3.101 casos graves hospitalizados confirmados de gripe, en los que 1.071 (35%) fueron admitidos en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y 352 (11,4%) fallecieron. La mayor proporción de casos se concentró en mayores de 64 años (40%). El 75% de los casos graves hospitalizados confirmados de gripe presentó algún factor de riesgo asociado a las complicaciones por gripe y el 64,5% de ellos no habían recibido la vacuna esa temporada.

Las defunciones en casos graves hospitalizados confirmados de gripe se concentraron fundamentalmente en los mayores de 64 años (59%) y el 97% de los casos fatales presentó algún factor de riesgo de complicaciones. El 59% de los pacientes recomendados de vacunación no habían recibido la vacuna antigripal de esta temporada. La letalidad observada en términos de defunciones entre casos graves hospitalizados confirmados de gripe fue inferior a la temporada previa, y similar a las anteriores (37).

#### **1.4.2 La infección gripal en pacientes inmunodeprimidos.**

Los pacientes inmunodeprimidos, tales como los pacientes con infección por VIH, con cáncer o pacientes que reciben medicación inmunosupresora, cómo los receptores de trasplante de órgano sólido (TOS) o hematopoyético, son una población de alto riesgo de desarrollar complicaciones asociadas a la infección del virus de la gripe (38). En este trabajo, nos centraremos en los pacientes receptores de TOS, en los que la infección por el virus influenza continúa siendo un factor de riesgo de desarrollo de complicaciones como las neumonías virales primarias y bacterianas secundarias o el rechazo de órgano, debido a la acción directa del virus o a efectos indirectos mediados inmunológicamente, (39-43)

### **1.4.3 La infección gripal en pacientes receptores de trasplante de órgano sólido.**

Como se ha comentado anteriormente, aunque en la población inmunocompetente, la infección por influenza causa enfermedad leve, y los síntomas desaparecen al cabo de una semana o 10 días tras la infección sin necesidad de tratamiento o ingreso hospitalario en la mayoría de los casos, en el receptor de TOS, la infección gripal es una importante causa de morbilidad y mortalidad (44, 45).

Tras la infección por influenza el receptor de TOS presenta una sintomatología diferente a la observada en el paciente inmunocompetente (46), debido fundamentalmente a que por su estado de inmunosupresión, no se desencadena la respuesta inflamatoria estimulada por la infección gripal, pudiendo presentar menor sintomatología que la población general (47). Mientras que el paciente inmunocompetente suele presentar cuadros de fiebre, mucosidad, dolores musculares y de las vías respiratorias altas, en el receptor de TOS, los síntomas suelen ser fiebre, tos, mialgias y disneas, siendo la presencia de fiebre la expresión más evidente de la infección gripal en estos pacientes (31, 47-52)

En el 50 a 70% de los casos de infección gripal en los receptores de TOS, el paciente requiere ingreso hospitalario de los que entre el 13 y el 20% ingresa en UCI, con una mortalidad asociada de entre el 4 y el 8% (31, 44, 48-51, 53). Además, se han observado incrementos en la mortalidad debida a la infección por influenza de hasta el 21% en series de pacientes receptores de pulmón infectados por la cepa A(H1N1)pdm durante la pandemia de 2009 (50).

La infección por influenza también se ha relacionado con el rechazo y la disfunción del órgano trasplantado, que llega al 61% de los casos en alguna de las series publicadas (31, 43, 49).

Otra de las complicaciones descritas tras la infección gripal en el paciente de TOS es la neumonía viral secundaria, la mayor causa de infiltrados pulmonares en estos pacientes (54-56). Aunque esta complicación ocurre también en la población general, en el paciente trasplantado los efectos son más graves, conllevando el ingreso en UCI y mayores tasas de mortalidad (54). Por otro lado, se estima que la neumonía bacteriana secundaria asociada a la infección gripal ocurre en el 17% de los pacientes infectados

por la gripe estacional . De la misma forma, también se han descrito infecciones fúngicas en el receptor de TOS afectado por la gripe (57).

En trabajos realizados por nuestro grupo en la temporada gripal pandémica de 2009 y post-pandémica describimos una alta incidencia de infección por el virus de la gripe y complicaciones en los pacientes receptores de TOS. Con una tasa de mortalidad del 7,2% y tasas de ingreso en UCI del 16,2% (58). En otros estudios, se han demostrado tasas de mortalidad asociada a la infección gripal de entre el 4 y el 8%, así como otras complicaciones graves asociadas a la gripe como neumonía secundaria con tasas de entre el 29,4 y el 32%, coinfecciones virales con tasas que oscilaron entre el 2 y el 62,7% y coinfecciones bacterianas con tasas de entre 10,7 y el 13,7% (31, 44)

La incidencia y complicaciones asociadas a la gripe en el receptor de TOS varían en función del órgano trasplantado (43, 44, 59-61). En el receptor de trasplante pulmonar el riesgo de infección es mayor, con una incidencia de 41 casos por cada 1000 habitantes, en el receptor de trasplante hepático la incidencia es de 4,3 casos por cada 1000 habitantes, mientras que el menor riesgo lo encontramos en el receptor de trasplante renal, con una incidencia de 2,8 casos por cada 1000 habitantes (43, 62-64). En cuanto a receptores de TOS diferentes a los anteriores, cómo el trasplante cardíaco, pancreático o combinado, si bien no existen trabajos específicos, en los estudios con poblaciones receptores de TOS, describen un riesgo similar a los descritos anteriormente para los trasplantados de hígado, riñón o pulmón (31, 43).

La predisposición del receptor de trasplante de ser infectado por el virus de la gripe se asocia con muchos factores, siendo uno de los más importantes, la ausencia o niveles bajos de anticuerpos neutralizantes capaces de neutralizar la infección viral debido a la supresión de su estado inmunológico (65).

### **1.5 Tratamiento y prevención.**

Debido al elevado riesgo de desarrollo de complicaciones ocasionadas por la infección por influenza en el receptor de trasplante (66) y especialmente desde la pandemia de gripe A(H1N1)pdm del año 2009, se han protocolizado las medidas de detección mediante PCR del virus influenza ante cualquier sospecha de gripe en estos pacientes, a

través de muestras respiratorias tomadas de los pacientes mediante *frotis* nasal o nasofaríngeo o lavado broncoalveolar (67, 68) con el objetivo de aumentar la eficacia en el diagnóstico precoz y tratamiento de la infección

### 1.5.1 Tratamiento.

Existen dos tipos de medicamentos antivirales empleados en la actualidad para tratar la infección por el virus de la gripe, adamantanes y los inhibidores de la neuraminidasa (NIs) (69, 70). Los adamantanes (amantadina y rimantadina) actúan sobre los canales iónicos M2, y sólo son efectivos frente a las cepas A(H1N1)pdm y A(H3N2). Sin embargo, debido a la selección de cepas resistentes con tasas del 10% y 90%, respectivamente, su utilidad se ha visto seriamente limitada, ya que la selección de una única mutación en el aminoácido 31 de la proteína genera resistencia al medicamento.

Dos medicamentos de la familia de los NIs, oseltamivir y zanamivir, son efectivos en el tratamiento de la infección por influenza A y B, gracias a que impiden la liberación de los nuevos viriones de la célula huésped (71). En un estudio reciente, en el que se analizó una cohorte de 410 pacientes con síntomas de gripe, 45,4% de los cuales recibieron oseltamivir tras la confirmación de infección gripal por PCR, se observó que aunque las comorbilidades desarrolladas fueron similares respecto a los pacientes que recibieron un tratamiento diferente, la gravedad fue menor (72). Un metanálisis publicado recientemente muestra que aunque oseltamivir y zanamivir reducen el tiempo de aclaramiento viral en pacientes adultos, la profilaxis con estos inhibidores de la neuraminidasa incrementa el riesgo de náuseas y vómitos en pacientes pediátricos. Además, no se observó una reducción significativa de la mortalidad en los pacientes que recibieron oseltamivir (73).

Al igual que ocurre con los adamantanes, se ha descrito la selección de cepas resistentes a oseltamivir, sobre todo asociadas a influenza A(H1N1)pdm siendo en torno al 12% de las cepas circulantes en la temporada 2008-2009 (74, 75). Los últimos datos sobre este aspecto, publicados por el Sistema de vigilancia de la gripe en España (SVGE) reflejan un 2% de las cepas circulantes en la temporada 2015-2016 de influenza A(H1N1)pdm resistentes a este medicamento. Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito cepas de influenza resistentes a zanamivir, y las cepas resistentes a oseltamivir son sensibles a este medicamento (76, 77).

En circunstancias de casos leves de gripe y en pacientes con escaso riesgo de complicaciones, los expertos recomiendan cautela a la hora de administrar antivirales y ponen de manifiesto la necesidad de emplear otras estrategias para prevención y tratamiento frente a la gripe (67). Sin embargo, se ha demostrado que los antivirales son efectivos para el tratamiento frente a la infección por influenza en el receptor de TOS se recomienda iniciar el tratamiento tan pronto como sea posible, sin esperar la confirmación microbiológica, especialmente en casos de sospecha de neumonía, para minimizar las complicaciones derivadas de una posible infección gripal en los pacientes (67).

### **1.5.2 Prevención.**

Hay tres tipos de medidas de prevención:

- Medidas de barrera.

En 1972 se describió el primer brote de infección nosocomial en una unidad de trasplante renal, en el que dos de cinco pacientes desarrollaron neumonía. A partir de entonces, se han registrado otros brotes de infección nosocomial en el receptor de TOS, y se han adoptado medidas para evitarlas. Estas medidas son (67):

- Evitar el contacto con los pacientes, tanto de los visitantes como del personal sanitario que presente síntomas de infección en las vías respiratorias.
- Emplear mascarilla quirúrgica tanto en el paciente, como en los visitantes y personal sanitario con sospecha de infección.
- Emplear medidas de higiene, como el lavado exhaustivo de las manos antes del contacto con el receptor de trasplante, tanto por parte del personal sanitario como de los visitantes.

- Quimioprofilaxis.

A pesar de no ser un método que pueda sustituir a la vacunación en la prevención frente a la infección por influenza, se ha demostrado que la quimioprofilaxis después de la exposición al virus, tiene beneficios en la prevención de la infección en el receptor de TOS. La administración de oseltamivir o zanamivir después del contacto de los pacientes con un individuo infectado por el virus ha demostrado eficacia en la prevención que oscila entre el 68% y el 69% y 72% al 89%, respectivamente (78-80).

Además, se ha sugerido que la administración de oseltamivir previa a la infección, podría generar una disminución del riesgo de progresión de enfermedad a neumonía en pacientes inmunodeprimidos (81).

Por otra parte, en la población general, la quimioprofilaxis administrada antes de la exposición al virus ha demostrado una eficacia en la prevención de la infección del 84% para oseltamivir y del 82% para zanamivir. Sin embargo, no hay estudios concluyentes sobre la eficacia de la quimioprofilaxis previa a la exposición con el virus en los pacientes receptores de TOS (82, 83).

### - Vacunación.

La vacunación anual frente al virus influenza es la medida más eficaz para evitar la infección. En la población adulta sana, la vacunación proporciona protección frente a la infección por el virus de la gripe en el 70-90% de los casos, siendo la vacunación gripal una medida costo-efectiva óptima, especialmente en niños y población anciana (84, 85).

La vacuna de la gripe estacional está compuesta por las proteínas HA y NA derivadas de las tres cepas de virus influenza, A(H1N1)pdm, A/H3N2 e influenza B. Como se ha comentado anteriormente, la OMS estableció en 1947 la Red Mundial de Vigilancia de Gripe para monitorizar el desarrollo y migración de las variantes del virus de la gripe circulante en cada temporada gripal. En base a los resultados de vigilancia se revisa anualmente la composición vacunal, para adaptarse a los cambios en función de los virus circulantes detectados. Este organismo cuenta en la actualidad con 125 centros repartidos en 96 países para la vigilancia mundial de la infección por el virus influenza. Para realizar el seguimiento, los centros locales recogen muestras de pacientes con gripe y las envían a uno de los cuatro centros de referencia mundiales de la OMS localizados en Atlanta, Londres, Melbourne y Tokio (86, 87). En cada centro se realizan pruebas de similitud antigénica basadas en ensayos de hemaglutinación de los antisueros y los datos se envían al Centro de Evolución de Patógenos de la universidad de Cambridge para la cartografía y mapeo antigénico. En función de los resultados obtenidos, la OMS recomienda una nueva composición vacunal para la gripe para la temporada siguiente, adaptando semestralmente la composición en el Hemisferio Norte y el Hemisferio Sur.

Es muy importante la correcta elección de las cepas que componen la vacuna por parte de los organismos encargados, ya que el proceso de fabricación de la vacuna de la gripe requiere entre seis y ocho meses, desde que se selecciona la cepa mayoritaria circulante que será añadida a la vacuna hasta la fabricación final de la misma. En algunos casos puede ocurrir que en este lapso de tiempo se produzcan cambios genéticos de las cepas circulantes no contemplados en la elección de los candidatos, provocando una reducción en la eficacia de la vacuna en esa temporada. Un ejemplo claro de este hecho ocurrió en la temporada gripal 2007-2008, en la que se recomendó la incorporación de la cepa A/Wisconsin/67/2005(H3N2)-like, pero la cepa predominante fue A/Brisbane (H3N2)-like. Más recientemente, en la temporada 2013-2014 la vacuna administrada incluía la cepa B/Yamagata, y la cepa mayoritaria circulante fue la B/Victoria y en la temporada 2014-2015, en la que el 66.8% de las cepas de A/H3N2 circulantes no coincidieron con la cepa A/Texas/50/2012(H3N2)-like incluida en la composición vacunal (88). En todo caso, aunque la vacuna vea reducida su eficacia por este hecho, sigue aportando beneficios a los pacientes, como la prevención de síntomas graves (89-91).

#### Tipos de vacuna y recomendaciones de administración.

##### - Vacuna trivalente de virus inactivados.

La vacuna trivalente de virus inactivados es una vacuna que consta de las proteínas HA y NA fragmentadas de las tres cepas de virus influenza incluidas en la composición vacunal. Para producir la vacuna, cada cepa del virus influenza por separado se propaga en huevos de gallina embrionados (92), y posteriormente son purificados e inactivados con formalina. Los virus inactivados son fraccionados para aislar las proteínas HA y NA de cada cepa. Cada dosis de la formulación vacunal está compuesta por 15 µg de las proteínas HA y NA de cada una de las cepas.

##### -Vacuna de virus vivos atenuados.

La vacuna de virus vivos atenuados de influenza se consigue por recombinación entre cada una de las cepas de referencia con una cepa adaptada al frío, produciéndose una

reorganización genómica. Como resultado, se obtiene una cepa recombinante que contiene la información genética de las proteínas NA y HA de la cepa de referencia propuesta, y los seis genes de adaptación a baja temperatura de la cepa resistente. Para su producción, cada una de las tres cepas adaptadas se propaga en sucesivos pases de infección a 25°C y posteriormente en huevos de gallina embrionados. Se consigue de esta manera, una cepa del virus que no es capaz de completar su ciclo de infección a temperaturas fisiológicas de 37°C, por lo que el paciente puede estimular su respuesta inmune sin desarrollar síntomas gripales ni enfermedad (93, 94). El uso de esta vacuna no está aprobado en España y por tanto no se comercializa y no está recomendada para el receptor de TOS.

### -Recomendaciones para la vacunación.

El comité de buenas prácticas e inmunización (ACIP) del CDC revisa anualmente las recomendaciones y establece los grupos de riesgo en los que se debe administrar la vacuna de la gripe. Actualmente el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e igualdad recomienda la vacuna para los siguientes grupos de población:

1. Personas de edad mayor o igual a 65 años, haciendo especial énfasis en aquellas personas que conviven en instituciones.
2. Personas menores de 65 años que presentan un riesgo elevado de complicaciones derivadas de la gripe.
  - Niños de mayores de seis meses de edad y adultos con enfermedad crónica cardiovascular (excluyendo hipertensión arterial aislada) o pulmonar, incluyendo displasia bronco-pulmonar, fibrosis quística y asma.
  - Niños mayores de seis meses y adultos con:
    - Enfermedades metabólicas, incluida la diabetes mellitus.
    - Obesidad mórbida (índice de masa corporal  $\geq 40$  en adultos,  $\geq 35$  en adolescentes, o  $\geq 3$  DS en la infancia).
    - Insuficiencia renal.
    - Hemoglobinopatías y anemias.
    - Asplenia.
    - Enfermedad hepática crónica.
    - Enfermedades neuromusculares graves.

- Inmunosupresión, incluida la originada por la infección de VIH, por fármacos o en los receptores de trasplante.
- Implante coclear o en espera del mismo.
- Trastornos y enfermedades que conllevan disfunción cognitiva: Síndrome de Down, demencia y otras.

En este grupo se hará especial énfasis en aquellas personas que precisen seguimiento médico periódico o que hayan sido hospitalizadas en el año precedente.

- Residentes en instituciones cerradas, de cualquier edad a partir de seis meses, que padezcan procesos crónicos.
- Niños y adolescentes, de entre seis meses y 18 años, que reciben tratamiento prolongado con ácido acetil salicílico, por la posibilidad de desarrollar un síndrome de Reye tras la gripe.
- Mujeres embarazadas en cualquier trimestre de gestación.

3. Personas que puedan transmitir la gripe a aquellas que tienen un alto riesgo de presentar complicaciones:

- Trabajadores de los centros sanitarios, tanto de atención primaria como especializada y hospitalaria; pública y privada. Se hará especial énfasis en aquellos profesionales que atienden a pacientes de algunos de los grupos de alto riesgo anteriormente descritos.
- Personas que por su ocupación trabajan en instituciones geriátricas o en centros de atención a enfermos crónicos, especialmente los que tengan contacto continuo con personas vulnerables.
- Personas que proporcionen cuidados domiciliarios a pacientes de alto riesgo o ancianos.
- Personas que conviven en el hogar, incluidos niños/as, con personas que pertenecen a algunos de los grupos de riesgo, por su condición clínica especial (citados en el apartado 2).

4. Otros grupos en los que se recomienda la vacunación:

- Personas que trabajan en servicios públicos esenciales con especial énfasis en los siguientes subgrupos:
  - Fuerzas y cuerpos de seguridad del Estado, con dependencia nacional, autonómica o local.
  - Bomberos.
  - Servicios de protección civil.
  - Personas que trabajan en los centros de emergencia sanitaria.
  - Trabajadores de instituciones penitenciarias y de otros centros de internamiento por disposición judicial.
- Personas que, por su ocupación, pueden estar en contacto con aves con sospecha o confirmación de infección por virus de la gripe aviar altamente patogénico, especialmente:
  - Las personas que están directamente involucradas en las tareas de control y erradicación de los brotes (destrucción de los animales muertos, limpieza y desinfección de áreas infectadas).
  - Las personas que viven y/o trabajan en granjas de aves donde se han notificado brotes, o se sospecha de su existencia.

Estas recomendaciones deben actualizarse en función de las evidencias epidemiológicas sobre el patrón de presentación y difusión de la infección por virus de gripe aviar

Por el contrario, no se recomienda la vacunación gripal en los siguientes casos:

- En personas con alergia al huevo, con hipersensibilidad a las proteínas de huevo o que hayan tenido una reacción alérgica severa a una vacuna de la gripe anterior.
- Los niños menores de seis meses.
- Si se tiene una enfermedad aguda con fiebre alta debe esperarse hasta que esta situación remita.

### **1.6 Medidas para evaluar la respuesta a la vacunación.**

#### **1.6.1 Hemaglutinación.**

Tradicionalmente, la titulación de anticuerpos neutralizantes frente al virus influenza se ha basado en experimentos que evalúan la capacidad de una muestra de suero de inhibir la hemaglutinación. La proteína HA de la superficie viral, tiene la capacidad de producir

la hemaglutinación de los eritrocitos, mediante unión específica de la superficie de éstos. Ante una concentración viral fija, y en presencia de una molécula de unión a la proteína HA, como los anticuerpos neutralizantes específicos de HA, la inhibición de la hemaglutinación observada será proporcional a la concentración de anticuerpos (95). Aunque esta técnica se convirtió en un protocolo relativamente universal para la titulación de anticuerpos neutralizantes frente al virus de la gripe presentes en el suero de los pacientes, y ha sido empleada en multitud de estudios (96-98), el hecho de que el análisis de los resultados de la hemaglutinación sea visual junto con otras limitaciones técnicas en el desarrollo del protocolo, han conducido a que sea desplazada por otras técnicas más sensibles, más sencillas y más objetivas de cuantificar, como la microneutralización, basada en la técnica de ELISA.

### **1.6.2 Microneutralización.**

La técnica de microneutralización es una herramienta eficaz para evaluar la respuesta a la vacunación mediante la titulación de los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero del paciente, capaces de bloquear la infección del virus de la gripe de células en cultivo. En esta técnica, se emplea una cantidad fija de virus influenza para infectar células en cultivo en presencia de cantidades decrecientes del suero de pacientes. La inhibición de la infección observada será proporcional a la cantidad de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero. Este ensayo, de más fácil manejo que la hemaglutinación, y mayor fiabilidad en la cuantificación, ha sustituido en gran medida a la hemaglutinación y se ha convertido en la técnica de referencia para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes frente a la gripe (99).

### **1.6.3 Variables de cuantificación de la respuesta inmune frente a la vacunación.**

Según los estándares internacionales (100), los parámetros para medir la respuesta inmune a la vacunación son:

- Geometric mean titer (GMT): media de títulos de anticuerpo en el grupo de individuos vacunados.
- Tasa de seroprotección: porcentaje de sujetos con título de anticuerpo 1:40.

- Tasa de seroconversión: porcentaje de sujetos con un incremento de cuatro veces en el título de anticuerpo basal.
- Geometric mean ratio (GMR) o factor de seroconversión: número de veces que incrementa el GMT desde basal a postvacunal.

Una vacuna se considera eficaz cuando el individuo está seroprotegido tras la vacunación con valores de seroprotección  $\geq 40$  y ha seroconvertido con un aumento de 4 veces el título de anticuerpos basales (101, 102).

### **1.7 Eficacia de la vacuna de la gripe en pacientes receptores de TOS.**

La vacunación estacional frente a la gripe está especialmente recomendada en la población trasplantada, ya que como se ha comentado anteriormente, tiene un mayor riesgo de desarrollar complicaciones derivadas de la infección por el virus influenza y es el mejor método para evitar la infección (31).

Sin embargo, la eficacia de la vacuna de la gripe en la población trasplantada es menor que en la población general, existiendo un porcentaje de pacientes que varía entre el 15% y un 90%, en función de la cohorte estudiada, que no desarrolla una respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y por tanto no está seroprotegido frente a la infección (99, 103-112), por lo que sigue habiendo un margen para mejorar la eficacia vacunal.

Otro aspecto importante que se ha debatido ampliamente en relación a la eficacia de la vacuna de la gripe es cuándo administrarla tras el trasplante. Las recomendaciones actuales, que se basan en opiniones de expertos y trabajos realizados con series pequeñas de pacientes (113), recomiendan vacunar a partir del tercer al sexto mes tras el trasplante. Debido a la estacionalidad de la vacunación, que se realiza entre Octubre y Diciembre, a diferencia de otras vacunas que pueden aplicarse durante todo el año y a las complicaciones asociadas a la infección por influenza en esta población, es fundamental determinar el momento más adecuado tras el trasplante en el que es seguro y efectivo administrar la vacuna. Existen pocos datos experimentales al respecto, pero se argumenta en la literatura que la administración de la vacuna durante los primeros meses desde el trasplante podría tener una menor eficacia, debido posiblemente a la

mayor inmunosupresión a la que están sometidos los pacientes en este periodo. Por tanto, sería esencial realizar estudios que respondan a este aspecto sobre la vacunación gripal en series de pacientes con mayor potencia estadística y a lo largo de diferentes temporadas gripales para llegar a conclusiones sólidas.

## **1.8 Seguridad de la vacunación.**

### **1.8.1 Seguridad de la vacunación en el receptor de TOS.**

Aunque se ha demostrado que la vacunación gripal es el método más eficaz para proteger de la infección gripal al receptor de TOS, minimizando los riesgos directos e indirectos provocados por el virus influenza, algunos autores han alertado sobre el riesgo teórico de que la vacunación pudiera generar una respuesta de rechazo del injerto debido a la hiperestimulación a través de la producción de anticuerpos anti-HLA donante específico (DSA).

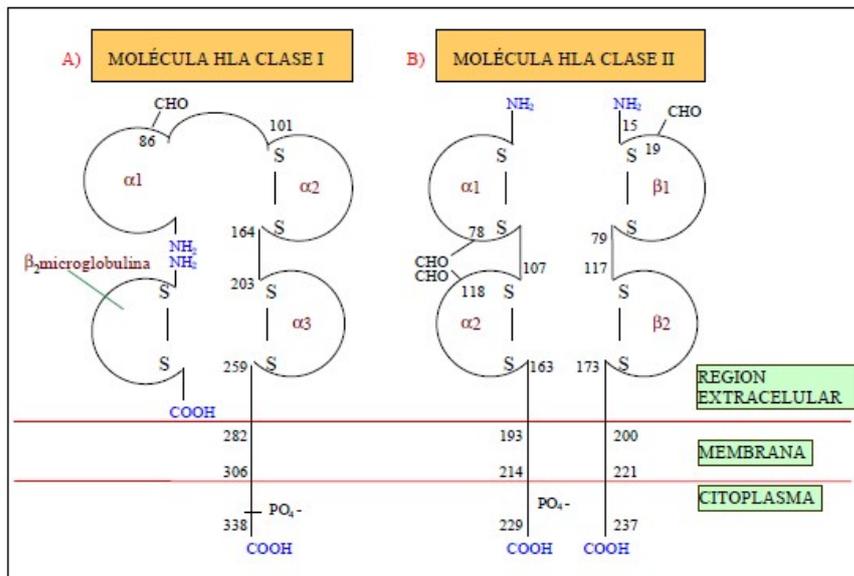
### **1.8.2 Sistemas de histocompatibilidad.**

Una de las principales herramientas del sistema inmunitario para la defensa del organismo frente a las agresiones externas es el sistema de histocompatibilidad encargado de reconocer a los antígenos. Una vez reconocidos los antígenos como elementos extraños, el sistema de histocompatibilidad se encarga de presentarlos a los linfocitos T. El sistema más conocido es el complejo principal de histocompatibilidad (HLA). Las moléculas HLA (antígeno leucocitario humano), son un grupo de receptores celulares presentes en todos los tipos celulares.

Un importante aspecto en la función del sistema HLA es su relación con el reconocimiento en los trasplantes (114).

El sistema HLA contribuye a diferenciar la respuesta inmune según el antígeno reconocido, gracias a su alto grado de polimorfismo, que contribuye a las diferencias en la respuesta inmunitaria entre individuos, jugando un papel importante en la susceptibilidad a ciertas enfermedades y en el trasplante de órgano (115).

**Figura 5. Representación esquemática de las molécula HLA de clase I y II.**



A. Estructura de una molécula de clase I. B. Estructura de una molécula de clase II. Abreviaciones: NH<sub>2</sub>, amino terminal; COOH, carboxilo terminal; S-S, puente disulfuro; PO<sub>4</sub>, fosfato.

El rechazo del aloinjerto se produce cuando el sistema HLA reconoce antígenos presentes en el injerto y ausentes en el receptor, y reacciona desencadenando una respuesta inmune frente a él (116).

Respecto a sus características estructurales y funcionales, los genes y moléculas de HLA se clasifican en clase I y clase II según su estructura, función y distribución celular. Las moléculas de HLA clase I se expresan constitutivamente en prácticamente todas las células del organismo y funcionan como moléculas presentadoras de péptidos a las células T CD8<sup>+</sup> y controlan la actividad NK, mientras que las moléculas de HLA de clase II, se expresan de manera constitutiva sólo en células presentadoras de antígenos y presentan péptidos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (117, 118). También existe expresión diferencial de las moléculas de HLA, de forma que HLA-DR es más abundante que HLA-DP y DQ.

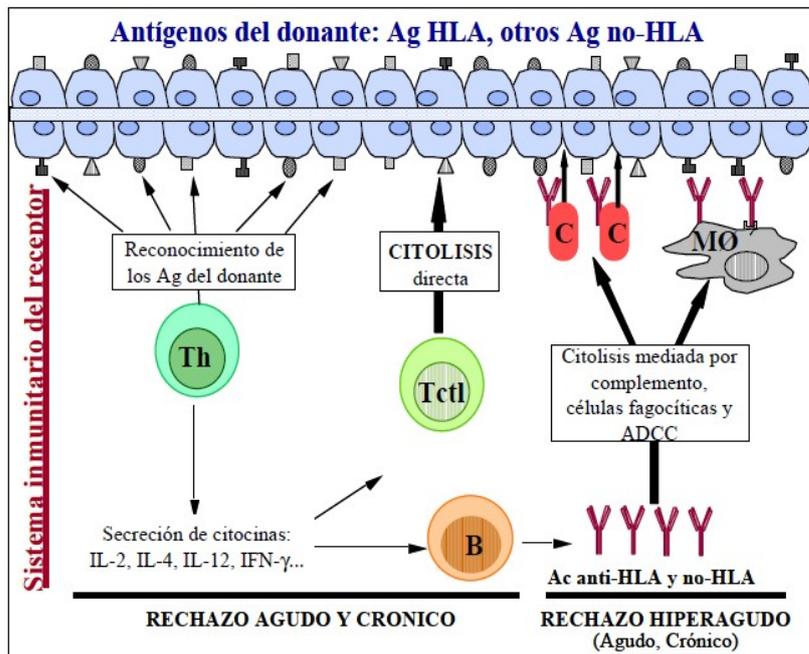
La expresión de estas moléculas también puede verse alterada en situaciones clínicas concretas, como en el caso del rechazo de trasplante, en las que se alcanza una expresión considerable de las moléculas de HLA de clase II, siendo las moléculas HLA-DR mayormente expresadas que las HLA-DP y HLA-DQ.

Para determinar la compatibilidad antes del trasplante, en determinados órganos como riñón y corazón, se procede al tipaje de HLA tanto de donante como del receptor, a partir de muestras de ganglio inguinal, bazo o sangre periférica, en las que se procede a la separación de células T y B.

### **1.8.3 Producción de anticuerpos citotóxicos.**

Tras el trasplante, se pueden producir anticuerpos frente a moléculas HLA del donante si éstas son diferentes a las del receptor. En el caso de los trasplantes, el órgano trasplantado presenta multitud de antígenos diferentes, lo que origina una reacción inmediata por parte del sistema inmune del receptor. Además, este tipo de pacientes puede presentar autoanticuerpos derivados de la propia patología o del tratamiento. Se calcula que los anticuerpos anti-HLA se producen en un 75 - 90% de los receptores que pierden el órgano. Por otro lado en algunos episodios de rechazo, se ha descrito la presencia de anticuerpos que reaccionan sólo con antígenos específicos de tejido, son los anti-HLA donante-específicos o DSA, expresados en células endoteliales y monocitos, pero no en la membrana de linfocitos. Se ha demostrado que podrían ser la razón para algunos rechazos observados en pacientes con prueba cruzada negativa. Esta respuesta se puede producir durante el embarazo, por transfusiones sanguíneas o por trasplantes (119, 120). En algunos trabajos, se establece la posibilidad de que la vacuna de la gripe, puede contener epítomos que generen esta respuesta aloinmune (106, 121, 122).

**Figura 6. Representación del mecanismo de acción de los anticuerpos citotóxicos.**



Mecanismos celulares y humorales por los cuales el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad del donante por parte del sistema inmunitario del receptor puede desencadenar el rechazo hiperagudo, agudo o crónico del aloinjerto.

#### 1.8.4 Rechazo.

El virus influenza es capaz de activar mecanismos inmunológicos en los pacientes receptores de TOS que se han asociado con altas tasas de rechazo celular agudo (40, 42, 43) y disfunción crónica del injerto (67).

En relación a la vacuna de la gripe, se ha planteado que teóricamente podría ser posible que la respuesta inmunológica a la misma, pueda estimular una respuesta de células T y B tras la vacunación, propiciando la producción de anticuerpos anti-HLA que puedan originar una respuesta de rechazo agudo del injerto, especialmente en los primeros meses post trasplante. No obstante, no existen estudios concluyentes que demuestren esta hipótesis.

#### 1.8.5 Relación entre la vacuna de la gripe y el rechazo del injerto.

La infección por virus influenza está asociada a episodios de rechazo agudo en el receptor de trasplante, y se ha demostrado que está asociada a la producción *de-novo* de

anticuerpos anti-HLA. El virus influenza podría activar mecanismos inmunológicos en el receptor de trasplante que genera un rechazo agudo hasta en el 62% de los adultos receptores de trasplante, y un rechazo crónico en el trasplante pulmonar (123, 124). En base a este hecho se ha propuesto la posibilidad de que la vacunación gripal pudiera desencadenar esta misma respuesta. Esta hipótesis es poco sólida y está basada, en publicaciones escasas y basadas en series con pocos pacientes y opiniones de expertos (106, 122).

### **1.9 Eficacia de la vacunación en los receptores de TOS.**

En los últimos años, desde la pandemia de 2009, se han publicado un número elevado de estudios en los que se ha profundizado en el conocimiento de la respuesta a la vacuna de la gripe en los pacientes receptores de TOS. Un estudio retrospectivo, en el que se incluyeron 51.730 pacientes receptores de TOS que recibieron la vacuna de la gripe a partir del sexto mes tras el trasplante, concluyó que la inmunización en estos pacientes disminuía el riesgo de pérdida del injerto y muerte (125), sin embargo, la respuesta a la vacunación en esta población era muy variable, y los datos de seroprotección publicados oscilaban entre el 15% y el 90% en función de la cohorte estudiada, menor que la alcanzada por la población inmunocompetente (99, 103-112, 126). Además, en la mayoría de estudios publicados se sugiere una respuesta a la vacunación diferente en función del órgano trasplantado con una respuesta de anticuerpos neutralizantes reducida en los receptores de trasplante renal (103, 106, 127), hepático (108, 109, 128) y cardíaco (108-110, 128).

Dada la importancia de la vacunación para prevenir la infección y el desarrollo de complicaciones asociadas a la gripe en el receptor de TOS, y considerando la respuesta heterogénea y variable alcanzada por estos pacientes, sería necesario adoptar medidas para mejorar la inmunización en esta población de riesgo de infección por virus influenza.

### **1.10 Estrategias de mejora de la vacunación.**

La respuesta a la vacunación, en términos de eficacia, en el receptor de TOS sigue siendo menor a la observada en la población general (125) y existe un margen de

mejora, ya que entre el 1 y el 47% de los pacientes no responden a la vacunación (58, 99, 129), por lo que sería deseable implementar medidas para aumentar la respuesta en estos pacientes. Para aumentar la respuesta a la vacunación gripal se ha planteado utilizar alguna de las estrategias.

### **1.10.1 Adición de un adyuvante a la composición de la vacuna.**

La adición de un adyuvante a la composición vacunal puede incrementar la respuesta a la vacuna trivalente de virus inactivados. Un adyuvante es un compuesto químico que se añade a la composición de la vacuna para aumentar su inmunogenicidad.

Aunque el mecanismo inmunológico específico por el que el adyuvante incrementa la respuesta a la vacunación no se conoce, parece estar relacionado con el aumento de la secreción de quimioquinas por parte de monocitos y células dendríticas en el lugar de la inyección (130). En la vacuna de la gripe se han utilizado hasta la fecha dos tipos de adyuvante, MF59 (Novartis) y AS03 (GlaxoSmithKline), ambos basados en emulsiones acuosas que contienen escualeno. El adyuvante MF59 al que se le añaden sales de aluminio en su composición, ha demostrado inducir una mayor respuesta inmune en individuos mayores de 65 años de edad y el SO3 se emplea normalmente en vacunas monovalentes (131, 132). En general, en la población inmunocompetente, la vacuna adyuvantada ha demostrado una mayor eficacia, mayores ratios de seroconversión y una tolerancia clínica similar a la observada con la vacuna no adyuvantada (67). Clark TW *et al.* describieron en una cohorte de 176 adultos aleatorizados para recibir dos dosis de vacuna frente a influenza A/California/2009(H1N1) no adyuvantada, o adyuvantada con MF59 en 2009, una mejor respuesta de seroprotección y seroconversión en aquellos que recibían la vacuna adyuvantada, tanto a corto como a largo plazo (133). En un estudio posterior, Murdo Ferguson *et al.* en un ensayo clínico realizado en 1340 individuos sanos, aleatorizados para recibir una o dos dosis de vacuna frente a influenza A(H1N1)pdm, de 3,75 ó 1,9 µg, adyuvantada o no con ASO3, demostró una mayor seroprotección y seroconversión en los pacientes que recibieron una o dos dosis de la vacuna adyuvantada, independientemente de la dosis (134).

En cuanto a la población trasplantada, existen pocos estudios analizando la respuesta y seguridad de la administración de la vacuna adyuvantada. En un estudio previo realizado por nuestro grupo, analizamos una cohorte de 346 pacientes

que recibieron una dosis de la vacuna pandémica adyuvantada en 2009, observamos que la vacuna fue eficaz según los estándares internacionales y segura ya que no observamos ningún episodio de rechazo, aunque las tasas de seroprotección y seroconversión fueron menores a las descritas para la población general (99).

### **1.10.2 Vacunación en los primeros meses tras el trasplante.**

Actualmente se recomienda la vacunación gripal en el receptor de TOS a partir de los tres a seis meses del trasplante, a pesar de que los tres primeros meses tras el trasplante es el periodo de mayor riesgo de desarrollar complicaciones durante la infección gripal, debido a que es un periodo en que el paciente es especialmente lábil inmunológicamente y se han generado dudas acerca de si la vacunación podría tener una escasa eficacia (60). En base a estas hipótesis existe controversia en la literatura acerca del momento correcto tras el trasplante en el que iniciar la inmunización de la gripe. Lawal *et al.*, estudiando una cohorte de 51 pacientes, describió que solo el 13,7% de los siete pacientes vacunados en los primeros cuatro meses del trasplante alcanzó la seroprotección tras la vacunación, una respuesta mucho menor a la observada en los pacientes vacunados entre los cuatro meses y un año post trasplante (67%) y en los pacientes vacunados a partir del años post-trasplante (86%) (135). Birdwell *et al.*, en una cohorte de 53 pacientes receptores de TOS 19 (35,84%) de los cuales fueron vacunados en los primeros meses pos-trasplante, concluyó que la respuesta a la vacunación gripal en estos pacientes fue independiente del tiempo transcurrido desde el trasplante a la vacunación (103).

### **1.10.3 Aumento del número de dosis.**

Resultados previos de nuestro grupo, analizando un grupo de 100 pacientes receptores de trasplante hepático, renal y cardíaco (104), sugieren que los pacientes con títulos de anticuerpos neutralizantes previos a la vacunación tienen una mejor respuesta postvacunal. Sin embargo, el porcentaje de pacientes que mantienen títulos de anticuerpos a largo plazo un año tras la vacunación es bajo, sólo uno de cada tres pacientes. Estos datos sugieren que el mantenimiento de la respuesta a largo plazo no es suficiente para asegurar que los pacientes tengan títulos de anticuerpos en el momento de la vacunación y promover una mejor respuesta vacunal.

Una estrategia posible es la administración de más de una dosis de vacuna que podría generar un efecto "booster", similar a lo observado en los pacientes con títulos prevacunales. Sin embargo, existen pocos estudios y con datos controvertidos sobre la eficacia de esta estrategia en la población trasplantada.

Algunos estudios muestran un aumento de la respuesta de anticuerpos neutralizante tras dos dosis de vacuna gripal en pacientes con trasplante hepático(109), o una tercera dosis en el caso del trasplante cardíaco (110), en comparación con aquellos que reciben una única dosis. Otros estudios sugieren una respuesta similar en pacientes que reciben una o dos dosis, tanto de la vacuna trivalente estacional, como de la vacuna pandémica A(H1N1)pdm, para todos los tipos de trasplante (108, 127, 136, 137).

#### **1.10.4 Otras estrategias.**

-Dosis elevadas.

Otra estrategia de mejora de la vacunación gripal es la administración de dosis de vacuna de la gripe con concentraciones más elevadas. En este sentido, se ha publicado un ensayo clínico realizado sobre 3876 individuos adultos sanos, 1288 de los cuales recibieron la dosis estándar de vacuna antigripal, 15 µg, y 2588 recibieron una dosis elevada, de 60 µg. En líneas generales, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de seroprotección frente a las 3 cepas de influenza analizadas en el estudio (A(H1N1)pdm, A/H3N2 e influenza B) en los pacientes que recibieron una alta dosis de vacuna, aunque esta estrategia de vacunación sí demostró una mayor eficacia en los sujetos mayores de 65 años (138). Sin embargo la eficacia de la vacuna de la gripe empleando dosis elevadas no ha sido evaluada en receptores de TOS.

-Vía intradérmica

En cuanto a la vía de administración, se ha estudiado el efecto de la administración intradérmica de la vacuna de la gripe en el receptor de TOS en diversos estudios, basados en receptores de de trasplante hepático y renal, y no se han encontrado beneficios en la respuesta humoral de los pacientes respecto a la vía de administración intramuscular (126, 139, 140).

En resumen, la vacunación antigripal en los receptores de TOS, ha demostrado eficacia en términos de respuestas vacunales superiores al 70% recomendada por los estándares internacionales aunque menor a la observada en la población inmunocompetente. Sin embargo, hay un margen de mejora puesto que en algunas series casi un 50% de los pacientes pueden no responder. Por tanto, sería esencial el desarrollo de estudios que profundicen en la eficacia y la seguridad de las estrategias de mejora para obtener una mejor respuesta de la vacuna de la gripe en el receptor de TOS, para protegerlo de la infección gripal, una de las principales causas de morbimortalidad en estos pacientes.

### **1.11 Relación de la vacuna de la gripe y el rechazo en el receptor de TOS**

Existe cierta controversia acerca de si la vacuna de la gripe puede producir la estimulación de la producción *de novo* de anticuerpos anti-HLA que pudiese desencadenar una respuesta de rechazo del injerto.

En el estudio previo realizado por nuestro grupo, *Cordero et al.* 2011, en el que analizamos una cohorte de 346 pacientes que recibieron una dosis de la vacuna pandémica adyuvantada en 2009, no analizamos su relación con la aloreactivación del sistema inmune y la producción de anticuerpos anti-HLA o el rechazo (99).

Katerinis, publicó en 2011 un estudio de cohortes en el que analizaron 151 receptores de trasplante renal que recibieron la vacuna pandémica adyuvantada con MF-059 en dos momentos distintos, a las seis semanas desde el trasplante o en el sexto mes post-trasplante. En este estudio se concluye que la vacunación está asociada con la producción de anticuerpos anti-HLA en un 17,3% de pacientes vacunados a las seis semanas tras el trasplante y en el 11,9% de los pacientes que la recibieron la vacuna a los seis meses tras el trasplante (121).

Kumar *et al.*, en 2011, publicó un estudio basado en la cohorte de Manuel *et al.* publicada en 2007, en la que tras analizar la producción de anticuerpos anti-HLA en 60 pacientes receptores de TOS que recibieron la vacuna estacional no adyuvantada y no observaron relación con el aumento de anticuerpos anti-HLA. En este trabajo se planteó la posibilidad de que los resultados obtenidos por Katerinis estuvieran relacionados con la presencia del adyuvante en la composición vacunal (122).

En un estudio más reciente publicado por Cohet *et al.* en 2016, analizaron la producción de anticuerpos anti-HLA *de novo* en 184 pacientes receptores de TOS después de recibir la vacuna de la gripe adyuvantada con AS03. En este trabajo, los autores no encontraron evidencias que relacionen la vacunación gripal con el rechazo mediado por anticuerpos anti-HLA (141).

Por otra parte debido a que los primeros meses tras el trasplante es un periodo en que el paciente es especialmente lábil inmunológicamente debido a la intensidad del régimen inmunosupresor, se han generado dudas acerca de si la vacunación podría promover la inducción de rechazo, debido a que la vacuna está asociada a la hiperactivación del sistema inmune (60).

Es importante destacar que en la literatura, no encontramos estudios que profundicen en la producción de anticuerpos anti-HLA en los pacientes vacunados en los primeros meses tras el trasplante, siendo éste un aspecto esencial de la seguridad de la vacunación, ya que tanto la circulación del virus, como los periodos de vacunación están sujetos a temporalidad. De forma que si se demora la vacunación de la gripe, para esperar que haya transcurrido más tiempo desde el trasplante, puede suponer que no haya tiempo de vacunar al paciente antes de que la epidemia de la gripe haya comenzado y el enfermo esté expuesta a la misma.

Tampoco existen estudios que evalúen el aumento del número de dosis de la vacuna gripal y su relación con la producción de anticuerpos anti-HLA que puedan desencadenar un rechazo de órgano. Sin embargo, siguiendo el razonamiento de la sobre estimulación del sistema inmune que produce la vacuna de la gripe, un aumento de dosis podría también agravar este efecto.

En base a lo expuesto anteriormente, los resultados de estos estudios, además de ser controvertidos, están basados en series de pacientes poco numerosas, por lo que no son concluyentes. Por tanto, sería necesario realizar nuevos estudios de cohortes más numerosas de receptores de TOS que reciben la vacuna de la gripe y que sean seguidos de forma prospectiva, que permitan analizar este aspecto de la seguridad de las estrategias de mejora para obtener una mejor respuesta de la vacuna de la gripe en el receptor de TOS y que permitan obtener resultados concluyentes.

## **2 JUSTIFICACIÓN**



Los receptores de trasplante de órgano sólido son un grupo de alto riesgo de infección gripal por su estado de inmunosupresión. Se han descrito complicaciones graves relacionadas con el desarrollo de gripe en estos pacientes, como neumonía viral y neumonía bacteriana primaria y secundaria, enfermedad pulmonar, rechazo del órgano trasplantado e incluso muerte, especialmente en los primeros tres meses desde el trasplante, en los que la probabilidad de infección y la gravedad de las complicaciones descritas se multiplican por cinco. La administración de la vacuna de la gripe es el método más eficaz para prevenir la infección en este grupo de riesgo y por tanto para minimizar las complicaciones mencionadas anteriormente. Sin embargo, aunque se ha descrito que la vacuna en el receptor de TOS es eficaz y consigue evitar la infección en la mayoría de los pacientes, la respuesta observada es menor comparada con la población inmunocompetente, existiendo un porcentaje variable de pacientes, entre el 15 y el 45% que no responde correctamente a la inmunización frente al virus influenza, y no alcanza los valores de seroprotección necesarios para evitar la infección.

Por tanto sería necesario adoptar medidas para aumentar la eficacia vacunal en estos pacientes y dada nuestra experiencia previa en el estudio de la infección gripal en el receptor de TOS, y la gran cantidad de estudios al respecto disponibles en la literatura, planteamos que implementar distintas estrategias de mejora como la administración precoz de la vacuna en los primeros meses desde el trasplante, la utilización de una composición vacunal adyuvantada, o la administración de una segunda dosis, podrían mejorar la respuesta a la vacunación en estos pacientes.

Sin embargo, en la práctica clínica existen reticencias acerca de que la vacunación gripal podría estar asociada a la hiperactivación del sistema inmune en estos pacientes, pueda propiciar una respuesta aloinmune cruzada, generando una respuesta frente al órgano trasplantado. Este proceso podría resultar en el rechazo del injerto mediado por un aumento de anticuerpos anti-HLA frente al donante, y que este efecto pudiera estar potenciado especialmente en los primeros meses tras el trasplante.

Hasta el momento no hay muchos estudios que profundicen en este importante aspecto de la vacuna de la gripe y las recomendaciones de las guías clínicas al respecto están basadas en opiniones de expertos y el análisis de series de pacientes poco numerosas y no diseñadas, en la mayoría de los casos, para analizar este aspecto del efecto de la vacuna en el paciente trasplantado. Es esencial por tanto plantear nuevos estudios para

evaluar la efectividad y la seguridad de las diferentes estrategias de mejora de la inmunización frente al virus influenza en el receptor de TOS, empleando una cohorte de pacientes lo suficientemente numerosa como para obtener conclusiones firmes.

### **3. HIPÓTESIS**



- La respuesta a la vacunación en los receptores de trasplante es menor a la observada en la población general.
- La vacuna de la gripe en el receptor de TOS es eficaz desde el primer mes post trasplante, con una eficacia similar a la esperada a partir del sexto mes post-trasplante.
- La vacuna de la gripe en el receptor de TOS no está relacionada con el aumento de anticuerpos anti-HLA.
- La vacunación gripal no está relacionada con un aumento de rechazo en pacientes trasplantados.
- La vacuna de la gripe en los primeros meses post trasplante no está relacionada con el aumento de la producción de anticuerpos anti-HLA.
- El uso de adyuvante en la formulación de la vacuna de la gripe no está relacionado con un aumento de anticuerpos anti-HLA en el receptor de TOS.
- La administración de una segunda dosis de vacuna no está relacionada con el aumento de anticuerpos anti-HLA.



## **4. OBJETIVOS**



#### **4.1 Objetivo general.**

Los objetivos generales de esta tesis fueron:

Evaluar en la población de receptores TOS la eficacia y seguridad de las posibles estrategias de mejora de la vacunación gripal tales como la administración precoz tras el trasplante de la vacuna en los primeros meses desde el trasplante, la utilización de una composición vacunal adyuvantada, o la administración de una segunda dosis de vacuna.

#### **4.2 Objetivos específicos.**

1. Determinar la respuesta inmune humoral, medida como títulos de anticuerpos neutralizantes frente a virus influenza en receptores de TOS vacunados frente a la gripe en los que se han implementado estrategias de mejora de la respuesta vacunal..
2. Comparar la respuesta inmune humoral a la vacuna de la gripe en los pacientes vacunados en los primeros seis meses desde el trasplante con respecto a aquellos vacunados a partir del sexto mes.
3. Determinar la relación entre la eficacia vacunal y la clínica del paciente, teniendo en cuenta el tipo de trasplante, las comorbilidades, la medicación inmunosupresora y el tipo de trasplante recibidos.
4. Evaluar la frecuencia del rechazo en el receptor de TOS que reciben la vacuna antigripal y la asociación del mismo con el tiempo transcurrido desde el trasplante, el uso de adyuvante y el número de dosis administradas.
5. Determinar la producción de anticuerpos anti-HLA en respuesta a la vacuna de la gripe tras el TOS.
6. Determinar si la producción de anticuerpos anti-HLA se relaciona con el rechazo en los receptores de TOS vacunados de la gripe.
7. Determinar si el tiempo desde el trasplante a la vacunación afecta a la producción de anticuerpos anti-HLA en los receptores de TOS.
8. Determinar si la adición de un adyuvante a la composición vacunal tiene algún efecto en la producción de anticuerpos anti-HLA.

## Objetivos

---

9. Determinar si la administración de una segunda dosis de vacuna de la gripe tiene efecto en la producción de anticuerpos anti-HLA en los pacientes receptores de TOS.
10. Caracterizar en los receptores de TOS los anticuerpos anti-HLA producidos tras la vacunación y determinar si son donante-específico.

## **5. CONSIDERACIONES ÉTICAS**



Este estudio se ha realizado en base a lo dispuesto en la legislación vigente y cumpliendo las normas éticas de la Declaración de Helsinki y Buena Práctica Clínica y de Laboratorio. Se ha obtenido la aprobación por parte del Comité de Ética e investigación de todos los centros participantes, y se permite la monitorización, auditoria y revisión del estudio por las autoridades sanitarias que lo deseen. Todos los pacientes que han participado en el estudio han sido informados y han firmado un consentimiento.



## **6. RESULTADOS**



## Influenza vaccination during the first 6 months after solid organ transplantation is efficacious and safe

P. Pérez-Romero<sup>1</sup>, A. Bulnes-Ramos<sup>1</sup>, J. Torre-Cisneros<sup>2</sup>, J. Gavaldá<sup>3</sup>, T. A. Aydllo<sup>1</sup>, A. Moreno<sup>4</sup>, M. Montejo<sup>5</sup>, M. C. Fariñas<sup>6</sup>, J. Carratalá<sup>7</sup>, P. Muñoz<sup>8</sup>, M. Blanes<sup>9</sup>, J. Fortún<sup>10</sup>, A. Suárez-Benjumea<sup>11</sup>, F. López-Medrano<sup>12</sup>, J. L. Barranco<sup>2</sup>, M. Peghin<sup>3</sup>, C. Roca<sup>1</sup>, R. Lara<sup>2</sup> and E. Cordero<sup>1</sup>, for the Influenza Vaccine in Solid Organ Transplant Recipient Study Group, Spanish Network of Research in Infectious Diseases (REIPI-GESITRA)

1) Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Sevilla, Sevilla, 2) Reina Sofia University Hospital-Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), University of Cordoba (UCO), Cordoba, 3) Vall d'Hebron University Hospital-VHIR, 4) University Clinic Hospital, Barcelona, 5) University Hospital Cruces, Bilbao, 6) University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, 7) University Hospital Bellvitge-IDIBELL, University of Barcelona, Barcelona, 8) General University Hospital Gregorio Marañón, Madrid, 9) University Hospital La Fe, Valencia, 10) University Hospital Ramón y Cajal, Madrid, 11) University Hospital Virgen Macarena, Sevilla and 12) University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

### Abstract

Preventing influenza infection early after transplantation is essential, given the disease's high mortality. A multicentre prospective cohort study in adult solid organ transplant recipients (SOTR) receiving the influenza vaccine during four consecutive influenza seasons (2009–2013) was performed to assess the immunogenicity and safety of influenza vaccination in SOTR before and 6 months after transplantation. A total of 798 SOTR, 130 of them vaccinated within 6 months of transplantation and 668 of them vaccinated more than 6 months since transplantation. Seroprotection was similar in both groups: 73.1% vs. 76.5% for A/(H1N1)pdm (p 0.49), 67.5% vs. 74.1% for A/H3N2 (p 0.17) and 84.2% vs. 85.2% for influenza B (p 0.80), respectively. Geometric mean titres after vaccination did not differ among groups: 117.32 (95% confidence interval (CI) 81.52, 168.83) vs. 87.43 (95% CI 72.87, 104.91) for A/(H1N1)pdm, 120.45 (95% CI 82.17, 176.57) vs. 97.86 (95% CI 81.34, 117.44) for A/H3N2 and 143.32 (95% CI 103.46, 198.53) vs. 145.54 (95% CI 122.35, 174.24) for influenza B, respectively. After adjusting for confounding factors, time since transplantation was not associated with response to vaccination. No cases of rejection or severe adverse events were detected in patients vaccinated within the first 6 months after transplantation. In conclusion, influenza vaccination within the first 6 months after transplantation is as safe and immunogenic as vaccination thereafter. Thus, administration of the influenza vaccine can be recommended as soon as 1 month after transplantation.

Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Early vaccination, immune response, influenza vaccine, seroprotection, solid organ transplantation

**Original Submission:** 13 May 2015; **Revised Submission:** 1 July 2015; **Accepted:** 17 July 2015

Editor: L. Kaiser

**Article published online:** 29 July 2015

**Corresponding author:** P. Pérez-Romero, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Avenida Manuel Siurot s/n, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Edificio IBIS Laboratorio 208, 41013 Sevilla, Spain  
E-mail: [mperez-ibis@us.es](mailto:mperez-ibis@us.es)

The first two authors contributed equally to this article, and both should be considered first author.

### Introduction

After the 2009 influenza pandemic, substantial morbidity and mortality due to influenza infection was described in solid organ transplant recipients (SOTR) [1]. Given the risk of severe disease in this population, recommendations for diagnosis, prevention and therapy of influenza infection were given by several scientific societies [2–4].

Time since transplantation has been associated with a higher risk of complications due to influenza infection in transplant recipients. Patients diagnosed with influenza infection within the first 3 months after receiving a transplant have a five times greater risk of developing severe disease compared to those infected after the first 3 months after transplantation [5]. Current recommendations, mostly based on expert opinion, support influenza vaccination after 3 months after transplantation [6,7]. More recent recommendations state that not vaccinating may leave a transplant recipient vulnerable to influenza infection for an entire influenza season. However, results of immunologic response to influenza vaccination during the first 6 months after transplantation are controversial [2,8]. While some authors reported a lower response [6,9], others found a similar response independent of the time since transplantation [10]. In addition, most of the studies with patients vaccinated within the first 6 months after transplantation are small series.

Although no solid evidence exists indicating that vaccination can cause acute rejection, there has been worry that non-specific immune activation caused by vaccination could result in transplant rejection. In this context, safety should be the primary consideration when administering the influenza vaccine early after transplantation. Despite the need for preventing influenza infection in the first 6 months after transplantation, solid evidence regarding the efficacy and safety of influenza vaccination is lacking. Further, adequately sized studies are needed to clarify and firmly establish recommendations regarding the optimal timing of influenza vaccination in the transplant setting.

We hypothesized that early vaccination of SOTR had similar immunologic responses to SOTR vaccinated 6 months after transplantation. Thus, the aim of the study was to assess the immunogenicity, efficacy and safety of influenza vaccination in SOTR before and after 6 months since transplantation.

## Material and Methods

### Subjects and study design

We performed a multicentre prospective cohort study of influenza vaccinated SOTR during four consecutive influenza seasons. Kidney, heart and liver recipients older than 15 years of age who received one dose of the influenza vaccine between November 2009 and January 2013 were enrolled in 12 Spanish university hospitals belonging to the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Patients were excluded if they received the transplant less than 1 month before immunization, if they had an allergy to any of the vaccine components or if they were pregnant. Serum samples were

collected from each patient at the time of vaccination (baseline) and 5 weeks after vaccination. Patients were followed up during 90 days and up to 10 months if influenza infection or adverse effects were detected to evaluate the clinical efficacy of the vaccine. The study procedures were approved by the University Hospital Ethic Committee for Clinical Research according with the Helsinki Declaration of the World Medical Association. All patients provided written informed consent.

### Clinical parameters and definitions

Baseline characteristics, immunologic and clinical response and adverse effects, including graft rejection and mortality, were recorded using a standardized questionnaire. Biopsies and histologic evaluation of graft rejection were only performed in cases of suspicion if signs of biochemical, echocardiographic or spirometry testing disorders were detected. Comorbidities were assessed by the Charlson comorbidity index [11].

Rejection was defined by the Banff and International Society for Heart and Lung Transplantation criteria [12]. Chronic renal insufficiency was defined as an estimated glomerular filtration rate of  $<60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> for more than 3 months (modified criteria of the Kidney Disease Improving Global Outcomes) [13]. The definition of chronic liver disease was that of the Charlson comorbidity index [11]. Induction therapy was considered when administered within the 6 months before vaccination. Hypogammaglobulinemia was defined as IgG levels lower than 700 mg/dL. The general immunosuppressive regimens consisted of mycophenolate mofetil, calcineurin inhibitor and prednisone. Heart and kidney transplant recipients with medium-high immunologic risk for graft rejection or delayed introduction of tacrolimus received induction therapy with anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibodies or polyclonal anti-thymocyte globulin. For liver transplant patients where induction therapy was indicated, anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody therapy was used.

### Vaccines

Patients from the 2009–2010 influenza season received the pandemic H1N1-2009 (A/California/7/2009-H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine (Focetria, Novartis, Siena, Italy). Patients from the 2010–2011 and 2011–2012 influenza seasons received the trivalent nonadjuvant inactivated vaccine (Gripovac, Sanofi-Pasteur MSD, Madrid, Spain) containing the following strains: A/California/7/2009-H1N1, A/Perth/16/2009-H3N2 and B/Brisbane/60/2008. Patients from the 2012–2013 influenza season received one dose of the trivalent nonadjuvant inactivated vaccine (Mutagrip, Sanofi-Pasteur MSD) with the following strains: A/California/7/2009-H1N1, A/Victoria/361/2011-H3N2 and B/Wisconsin/1/2010. Adverse events were assessed according to established criteria [14].

### Microneutralization assay

Microneutralization assays were performed as previously described [1,15] with some modifications (Supplementary Materials). The average absorbance (A450) from the quadruplicate wells of virus-infected (VC) and uninfected (CC) control wells was determined, and the neutralizing endpoint was determined by using a 50% specific signal calculation. The end point titre was expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum with an A450 value less than  $x$ , where  $x = [(average\ A450\ of\ VC\ wells) - (average\ A450\ of\ CC\ wells)] / 2$ . Sera were considered positive if titres were  $\geq 40$  obtained in at least two independent assays. Vaccination efficacy parameters were as follows: geometric mean titre (GMT), defined as mean antibody titre in the group of vaccinated individuals; seroprotection rate as percentage of subjects with antibody titre  $\geq 1:40$ ; seroconversion rate as percentage of subjects with a fourfold increase in antibody titres from baseline; and geometric mean ratio, defined as seroconversion factor after vaccination to before vaccination.

### Statistical analysis

Patients were grouped by timing of influenza vaccination after transplantation into two groups, early and late. Patients in the early group received the influenza vaccine less than 6 months after transplantation, and patients in the late group received the influenza vaccine more than 6 months after transplantation. A descriptive statistical analysis was performed. Continuous variables were expressed as median and interquartile range or mean  $\pm$  standard deviation if adjusted to normal distribution, and evaluated by Shapiro-Wilk or Kolmogorov-Smirnov tests when appropriate. The main primary outcome for the analysis was seroprotection. Secondary outcomes were seroconversion, GMT after vaccination, safety and clinical effectiveness. For bivariate analysis, the chi-square test, Fisher's exact test or the McNemar test were used for categorical variables, and Bonferroni correction was applied when appropriate. For quantitative variables, the Mann-Whitney test or Student's *t* test were used. If the variance was not homogeneous (Levene test), the Welch test was applied (ANOVA). For multivariate analysis, mixed-effects regression models were performed to control the effect of time since transplantation with possible confounding variables. Factors associated in the bivariate analysis and those considered clinically relevant were included in the models. For immunogenicity analysis, the geometric mean antibody titres at each time point were used. Relative risk and 95% confidence interval (CI) were calculated by taking the exponent of natural logarithm of the mean and 95% CI. Results were analyzed by PASW Statistic 18.0.1 software. Statistical significance was established as a *p* value of  $< 0.05$ . All reported *p* values were based on two-tailed tests.

## Results

### Patient characteristics

A total of 798 SOTR (38.8% liver, 41.7% kidney, 19.4% heart) were included in the study. The early vaccination group was composed of 130 patients (16.2%) (median time to vaccination, 4.7 months, interquartile range 3.5–5.7 months) and 668 SOTR (83.8%) were in the late vaccination group (median time to vaccination, 44.5 months, interquartile range 18.4–96.1 months). Patients were more frequently men (69.8%), and the median age was 56 years (interquartile range 47.0–63.0 years). The type of transplant was liver in 333 cases (41.7%), kidney in 310 (38.8%) and heart in 155 (19.4%). Comorbidities appeared in 80.5% of cases, with diabetes mellitus and chronic heart disease being the most frequent (Table 1).

### Baseline antibody titres

At baseline, 393 patients (49.2%) had preexisting antibody titres for A/(H1N1)pdm, 345 (70.3%) for influenza A/H3N2 and 392 (79.8%) for influenza B. Prevacination antibody titres and GMT were significantly higher in the early vaccination group for influenza A/(H1N1)pdm and influenza B (Table 2).

### Immunologic response to vaccination

Overall, there were no significant differences in the rate of seroprotection between patients in the early or late vaccination groups. The respective seroprotection rates for influenza A/(H1N1)pdm were 73.1% vs. 76.5% (*p* 0.49), 67.5% vs. 74.1% for influenza A/H3N2 (*p* 0.17) and 84.2% vs. 85.2% for influenza B (*p* 0.80). After vaccination, the proportion of seroprotected patients before and after vaccination changed significantly (*p*  $< 0.001$ ) in both cohorts for the three viruses studied (Supplementary Table 1).

GMT after transplantation was similar (*p*  $> 0.05$ ) for the early and late vaccination groups, respectively, as follows: 117.32 (81.52–168.83) vs. 87.43 (72.87–104.91) for influenza A/(H1N1)pdm, 120.45 (82.17–176.57) vs. 97.86 (81.34–117.44) for influenza A/H3N2 and 143.32 (103.46–198.53) vs. 145.54 (122.35–174.24) (Table 2).

Immunologic response to vaccination was also analyzed excluding patients with seroprotection at baseline. In these patients, the seroconversion rates in the early and late vaccination groups were, respectively, as follows: 61.1% and 71.6% (*p* 0.048) for A/(H1N1)pdm, 46.4% and 57.9% (*p* 0.18) for A/H3N2 and 85.7% and 78.0% (*p* 0.26) for influenza B.

No differences were observed when we analyzed the immune response according to transplanted organ (Supplementary Table 2).

In the early vaccination group of 130 SOTR, the seroprotection rate was similar among patients stratified according to the

**TABLE 1.** Characteristics, comorbidities and background of solid organ transplant recipients receiving influenza vaccinations between 2009 and 2013

Variable	Total (n = 798)	Early group (n = 130)	Late group (n = 668)	RR (95% CI)/ $\beta$ coefficient (95% CI)
Cohort				
2009–2010	284 (35.5)	14 (10.7)	270 (40.4)	0.26 (0.16, 0.44)
2010–2011	95 (11.9)	10 (7.6)	85 (12.7)	0.60 (0.32, 1.13)
2011–2012	88 (11.0)	24 (18.4)	64 (9.5)	1.92 (1.25, 2.96)
2012–2013	331 (41.4)	82 (63.0)	249 (37.2)	1.35 (1.48, 1.64)
Male sex	557 (69.8)	94 (72.3)	463 (69.3)	0.80 (0.65, 0.98)
Age (years), median (range)	56.0 (47.0–63.0)	54.0 (44.0–62.0)	56.0 (47.0–56.0)	-0.001 (-0.003, 0.001)
Type of transplant				
Kidney	310 (38.8)	45 (34.6)	265 (39.7)	1.4 (1.12, 1.73)
Liver	333 (41.7)	77 (59.2)	256 (38.3)	1.54 (1.30, 1.83)
Heart	155 (19.4)	8 (6.2)	147 (22.0)	0.19 (0.09, 0.38)
Immunosuppressive therapy				
Tacrolimus	559 (70.1)	113 (86.9)	446 (66.8)	2.08 (1.89, 2.29)
Mycophenolate mofetil	605 (75.8)	101 (77.6)	504 (75.6)	1.06 (0.95, 1.17)
Cyclosporine	159 (19.9)	10 (7.7)	149 (22.3)	0.34 (0.18, 0.63)
mTOR inhibitors	106 (13.3)	7 (5.4)	99 (14.8)	0.36 (0.17, 0.76)
Antibody induction	63 (7.8)	37 (29.1)	26 (3.9)	7.31 (4.59, 11.6)
Comorbidity				
Chronic liver disease	91 (11.4)	10 (7.7)	81 (12.1)	0.63 (0.33, 1.19)
Diabetes mellitus	196 (24.5)	22 (16.9)	176 (26.3)	0.64 (0.43, 0.95)
Chronic heart disease	162 (20.3)	27 (20.8)	135 (20.2)	1.02 (0.71, 1.48)
Chronic kidney disease	150 (18.8)	14 (10.8)	136 (20.4)	0.52 (0.31, 0.88)
Hypogammaglobulinemia	131 (16.4)	35 (29.2)	96 (16.5)	1.87 (1.33, 2.62)
Previous season influenza vaccination	539 (67.5)	83 (63.6)	456 (69.5)	0.93 (0.81, 1.07)
Cohort 2009–2010	166 (58.4)	5 (35.7)	161 (59.6)	1.07 (0.72, 1.61)
Cohort 2010–2011	70 (73.6)	6 (60.0)	64 (75.3)	0.79 (0.47, 1.34)
Cohort 2011–2012	79 (89.7)	19 (79.2)	60 (93.8)	0.84 (0.68, 1.04)
Cohort 2012–2013	223 (67.3)	52 (64.2)	171 (72.2)	0.88 (0.74, 1.06)

Data are presented as n (%) unless otherwise indicated. Parameters were compared by multiple comparison chi-square test or linear regression. CI, confidence interval; RR, relative risk.

months elapsed since transplantation (Supplementary Table 3). Of them, 21 patients (16.1%) were vaccinated within the first 3 months after receiving the transplant, with postvaccination seroprotection rates of 80.0% for influenza A(H1N1)pdm, 76.1% for influenza A/H3N2 and 76.1% for influenza B, and with seroconversion rates of 71.4% for influenza A(H1N1)pdm,

47.6% for influenza A/H3N2 and 42.8% for influenza B. These parameters were not different from those vaccinated afterward.

Time since transplantation to vaccination (early vs. late), when controlled for other possible confounding factors, did not contribute to explain the variability of the seroprotection after vaccination or the GMT after vaccination for all virus types

**TABLE 2.** Antibody response against influenza A(H1N1)pdm, A/H3N2 and B virus according to time from transplant to vaccination

Variable	Early group	Late group	p	RR (95% CI)/ $\beta$ coefficient (95% CI)
Baseline seroprotection rate, n (%)				
A(H1N1)pdm	60 (46.2)	226 (33.8)	0.007	1.36 (1.10, 1.68)
A/H3N2	51 (44.7)	166 (44.5)	0.947	1.15 (0.89, 1.47)
B	78 (68.4)	182 (52.0)	0.002	1.53 (1.27, 1.83)
Postvaccine seroprotection rate, n (%)				
A(H1N1)pdm	95 (73.1)	507 (76.5)	0.494	0.96 (0.86, 1.07)
A/H3N2	77 (67.5)	277 (74.1)	0.172	0.99 (0.84, 1.16)
B	96 (84.2)	299 (85.2)	0.800	1.14 (1.01, 1.29)
Seroconversion rate, n (%)				
A(H1N1)pdm	68 (52.3)	379 (56.7)	0.352	0.92 (0.77, 1.10)
A/H3N2	53 (46.5)	175 (46.9)	0.936	1.13 (0.89, 1.44)
B	45 (39.5)	179 (51.1)	0.030	0.89 (0.69, 1.16)
GMT (95% CI)				
A(H1N1)pdm				
Baseline	32.59 (23.59, 45.03)	31.93 (26.33, 38.73)	0.000	0.02 (0.01, 0.04)
After vaccination	117.32 (81.52, 168.83)	87.43 (72.87, 104.91)	0.287	0.008 (-0.007, 0.02)
A/H3N2 (95% CI)				
Baseline	34.59 (24.01, 49.82)	27.33 (22.92, 32.59)	0.109	0.01 (-0.004, 0.03)
After vaccination	120.45 (82.17, 176.57)	97.86 (81.34, 117.44)	0.140	0.01 (-0.005, 0.030)
B (95% CI)				
Baseline	54.19 (40.62, 72.28)	34.94 (29.54, 39.80)	0.002	0.03 (0.01, 0.06)
After vaccination	143.32 (103.46, 198.53)	145.54 (122.35, 174.24)	0.741	0.004 (-0.01, 0.02)
GMR (95% CI)				
A(H1N1)pdm	3.59 (2.47, 5.23)	2.73 (2.23, 3.35)	0.051	-0.01 (-0.02, 0.00)
A/H3N2	3.48 (2.50, 4.84)	3.58 (2.90, 4.14)	0.921	-0.001 (-0.02, 0.01)
B	2.64 (1.82, 3.83)	4.16 (3.39, 5.10)	0.039	-0.02 (-0.04, -0.001)

Parameters were compared by multiple comparison chi-square test or linear regression. CI, confidence interval; GMT, geometric mean titre; GMR, geometric mean ratio; RR, relative risk.

studied in mixed-effects regression models (Tables 3–5). The presence of baseline antibody titres was associated with higher rates of seroprotection for all three types of influenza viruses: 79.8% vs. 71.6% for influenza A/(H1N1)pdm ( $p < 0.01$ ), 79.9% vs. 55.2% for influenza A/H3N2 ( $p < 0.001$ ) and 89.3% vs. 67.7% for influenza B ( $p < 0.001$ ), as well as higher posttransplant GMT: 134.03 vs. 83.71 for influenza A/(H1N1)pdm ( $p < 0.001$ ), 126.03 vs. 53.65 for influenza A/H3N2 ( $p < 0.001$ ) and 164.37 vs. 99.34 for influenza B ( $p < 0.002$ ; Tables 3–5).

Kidney transplant recipients had lower seroprotection rates compared to liver transplant recipients to influenza A/(H1N1)pdm (odds ratio (OR) 0.60, 95% CI 0.38, 0.94) and influenza A/H3N2 (OR 0.34 95% CI 0.19, 0.62). Patients with heart transplants had a lower seroprotection rate for influenza A/H3N2 (OR 0.37 95% CI 0.17, 0.79) and influenza B (OR 0.28 95% CI 0.11, 0.68) compared to liver transplant recipients (Tables 3–5).

#### Clinical failure to influenza vaccine

Nine patients (1.1%) were diagnosed with influenza disease a median of 35 days after vaccination (range 8–73 days), and 5 (55%) were admitted to hospital. Eight patients were in the late vaccination group (88.8%) and one in the early vaccination group ( $p < 0.1$ ). All patients had mild symptoms, and none developed graft rejection, died or required intensive care (Supplementary Table 4).

#### Vaccination safety

One kidney recipient vaccinated 118 months after transplantation (influenza season 2012–2013) was diagnosed with chronic graft rejection 83 days after receipt of the transplant. The decrease in creatinine clearance started before vaccination

and was chronologically related to the onset of rifampicin therapy administered to treat miliary tuberculosis.

No other adverse events were detected in patients in the early or late vaccination groups.

## Discussion

The present study shows that influenza vaccination of SOTR is safe and effective after the first month after transplantation, with a rate of seroprotection and GMT similar to that obtained in patients vaccinated after 6 months since transplantation.

The response to influenza vaccination in the transplant population ranges from 15% to 90% [1,10,15–24]. Factors such as lung transplant [18,25] and use of immunosuppressants (mycophenolate mofetil or mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors) [1,6,16] have been related to decreased antibody response. However, it remains unresolved whether the strong immunosuppressive regimens provided in the first months after transplantation affect the response to influenza vaccine. While Lawal et al. [9] described that only 1 (14%) of 7 patients receiving the influenza vaccine within 4 months after liver transplantation responded to vaccination, Birdwell et al. [10] concluded that the protection achieved was similar between the 19 kidney transplant recipients who received the vaccine less than 6 months after transplantation compared to the 34 patients vaccinated more than 6 months after transplantation. A recent randomized study, comparing intradermal versus intramuscular influenza vaccination in a cohort of 212 SOTR, found an association in the univariate but not in the multivariate analysis between receiving the vaccine before 6 months since transplantation with a poor vaccine response [6].

**TABLE 3.** Mixed-effects regression model of factors influencing postvaccine seroprotection and GMT response to influenza A(H1N1)pdm grouped by time since transplantation<sup>a</sup>

Variable	Postvaccine seroprotection <sup>b</sup>		Postvaccine GMT <sup>c</sup>	
	OR (95% CI)	p	$\beta$ 1 coefficient (95% CI)	p
Age (years)	0.99 (0.98, 1.01)	0.43	0.001 (–0.009, 0.012)	0.81
Male (yes vs. no)	0.99 (0.67, 1.46)	0.94	0.19 (–0.09, 0.47)	0.19
Type of transplant				
Liver	Reference		Reference	
Kidney	0.60 (0.38, 0.94)	0.03	–0.43 (–0.74, –0.12)	0.006
Heart	0.76 (0.42, 1.38)	0.37	–0.37 (–0.76, 0.04)	0.07
Use of mTOR (yes vs. no)	1.37 (0.75, 2.51)	0.31	0.05 (–0.35, 0.44)	0.82
Diabetes (yes vs. no)	1.11 (0.71, 1.73)	0.66	–0.07 (–0.39, 0.24)	0.64
Hypogammaglobulinemia (yes vs. no)	0.72 (0.46, 1.12)	0.15	–0.32 (–0.65, 0.01)	0.06
Chronic kidney disease (yes vs. no)	0.98 (0.62, 1.55)	0.95	0.02 (–0.31, 0.34)	0.91
Chronic liver disease (yes vs. no)	0.80 (0.44, 1.46)	0.47	–0.09 (–0.52, 0.33)	0.67
Previous season vaccine (yes vs. no)	0.98 (0.65, 1.48)	0.94	–0.10 (–0.39, 0.19)	0.51
Baseline antibody titre (yes vs. no)	1.68 (1.15, 2.45)	0.01	0.55 (0.29, 0.81)	<0.001

CI, confidence interval; GMT, geometric mean titre; mTOR, mammalian target of rapamycin; OR, odds ratio.

<sup>a</sup>Group variable: time since transplant 2 to 6 months. Standard deviation: <sup>b</sup>1.59 × 10<sup>–10</sup> and <sup>c</sup>2.73 × 10<sup>–10</sup>.

**TABLE 4.** Mixed-effects regression model of factors influencing postvaccine seroprotection and GMT response to influenza A/H3N2 grouped by time since transplantation<sup>a</sup>

Variable	Postvaccine seroprotection <sup>b</sup>		Postvaccine GMT <sup>c</sup>	
	OR (95% CI)	p	β1 coefficient (95% CI)	p
Age	0.98 (0.96, 1)	0.08	-0.01 (-0.03, 0.004)	0.17
Male (yes vs. no)	1.21 (0.73, 2.01)	0.46	0.14 (-0.22, 0.5)	0.45
Type of transplant				
Liver	Reference		Reference	
Kidney	0.34 (0.19, 0.62)	<0.001	-0.61 (-1.01, -0.21)	0.003
Heart	0.37 (0.17, 0.79)	0.01	-0.59 (-1.15, -0.04)	0.04
Use of mTOR (yes vs. no)	1.48 (0.66, 3.34)	0.34	0.09 (-0.46, 0.64)	0.74
Diabetes (yes vs. no)	0.98 (0.55, 1.73)	0.95	-0.13 (-0.53, 0.27)	0.53
Hypogammaglobulinemia (yes vs. no)	0.92 (0.54, 1.58)	0.780	-0.22 (-0.63, 0.19)	0.294
Chronic kidney disease (yes vs. no)	1.44 (0.74, 2.8)	0.29	0.37 (-0.1, 0.83)	0.12
Chronic liver disease (yes vs. no)	1.68 (0.74, 3.8)	0.21	0.53 (0.01, 1.05)	0.05
Previous season vaccine (yes vs. no)	1.24 (0.71, 2.15)	0.45	0.03 (-0.38, 0.44)	0.88
Baseline antibody titre (yes vs. no)	4.22 (2.56, 6.95)	<0.001	0.97 (0.6, 1.34)	<0.001

CI, confidence interval; GMT, geometric mean titre; mTOR, mammalian target of rapamycin; OR, odds ratio.

<sup>a</sup>Group variable: time since transplant 2 to 6 months. Standard deviation: <sup>b</sup>2.89 × 10<sup>-10</sup> and <sup>c</sup>2.10 × 10<sup>-10</sup>.

However, the number of patients vaccinated less than 6 months from transplantation was not specified.

It is crucial to define the correct time for influenza vaccination in transplant recipients. Thus, a delay in vaccination after transplantation may lead to vulnerability of transplant recipients to influenza infection, a period during which recipients are especially susceptible to influenza-related complications. As previously mentioned, little evidence is available regarding the immunogenicity of influenza vaccination within the first months after solid organ transplantation [2,4,5,9,10].

To our knowledge, the results presented here represent the largest cohort of SOTR receiving influenza vaccination within the first 6 months after receiving a transplant. We found that receiving the vaccine within 6 months after transplantation was not associated with a poor vaccine response when controlling

for other possible confounding variables. The same findings were observed when only patients vaccinated during the first 3 months receiving a transplant were considered.

Nonseroprotected patients at baseline in the early post-transplantation group had a seroconversion rate that did not differ from those vaccinated thereafter. Previous results suggested that having baseline seroprotection promoted significantly higher GMT after vaccination compared to patients without baseline titres [15]. Patients vaccinated within the first 6 months after transplantation had significantly higher baseline titres for influenza A(H1N1)pdm and influenza B, probably as a result of the remaining long-term influenza antibodies from the previous year's influenza vaccination. This finding, which to our knowledge has not been previously described, highlights the importance of vaccinating patients on transplant waiting lists or

**TABLE 5.** Mixed-effects regression model of factors influencing postvaccine seroprotection and GMT response to influenza B grouped by time since transplantation<sup>a</sup>

Variable	Postvaccine seroprotection <sup>b</sup>		Postvaccine GMT <sup>c</sup>	
	OR (95% CI)	p	β1 coefficient (95% CI)	p
Age	0.98 (0.96, 1.01)	0.2	-0.02 (-0.03, -0.01)	0.004
Male (yes vs. no)	0.95 (0.50, 1.79)	0.86	0.06 (-0.28, 0.40)	0.73
Type of transplant				
Liver	Reference		Reference	
Kidney	0.59 (0.28, 1.26)	0.18	-0.73 (-1.10, -0.35)	<0.001
Heart	0.28 (0.11, 0.68)	0.005	-1.02 (-1.56, -0.48)	<0.001
Use of mTOR (yes vs. no)	1.23 (0.47, 3.19)	0.67	0.11 (-0.41, 0.63)	0.67
Diabetes (yes vs. no)	1.22 (0.57, 2.61)	0.61	0.05 (-0.33, 0.44)	0.79
Hypogammaglobulinemia (yes vs. no)	1.12 (0.53, 2.39)	0.76	-0.04 (-0.44, 0.36)	0.84
Chronic kidney disease (yes vs. no)	1.48 (0.64, 3.41)	0.36	0.24 (-0.19, 0.67)	0.27
Chronic liver disease (yes vs. no)	1.22 (0.47, 3.13)	0.68	0.15 (-0.34, 0.64)	0.54
Previous season vaccine (yes vs. no)	0.60 (0.27, 1.30)	0.2	-0.06 (-0.43, 0.31)	0.75
Antibodies titre baseline (yes vs. no)	5.46 (2.82, 10.55)	<0.001	0.61 (0.22, 0.99)	0.002

CI, confidence interval; GMT, geometric mean titre; mTOR, mammalian target of rapamycin; OR, odds ratio.

<sup>a</sup>Group variable: time since transplant 2 to 6 months. Standard deviation: <sup>b</sup>0.198 × 10<sup>-10</sup> and <sup>c</sup>6.24 × 10<sup>-11</sup>.

with end-organ disease to improve their immunogenicity against influenza infection after transplantation.

The response to influenza vaccination had also been related to the type of virus included in the formulation, showing lower responses to influenza B [26] and responses that varied from 25.3% to 92.7% to different subtypes of influenza A virus [16,26,27]. In the present study, although there were some mild differences, overall, the response was similar within both cohorts for the three influenza strains across different influenza seasons.

A controversy concerning the risk of allograft rejection triggered by the immune response against the influenza vaccine has been raised in this population, with the rationale being that while the immunosuppression may diminish the immunogenicity of vaccination, influenza vaccination may stimulate a T cell response leading to organ rejection, which might be especially relevant in the early stages after receiving a transplant [28]. Previous studies involving SOTR receiving seasonal influenza vaccine did not find this relationship [16,19,28]. In our cohort, one patient (in the late vaccination group) experienced graft rejection after influenza vaccination. However, this patient had other possible causes of rejection, such as low immunosuppressive drug levels. In addition, episodes of acute allograft rejection and permanent graft dysfunction have also been related to seasonal and pandemic influenza virus infection [5,29,30].

Some limitations of the study need to be mentioned. First, some episodes of asymptomatic rejection might have not been diagnosed because routine biopsies were not performed. However, during patient follow-up, complications, including clinical evidence of rejection, were not detected. Second, asymptomatic influenza infection might have not been diagnosed. However, the extent to which these nonsymptomatic episodes may be related to the administration of the vaccine it is unknown. Third, although the number of patients who received the vaccine during the first 3 months might seem small, this is the largest reported series of patients vaccinated within the first 3 months of transplantation. Fourth, because only few patients received lymphocyte-depleting antibodies or rituximab therapy, our results may not be applicable to patients with this immunosuppression regimen. Finally, although the number of heart recipients vaccinated in the early vaccination group was small, influenza vaccine was safe for all patients, and the rate of seroprotection was above 67% for all influenza strains.

In summary, the results of the present study show that influenza vaccination is as safe and immunogenic in patients within the first 6 months after kidney and liver transplantation as in those vaccinated after 6 months since transplantation. Given the immunologic response, the lack of severe adverse

events and the high rate of complications of influenza infection in the early posttransplantation period, administration of the influenza vaccine can be recommended as soon as 1 month after transplantation. In addition, compliance of pre-transplantation annual seasonal influenza vaccination in patients with end-organ disease should be pursued in order to promote better influenza immunologic protection early after transplantation.

### Transparency Declaration

This study was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (grants EC11-456 and GR09/0041), and cofinanced by European Development Regional Fund 'A Way to Achieve Europe' ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). A portion of this work was previously presented at the 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain. All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

### Acknowledgements

Other authors in the Influenza Vaccine in Solid Organ Transplant Recipient Study Group (REIPI-GESITRA): From University Hospital Virgen del Rocío-IBIS: J. M. Alamo, A. Gasch, M. A. Gentil-Govantes, F. J. Molina-Ortega, E. Lage, J. Martínez-Atienza, M. Sánchez, C. Rosso. From University Hospital Reina Sofía-IMIBIC-UCO, Córdoba, Spain: J. M. Arizón, M. Agüera, S. Cantisán, J. L. Montero, A. Páez, A. Rodríguez, S. Santos, E. Vidal. From Val d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain: C. Berasategui, M. Campins, M. López-Meseguer, B. Saez. From Clinic Hospital, Barcelona, Spain: M. A. Marcos, G. Sanclemente. From University Hospital Cruces, Bilbao, Spain: N. Diez, J. Goikoetxea. From University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain: F. Casafont, M. Cobo-Beláustegy, R. Durán, E. Fábrega-García, S. Fernández-Rozas, C. González-Rico, F. Zurbarano-Goñi. From University Hospital Bellvitge-IDIBELL, University of Barcelona, Barcelona, Spain: M. Bodro, J. Niubó, S. Oriol, N. Sabé. From General University Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain: F. Anaya, E. Bouza, P. Catalán, P. Diez, A. Eworo, M. Kestler, P. Lopez-Roa, D. Rincón, M. Rodríguez, M. Salcedo, Y. Sousa, M. Valerio. From University Hospital Virgen Macarena, Seville, Spain: I. Morales-Barroso. From University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain: J. M. Aguado, J. Origen.

The authors thank other members of the laboratory and the staff members of the participating hospitals, whose collaboration was crucial to make this study possible. The authors thank

M. McConnell for critical reading, and I. Casas (National Centre of Microbiology) and M. Pérez Ruiz (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves) for providing the influenza strains.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.07.014>.

## References

- [1] Cordero E, Perez-Ordóñez A, Aydiillo TA, et al. Therapy with m-TOR inhibitors decreases the response to the pandemic influenza A H1N1 vaccine in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2011;11: 2205–13.
- [2] Danziger-Isakov L, Kumar D. Guidelines for vaccination of solid organ transplant candidates and recipients. *Am J Transplant* 2009;9(Suppl. 4): S258–62.
- [3] Lopez-Medrano F, Cordero E, Gavalda J, et al. Management of influenza infection in solid-organ transplant recipients: consensus statement of the Group for the Study of Infection in Transplant Recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31: 526 e1–526 e20.
- [4] Kumar D, Morris MI, Kotton CN, et al. Guidance on novel influenza A/H1N1 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2010;10: 18–25.
- [5] Cordero E, Pérez-Romero P, Moreno A, et al. Pandemic influenza A (H1N1) virus infection in solid organ transplant recipients: impact of viral and non-viral co-infection. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:67–73.
- [6] Danziger-Isakov L, Kumar D. Vaccination in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13(Suppl. 4):311–7.
- [7] Manuel O, Lopez-Medrano D, Kaiser L, et al. for ESCMID; Study Group of Infection in Compromised Hosts (ESGICH). Influenza and other respiratory virus infections in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:102–8.
- [8] Fisman DN, Abrutyn E, Spaude KA, Kim A, Kirchner C, Daley J. Prior pneumococcal vaccination is associated with reduced death, complications, and length of stay among hospitalized adults with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2006;42:1093–101.
- [9] Lawal A, Basler C, Branch A, Gutiérrez J, Schwartz M, Schiano TD. Influenza vaccination in orthotopic liver transplant recipients: absence of post administration ALT elevation. *Am J Transplant* 2004;4:1805–9.
- [10] Birdwell KA, Ikizler MR, Sannella EC, et al. Decreased antibody response to influenza vaccination in kidney transplant recipients: a prospective cohort study. *Am J Kidney Dis* 2009;54:112–21.
- [11] Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987;40:373–83.
- [12] Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2012;12:563–70.
- [13] Andrassy KM. Comments on 'KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease.'. *Kidney Int* 2013;84:622–3.
- [14] Greenberg ME, Lai MH, Hartel GF, et al. Response to a monovalent 2009 influenza A (H1N1) vaccine. *N Engl J Med* 2009;361:2405–13.
- [15] Cordero E, Aydiillo TA, Perez-Ordóñez A, et al. Deficient long-term response to pandemic vaccine results in an insufficient antibody response to seasonal influenza vaccination in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2012;93:847–54.
- [16] Scharpe J, Evenepoel P, Maes B, et al. Influenza vaccination is efficacious and safe in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2008;8: 332–7.
- [17] Candon S, Thervet E, Lebon P, et al. Humoral and cellular immune responses after influenza vaccination in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9:2346–54.
- [18] Manuel O, Humar A, Chen MH, et al. Immunogenicity and safety of an intradermal boosting strategy for vaccination against influenza in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2007;7:2567–72.
- [19] Sanchez-Fruitoso AI, Prats D, Naranjo P, et al. Influenza virus immunization effectiveness in kidney transplant patients subjected to two different triple-drug therapy immunosuppression protocols: mycophenolate versus azathioprine. *Transplantation* 2000;69:436–9.
- [20] Blumberg EA, Albano C, Pruett T, et al. The immunogenicity of influenza virus vaccine in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996;22:295–302.
- [21] Soesman NM, Rimmelzwaan GF, Nieuwkoop NJ, et al. Efficacy of influenza vaccination in adult liver transplant recipients. *J Med Virol* 2000;61:85–93.
- [22] Admon D, Engelhard D, Strauss N, Goldman N, Zakay-Rones Z. Antibody response to influenza immunization in patients after heart transplantation. *Vaccine* 1997;15:1518–22.
- [23] Grekas D, Alivannis P, Kiriazopoulou V, et al. Influenza vaccination on renal transplant patients is safe and serologically effective. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1993;31:553–6.
- [24] Meyer S, Adam M, Schweiger B, et al. Antibody response after a single dose of an AS03-adjuvanted split-virion influenza A (H1N1) vaccine in heart transplant recipients. *Transplantation* 2011;91:1031–5.
- [25] Siegrist CA, Ambrosioni J, Bel M, et al. Responses of solid organ transplant recipients to the AS03-adjuvanted pandemic influenza vaccine. *Antivir Ther* 2012;17:893–903.
- [26] Salles MJ, Sens YA, Boas LS, Machado CM. Influenza virus vaccination in kidney transplant recipients: serum antibody response to different immunosuppressive drugs. *Clin Transplant* 2010;24:E17–23.
- [27] Fraund S, Wagner D, Pethig K, Drescher J, Girgsdies OE, Haverich A. Influenza vaccination in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:220–5.
- [28] Kunisaki KM, Janoff EN. Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect Dis* 2009;9:493–504.
- [29] Zapata R, Uribe M, Martínez W, Andrade A, Leal JL, Gómez F. Severe novel H1N1 influenza A infection in the immediate postoperative period of a liver transplant patient. *Liver Transpl* 2010;16:447–52.
- [30] Vilchez R, McCurry K, Dauber J, et al. Influenza and parainfluenza respiratory viral infection requiring admission in adult lung transplant recipients. *Transplantation* 2002;73:1075–8.

---

## Supplementary Material and Methods

**Microneutralization assay.** Twofold serial dilutions of the inactivated human sera (from 1:5 to 1:2560) were incubated for 2 h at 37° C with a multiplicity of infection (MOI) of 0.25 of the influenza A/California/7/2009 (H1N1) virus, 0.3 MOI of A/Perth/16/2009-H3N2 (H3N2 strain), 1.4 MOI of A/Victoria/361/2011-H3N2 (H3N2 strain), and 0.05 MOI of B/Brisbane/60/2008-like (B strain). Four wells with infected cells were used as positive controls and only cells were used as negative controls.

One hundred microliters containing  $1.5 \times 10^5$  Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells/ml were added to each well of a 96-well dish and incubated for 24 h at 37°C. Primary antibodies for influenza A nucleoprotein (Anti-influenza A nucleoprotein Bioporto Bionova, Gentofte, Denmark) diluted 1:1500 or influenza B nucleoprotein (Anti-influenza B nucleoprotein Bioporto from Bionova, Gentofte, Denmark) diluted 1/1000 were used, followed by a HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody diluted 1:1,000 (Sigma-Aldrich). One-hundred microliters of peroxidase substrate (3, 3', 5, 5'-Tetramethyl-benzidine substrate, supersensitive, for ELISA; Sigma-Aldrich) was added to each well and absorbance was measured at 450 nm.

**Supplementary Table 1.** Changes in seroprotection according to the time since transplantation.

	Early group			Late group		
	Baseline seroprotection	Post-vaccination seroprotection	P	Baseline seroprotection	Post-vaccination seroprotection	P
<b>Influenza A/(H1N1)pdm-n (%)</b>	60 (46.2)	95 (73.1)	<0.001	326 (33.8)	507 (76.5)	<0.001
<b>Influenza A/ H3N2-n (%)</b>	51 (44.7)	77 (67.5)	<0.001	166 (44.5)	277 (74.1)	<0.001
<b>Influenza B-n (%)</b>	78 (68.4)	96 (84.2)	<0.001	182 (52.0)	299 (85.1)	<0.001

Parameters were statistically compared using a McNemmar model.

**Supplementary Table 2.** Antibody response against influenza A/(H1N1)pdm, A/H3N2 and B virus according to the transplanted organ.

Variable	Liver			Kidney			Heart		
	Early group	Late group	P	Early group	Late group	P	Early group	Late group	P
<b>Baseline Seroprotection rate–n (%)</b>									
A/(H1N1)pdm	22 (48.9)	100 (37.7)	0.157	35 (45.5)	86 (33.6)	0.058	3 (37.5)	401 (27.7)	0.525
A/H3N2	19 (46.3)	82 (50.6)	0.625	30 (45.5)	68 (44.4)	0.89	2 (28.6)	16 (27.1)	0.935
B	30 (73.2)	83 (55.7)	0.044	44 (66.7)	85 (57.4)	0.202	4 (57.1)	14 (26.4)	0.095
<b>Postvaccine seroprotection rate–n (%)</b>									
A/(H1N1)pdm	35 (77.8)	217 (81.9)	0.513	55 (71.4)	181 (70.7)	0.902	5 (62.5)	109 (74.1)	0.467
A/H3N2	33 (80.5)	135 (83.3)	0.667	41 (52.1)	104 (68.0)	0.401	3 (42.9)	38 (64.4)	0.266
B	35 (85.4)	135 (92.0)	0.198	55 (83.3)	125 (84.5)	0.835	6 (85.7)	36 (67.9)	0.334
<b>Seroconversion rate–n (%)</b>									
A/(H1N1)pdm	28 (62.2)	154 (58.1)	0.605	37 (48.1)	135 (52.7)	0.471	3 (37.5)	90 (61.2)	0.182
A/H3N2	24 (58.5)	81 (50.0)	0.328	28 (42.2)	64 (42.1)	0.965	1 (14.3)	30 (50.8)	0.067
B	35 (85.4)	138 (92.0)	0.198	26 (39.4)	62 (41.9)	0.732	6 (85.7)	36 (67.9)	0.334
<b>GMT (95% CI)</b>									
<b>A/(H1N1)pdm</b>									
Baseline	36.7 (22.1,60.9)	40.6 (26.3,56.2)	0.086	31.9 (20.2,50.6)	30.1 (22.8,39.7)	0.016	17.8 (4.3,73.1)	19.2 (12.7,29.0)	0.930
Postvaccination	135.2 (110.0,166.5)	180.9 (107.6,304.5)	0.289	100.0 (61.5,162.7)	61.2 (46.4,80.7)	0.374	50.39 (4.1,617.5)	58.4 (2.3,73.1)	0.182
<b>A/H3N2</b>									
Baseline	38.6 (20.4,73.0)	36.7 (26.9,50.2)	0.745	32.7 (20.5,52.3)	24.7 (19.5,31.3)	0.163	28.3 (2.5,319.2)	15.6 (10.9,22.1)	0.183
Postvaccination	177.5 (99.4,317.1)	137.7 (103.0,184.1)	0.309	100.0 (59.4,168.2)	74.0 (56.3,97.3)	0.213	56.59 (3.5,920.0)	80.0 (49.7 ,128.7)	0.937
<b>B</b>									
Baseline	66.3 (40.2,108.7)	38.7 (29.9,50.0)	0.024	61.2 (34.9,74.9)	40.0 (30.7,52.1)	0.165	25.2 (7.0,90.1)	18.2 (12.4,26.9)	0.175
Postvaccination	239.3 (184.4,310.6)	239.3 (184.4,310.6)	0.695	131.5 (85.8,201.5)	108.0 (85.2,136.9)	0.429	44.9 (10.9,184.2)	81.0 (48.4,135.6)	0.895

GMT, geometric mean titer; GMR, geometric mean ratio. Parameters were compared by multiple comparison chi-square test, or linear regression.

**Supplementary Table 3.** Antibody responses against influenza A/H1N1, A/H3N2 and B virus in solid organ transplant recipients vaccinated in the first six months after transplant.

<b>Variables</b>	<b>Month &lt;3 n=21</b>	<b>Month 4 n=14</b>	<b>Month 5 n=32</b>	<b>Month 6 n=63</b>	<b>P</b>
<b>Baseline seroprotection rate-n (%)</b>					
A/(H1N1)pdm	6 (28.5)	7 (50.0)	15 (46.8)	32 (50.7)	0.25
A/H3N2	11 (52.3)	5 (35.7)	16 (50.0)	19 (30.0)	0.29
B	11 (52.3)	9 (64.2)	22 (68.7)	36 (57.1)	0.70
<b>Postvaccine seroprotection rate-n (%)</b>					
A/(H1N1)pdm	17 (80.0)	10 (71.1)	21 (65.6)	47(74.6)	0.80
A/H3N2	16 (76.1)	10 (71.1)	20 (62.5)	31 (49.2)	0.05
B	16 (76.1)	11 (78.5)	24 (75.0)	45 (71.4)	0.44
<b>Seroconversion rate-n (%)</b>					
A/(H1N1)pdm	15 (71.4)	7 (50.0)	12 (37.5)	34 (53.9)	0.20
A/H3N2	10 (47.6)	6 (42.8)	16 (50.0)	21 (33.3)	0.60
B	9 (42.8)	5 (35.7)	11 (34.3)	20 (31.7)	0.90

Parameters were statistically compared using a Kruscall-Wallis test,  $p \leq 0.05$  was considered significantly different.

**Supplementary Table 4.** Patients diagnosed of influenza infection after influenza vaccination.

<b>Case</b>	<b>Time from transplant (months)</b>	<b>Type of organ</b>	<b>Influenza season</b>	<b>Days from vaccination to influenza disease</b>	<b>Type of influenza</b>	<b>Seroprotection at 5 weeks</b>	<b>Hospitalization</b>	<b>Influenza severity</b>	<b>Outcome</b>
1	117.4	Kidney	2009-10	-	A(H1N1)-pdm	No	No	Mild	Alive
2	72.5	Kidney	2009-10	8	A(H1N1)-pdm	No	Yes	Mild	Alive
3	85.2	Kidney	2009-10	13	A(H1N1)-pdm	No	Yes	Mild	Alive
4	20.8	Kidney	2009-10	35	A(H1N1)-pdm	No	Yes	Mild	Alive
5	8.2	Kidney	2010-11	35	A(H1N1)-pdm	Yes	No	Mild	Alive
6	39.7	Heart	2010-11	73	A(H1N1)-pdm	Yes	No	Mild	Alive
7	43.2	Liver	2010-11	43	A(H1N1)-pdm	No	No	Mild	Alive
8	23	Kidney	2012-13	54	A(H1N1)-pdm	No	No	Mild	Alive
9	3	Kidney	2012-13	8	B	Yes	Yes	Mild	Alive



## Influenza Vaccination Does not Induce Donor-Specific Anti- HLA Antibodies or Rejection in Solid Organ Transplant Recipients

Journal:	<i>Clinical Microbiology and Infection</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Cordero, Elisa; Hospital Universitario Virgen del Rocío, Infectious Diseases          Bulnes-Ramos, Angel; Instituto de Biomedicina de Sevilla/UNIVERSITY          HOSPITAL VIRGEN DEL ROCIO, Infectious Diseases          Aguilar-Guisado, Manuela; University Hospital Virgen del Rocío, Infectious          Diseases          González-Escribano, M<sup>a</sup> Francisca; Virgen del Rocío University Hospital,          IBIS/CSIC/SAS/University of Seville, Immunology Service          Olivas, Israel; Virgen del Rocío University Hospital,          IBIS/CSIC/SAS/University of Seville, Immunology Service          Torre-Cisneros, Julian; Hospital Universitario Reina Sofia, Sección de          Enfermedades Infecciosas          Gavalda, Joan; Vall d'Hebron University Hospital , Infectious Diseases          Aydillo, Teresa; Instituto de Biomedicina de Sevilla/University Hospital          Virgen del Rocío, Infectious Diseases          Moreno, María Asunción; Hospital Clinic, Infectious Diseases          Montejo, Miguel; Hospital Universitario de Cruces, Infectious Diseases          Service          Fariñas, Maria Carmen; University Hospital Marqués de Valdecilla,          Infectious Diseases          Carratalá, Jordi; Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, University of          Barcelona, Division of Infectious Diseases          Muñoz, patricia; Hospital General Gregorio Marañón, Clinical Microbiology          and Infectious Diseases          Blanes, M; University Hospital La Fe, Infectious Diseases          Fortun, Jesus; Ramon y Cajal Hospital, Infectious Diseases          Suarez-Benjumea, Alejandro; University Hospital Virgen Macarena,          Infectious Diseases          López-Medrano, Francisco; University Hospital 12 de Octubre, Infectious          Diseases Unit          Barranco, JL; Reina Sofia University Hospital-Maimonides Institute for          Biomedical Research , Infectious Diseases          Peghin, Maddalena; Hospital Universitari de Bellvitge, Infectious Diseases          Roca, Cristina; Hospital Universitario Virgen del Rocío, Infectious Diseases          Lara, Rosario; Hospital Universitario Reina Sofia, Sección de Enfermedades          Infecciosas          PEREZ-ROMERO, PILAR; Instituto de Biomedicina de Sevilla/UNIVERSITY</p>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

	HOSPITAL VIRGEN DEL ROCIO, INFECTIOUS DISEASES
Key Words:	cytomegalovirus, anti-HLA antibodies, donor specific antibodies, organ rejection, influenza vaccination
Abstract:	<p>The aim of this study was to determine whether influenza vaccination induces donor specific anti-HLA antibodies (DSA) and graft rejection in solid organ transplant recipients (SOTR). We included 490 SOTR receiving influenza vaccine from 2009-2013: 110 (22.4%) received the pandemic adjuvanted influenza vaccine, 59 (12%) vaccinated within the first six months post-transplantation, 136 (27.7%) received two doses and 185 (37.7%) one dose of seasonal non adjuvanted vaccine more than six months after transplantation. Patients with pre-existing antibodies (15.7% for anti-HLA class I and 15.9% for class II) did not have an increase in reactivity after immunization. Overall, no statistical differences were found in the percentages of patients that developed positive levels of anti-HLA antibodies after immunization using the adjuvanted vaccine, including those receiving the vaccine within the first six months post-transplantation, and no differences were observed based on the type of organ transplanted. However, the percentage of patients positive for anti-HLA class I increased significantly 5 weeks after the second dose compared with 5 weeks after the first dose, 5 (3.8%) vs.18 (14.8%; P=0.003). A group of 75 (14.4%) patients developed de novo anti-HLA antibodies however, only five (1.02%) were DSA, and none experience allograft rejection. Our results suggest that influenza vaccination is not associated with graft rejection in this cohort of SOTR.</p>



1  
2  
3 **Influenza Vaccination Does not Induce Donor-Specific Anti-HLA Antibodies or**  
4 **Rejection in Solid Organ Transplant Recipients**  
5  
6  
7

8 Cordero E<sup>1</sup> \*, Bulnes-Ramos A<sup>1\*</sup>, Aguilar-Guisado M<sup>1</sup>, González Escribano F<sup>2</sup>, Israel  
9 Olivias<sup>2</sup>, Torre-Cisneros J<sup>3</sup>, Gavaldá J<sup>4</sup>, Aydillo TA<sup>1</sup>, Moreno A<sup>5</sup>, Montejo M<sup>6</sup>, Fariñas  
10 MC<sup>7</sup>, Carratalá J<sup>8</sup>, Muñoz P<sup>9</sup>, Blanes M<sup>10</sup>, Fortún J<sup>11</sup>, Suárez-Benjumea A<sup>12</sup>, López-  
11 Medrano F<sup>13</sup>, Barranco JL<sup>3</sup>, Peghin M<sup>4</sup>, Roca C<sup>1</sup>, Lara R<sup>3</sup>, Pérez-Romero P<sup>1</sup> for the  
12 Influenza Vaccine in Solid Organ Transplant Recipient Study Group (REIPI-GESITRA)  
13  
14  
15  
16  
17

18  
19  
20 <sup>1</sup> Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). University Hospital Virgen del  
21 Rocío/CSIC/University of Sevilla, Spain.

22  
23  
24 <sup>2</sup> Servicio de Inmunología/Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). University  
25 Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Sevilla, Spain.

26  
27  
28 <sup>3</sup> Reina Sofia University Hospital-Maimonides Institute for Biomedical Research  
29 (IMIBIC), University of Cordoba (UCO), Cordoba, Spain.

30  
31  
32 <sup>4</sup> Vall d'Hebron University Hospital-VHIR, Barcelona, Spain

33  
34  
35  
36  
37 <sup>5</sup> University Clinic Hospital, Barcelona, Spain

38  
39  
40 <sup>6</sup> University Hospital Cruces, Bilbao, Spain

41  
42  
43 <sup>7</sup> University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

44  
45  
46 <sup>8</sup> University Hospital Bellvitge-IDIBELL, University of Barcelona, Barcelona, Spain

47  
48  
49 <sup>9</sup> General University Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

50  
51  
52 <sup>10</sup> University Hospital La Fe, Valencia, Spain

53  
54  
55 <sup>11</sup> University Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

56  
57  
58 <sup>12</sup> University Hospital Virgen Macarena, Sevilla, Spain  
59  
60

1  
2  
3 <sup>13</sup> University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain'  
4

5  
6 \* Both authors contributed equally to the work.  
7

8 Other authors in the Influenza Vaccine in Solid Organ Transplant Recipient Study  
9  
10 Group (REIPI-GESITRA): From University Hospital Virgen del Rocío-IBIS: Alamo  
11 JM, Gasch A, Gentil MA, Molina-Ortega FJ, Lage E, , Martínez-Atienza J, Sánchez M,  
12 Rosso C, From the University Hospital Reina Sofia-IMIBIC-UCO, Córdoba, Spain:  
13 Arizón JM, Aguera M, Cantisán S, Montero JL, Páez A, Rodríguez A, Santos S, Vidal  
14 E. From Val d'hebron Hospital, Barcelona, Spain: Berasategui C, Campins M, López-  
15 Mesguer M, Saez B. From the Clinic Hospital, Barcelona, Spain Marcos MA,  
16 Sanclemente G. From University Hospital Cruces, Bilbao, Spain: Diez N, Goikoetxea J.  
17 From University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain; Casafont F, Cobo-  
18 Beláustegy M, Durán R, Fábrega-García E, Fernández\_Rozas S, González-Rico C,  
19 Zurbano-Goñi F. From University Hospital Bellvitge-IDIBELL, University of  
20 Barcelona Barcelona: Bodro M, Niubó J, Oriol S, Sabé N. From General University  
21 Hospital Gregorio Marañón, Madrid Spain. Anaya F, Bouza E, Catalán P, Diez P,  
22 Eworo A, Kestler M, López-Roa P, Rincón D, Rodríguez M, Salcedo M, Sousa Y,  
23 Valerio M. From University Hospital Virgen Macarena, Sevilla, Spain: Morales-  
24 Barroso I. From Universty Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain: Aguado JM, Origen  
25 J.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46  
47 **Corresponding author:**

48 Dr Elisa Cordero. Instituto de Biomedicina de Sevilla. Infectious Diseases Unit..  
49 University Hospital Virgen del Rocío. Avenida Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain.  
50  
51 Tel.: +34 955012185; fax: +34 955923101; e-mail: elisacorderom@gmail.com.  
52  
53

54  
55 **Running title:** Influenza vaccination and graft rejection.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Abbreviations:** Donor specific anti-HLA antibodies (DSA); Solid organ transplant recipients (SOTR).

For Peer Review

**Abstract**

The aim of this study was to determine whether influenza vaccination induces donor specific anti-HLA antibodies (DSA) and graft rejection in solid organ transplant recipients (SOTR). We included 490 SOTR receiving influenza vaccine from 2009-2013: 110 (22.4%) received the pandemic adjuvanted influenza vaccine, 59 (12%) vaccinated within the first six months post-transplantation, 136 (27.7%) received two doses and 185 (37.7%) one dose of seasonal non adjuvanted vaccine more than six months after transplantation. Patients with pre-existing antibodies (15.7% for anti-HLA class I and 15.9% for class II) did not have an increase in reactivity after immunization. Overall, no statistical differences were found in the percentages of patients that developed positive levels of anti-HLA antibodies after immunization using the adjuvanted vaccine, including those receiving the vaccine within the first six months post-transplantation, and no differences were observed based on the type of organ transplanted. However, the percentage of patients positive for anti-HLA class I increased significantly 5 weeks after the second dose compared with 5 weeks after the first dose, 5 (3.8%) vs. 18 (14.8%; P=0.003). A group of 75 (14.4%) patients developed de novo anti-HLA antibodies however, only 5 (1.02%) were DSA, and none experienced allograft rejection. Our results suggest that influenza vaccination is not associated with graft rejection in this cohort of SOTR.

## Introduction

Solid organ transplant recipients (SOTR) are at greater risk for complications and mortality from influenza than those in the general population due to their permanent immunocompromised status [1]. Annual influenza vaccination is the most efficacious method for reducing the incidence of complications from influenza [2-7]. Most studies in SOTR have shown an optimal antibody response to influenza vaccination [8-12], although with lower titers than those for the general population [13]. However, there is still a percentage of patients ranging from 1 to 47% that does not respond adequately to influenza vaccine immunization, with an insufficient antibody response to vaccination or the development influenza after vaccination [1, 13, 14]. Different strategies can be used to increase vaccination efficacy, such as adding an adjuvant to the composition of the vaccine that was implemented in the 2009 pandemic vaccine. Administration of the pandemic vaccine was safe and stimulated a protective immune response that has been widely demonstrated in healthy individuals and SOTR [15, 16]. In addition, detectable antibody titers at vaccination had been shown to improve response to vaccination in SOTR recipients [15, 17], supporting the administration of a booster dose. A recent study of 60 kidney transplant recipients randomized to receive one dose of the adjuvanted vs. non adjuvanted trivalent influenza vaccine found similar rates of seroprotection for the three influenza strains [18]. Despite the beneficial effect of influenza vaccination in SOTR, the safety of influenza vaccination in transplant patients has been questioned [7, 19-21] due to concerns of vaccine induced alloreactivity leading to increased antibodies directed against donor human leukocyte antigen (HLA) [22]. Results available come from small studies. A cohort study of 60 cases and controls described an increase in rejection rate after administering the influenza A(H1N1)pdm vaccine [23]. A study by Katerinis *et al.* in 2011 in a cohort of 151 transplant recipients

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

demonstrated the novo synthesis of donor derived anti-HLA antibodies after influenza A(H1N1)pdm vaccination. In this study, 17.3% and 11.9% SOTR receiving the influenza vaccine 6 weeks and 6 months after transplantation, respectively, developed anti-HLA antibodies [24]. However, more recent studies found no relationship between influenza immunization and cellular and humoral rejection, and hypothesized that the results obtained by Katerinis et al. may be related to the use of an adjuvant in the vaccine composition [25, 26]. In a separate study, Kumar *et al.* compared intramuscular vs. intradermal vaccination in a cohort of 212 transplant recipients and found donor specific anti-HLA antibodies in only one patient [27]. Similar results were obtained by Vermeiren *et al.* in a cohort of 169 vaccinated SOTR [22].

Another controversial aspect regarding influenza vaccination in SOTR is the optimal time after transplantation when the vaccine should be administered. Currently, vaccination is recommended after 3 to 6 months post-transplantation [2]. Our group has recently demonstrated that administering the influenza vaccine one month post-transplantation is safe and efficacious [17], with no rejection episodes however, we did not address *de novo* synthesis of donor specific anti-HLA antibodies (DSA).

Based on these results, large cohort studies are necessary in order to clarify the relationship between influenza immunization and allograft rejection in SOTR. Thus, the aim of this study was to determine whether influenza vaccination induces the production of DSA, and characterize its impact on the graft function in SOTR.

## Materials and Methods

**Patient inclusion.** We performed a multicenter, prospective, longitudinal study of consecutive SOTR receiving the influenza vaccine during four consecutive influenza seasons: 2009/2010, 2010/2011, 2011/2012 and 2012/2013. Patients were included from 12 Spanish hospitals: Virgen del Rocío University Hospital, Seville; Reina Sofía University Hospital, Córdoba; 12 de Octubre University Hospital, Madrid; Gregorio Marañón General University Hospital, Madrid; Ramón y Cajal University Hospital, Madrid; Vall d'Hebron Hospital, Barcelona; Bellvitge University Hospital, Barcelona; Barcelona Clinic Hospital, Barcelona; Cruces University Hospital, San Vicente de Barakaldo; La Fe University Hospital, Valencia; Virgen Macarena University Hospital, Seville; and Marqués de Valdecillas University Hospital, Santander, all of which participate in the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI). Patients were excluded if they were less than 16 years old, had received the transplant less than 1 month ago, had allergies to any of the vaccine components, developed acute rejection 15 days before vaccination or were pregnant. In patients vaccinated from 2009 to 2012, serum samples were collected from each patient at vaccination (baseline) and 5 weeks later. Patients from the 2012-2013 season came from the TRANSGRIPE clinical trial [28] that randomly received either one or two doses of the vaccine five weeks apart. For both arms, serum was additionally collected at 10 weeks and 1 year after vaccination and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Patients with documented influenza were followed-up for 10 months to collect and record possible adverse events after receiving the vaccine.

**Clinical parameters and definitions.** Baseline characteristics, immunological and clinical response and adverse effects, including graft rejection and mortality, were recorded. Follow-up clinical parameters were collected using a standardized

1  
2  
3 questionnaire. Graft rejection was confirmed histologically if biochemical or functional  
4 abnormalities were detected. Vaccinated patients included all individuals who had  
5 received the seasonal influenza vaccine in the previous year or any vaccine in the  
6 previous month. Rejection was defined using the Banff criteria [29].  
7  
8  
9

10  
11  
12 **Vaccines.** Patients from the 2009-2010 season received the 2009 (H1N1)pdm  
13 monovalent MF59-adjuvanted vaccine containing the strain: A/California/7/2009-H1N1  
14 (Focetria, Novartis, Siena, Italy). Patients from the 2010-2011 and 2011-2012 seasons  
15 received the trivalent non-adjuvanted inactivated vaccine (Gripovac, Sanofi-Pasteur  
16 MSD, Madrid, Spain) containing the strains: A/California/7/2009-H1N1,  
17 A/Perth/16/2009-H3N2, and B/Brisbane/60/2008. Patients from the 2012-2013 season  
18 received one or two doses of the trivalent non-adjuvanted inactivated vaccine  
19 (Mutagrip, Sanofi-Pasteur MSD) with the strains: A/California/7/2009-H1N1,  
20 A/Victoria/361/2011-H3N2, and B/Wisconsin/1/2010. Adverse events were assessed  
21 according to established criteria [30].  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35  
36 **HLA determination.** The screening of anti-HLA antibodies in serum was determined  
37 using class I and class II antibody-coated latex beads (FlowPRA™ Screening Test, One  
38 Lambda, Inc., Canoga Park, CA) by flow cytometry according to the manufacturer's  
39 instructions. The test was considered positive when reactivity for either class I or II  
40 antigen was higher than 10%.  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47  
48 **Assigination of anti-HLA specificities.** To determinate the specificity of the HLA  
49 antibodies, single-antigen bead flow cytometry (SAFC) assays were performed in those  
50 sera in which anti-HLA class I and/or class II antibodies were detected in the screening  
51 (Lifecodes LSA™ class I, LSA1, and/or class II, LSA2, Tepnel). Phycoerythrin-  
52 conjugated goat anti-human IgG antibody was used as a secondary antibody. Samples  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 were analyzed on a Life Match fluoroanalyzer using Luminex 100 IS v 2.3 as software  
4 for data acquisition and Quicktype for Lifematch as analysis software. Positive and  
5 negative control sera and beads were included in each test. For validation, all controls  
6 must meet the manufacturer's specifications. To determine if an individual bead is  
7 recognized by a serum sample, only the MFI raw value was considered. A sample was  
8 considered to be positive to a specific bead when the Median Fluorescent Intensity  
9 (MFI) raw value for this bead was greater than 1500.  
10  
11

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18 **Assignment of DSA (virtual crossmatches): Donor HLA typing.** Samples of all  
19 deceased donors were routinely typed before recipient selection in loci HLA-A\*, B\*  
20 and DRB1\* using the polymerase chain reaction (PCR)-specific sequence primers  
21 (SSPs) system (AllSet<sup>TM</sup> Gold HLA-A, HLA-B and HLA-DR Low Resolution SSP  
22 kits; Invitrogen Ltd, Paisley, UK). If antibodies against HLA-C, DQ or DP were  
23 detected by SAFC in a pre-transplant patient serum, the donor HLA genotype was  
24 performed in the corresponding locus using a PCR-SSP system (AllSet<sup>TM</sup> Gold HLA-C  
25 and HLA-DQ Low Resolution SSP kits and AllSet<sup>TM</sup> Gold HLA-DPB1 High  
26 resolution SSP kit; Invitrogen Ltd). High resolution typing was performed if it was  
27 necessary to establish whether the anti-HLA antibodies were DSA (SSP Gold High  
28 resolution kits; Invitrogen Ltd), determining whether SAFC anti-HLA antibodies  
29 detected in a particular patient were DSA comparing with donor HLA typing.  
30  
31

32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46 **Influenza virus microneutralization assays.** Microneutralization assays were  
47 performed as previously described [13, 17].  
48  
49

50  
51  
52 **Statistical analysis.** A descriptive statistical analysis was performed. Continuous  
53 variables were expressed as median and interquartile ranges. Rates of positive patients  
54 for anti-HLA class I and II were compared using the McNemar or Chi square tests and  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 the Bonferroni correction was applied when appropriate. The multivariate logistic  
4 regression analysis of factors potentially associated with anti-HLA response included  
5 significant variables in the bivariate analyses and those clinically relevant variables  
6 (time from transplantation to influenza vaccination, type of transplant and the number of  
7 doses of influenza vaccine administered). For immunogenicity analysis geometric mean  
8 antibody titer and T-Student test were used. Results were analyzed by PASW Statistic  
9 18.0.1 software. Statistical significance was established as a p-value <0.05.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## Results

**Patient cohort.** A total of 490 SOTR were included in the study, 110 (22.4%) patients vaccinated in 2009-2010 that received the 2009 (H1N1)pdm adjuvanted vaccine, 56 (11.4%) in 2010-2011, 58 (11.8%) in 2011-2012 and 265 (54.0%) patients in 2012-2013. Of the 266 patients from 2012-2013, 130 (48.8%) patients received one dose, and 136 (51.2%) patients two doses. Of the 490 SOTR, 59 (12%) were vaccinated within the first six months post transplantation, and 431 (88%) after six months. Baseline characteristics and clinical parameters of the cohort are described in Table 1. The median age of the cohort was 56 years (IC range 46-63), patients with liver transplant were the most numerous (31.6%), most patients (91%) had calcineurin inhibitors (69.4 tacrolimus and 21.6% cyclosporine) as immunosuppressive therapy and 74.7% on mycophenolate mofetil and the most frequent comorbidity was diabetes mellitus (27.1%). Most patients (73.4%) had received the influenza vaccine the previous season.

**Anti-HLA alloantibody response screening.** The anti-HLA antibody response was screened for all 490 SOTR at baseline (before receiving the dose of vaccination) and 5 weeks after the last vaccination. Overall, 15.7% of patients were positive (>10%) for anti-HLA class I antibodies at baseline vs. 13.4% at 5 weeks post vaccination ( $p=0.396$ ; Table 2). For anti-HLA class II antibodies, 15.9 % were positives at baseline vs. 14.0% at 5 weeks after vaccination ( $P=0.360$ ; Table 3 and Figure 1A).

None of the patients with preexisting antibodies had an increase in reactivity after the immunization. Of the 77 (15.7%) patients that were positive for anti-HLA class I antibodies at baseline, the reactivity level of the samples collected after the immunization decreased significantly at 5 weeks (54.29% vs. 22.88%,  $P<0.010$ ), at 10 weeks (54.29% vs. 21.24%,  $P=0.034$ ) and one year (54.29% vs. 8.84%,  $P=0.002$ ); while of the 78 (15.9%) patients that were positive for anti-HLA class II antibodies at baseline

1  
2  
3 no differences were observed at 5 weeks (53.7% vs. 37.62%,  $p=0.238$ ), at 10 weeks  
4 (53.77% vs. 34.04%,  $p=0.400$ ) and one year (53.71% vs. 32.45%,  $P=0.061$ ) after  
5 vaccination.  
6  
7

8  
9  
10 We analyzed each vaccination group to determine whether having an adjuvant in the  
11 composition of the vaccine, administrating the vaccine within the first six months post-  
12 transplantation, receiving two vaccination doses or the type of organ transplanted  
13 influenced anti-HLA antibody production.  
14  
15

16  
17  
18 In the group of 110 patients who received an adjuvanted influenza vaccine, no  
19 significant increment in the percentage of patients positive for anti-HLA class I  
20 ( $P=0.118$ ) or for class II antibodies ( $P=0.054$ ) was found at 5 weeks after vaccination  
21 compared with baseline. When we compared patients that received the adjuvanted vs.  
22 non-adjuvanted vaccine, no statistically significant differences were found in the  
23 percentages of patients positive for anti-HLA class I at baseline (15.4% vs. 15.7%,  
24  $P=0.932$ ) or five weeks after vaccination (19.0% vs. 11.8%,  $P=0.056$ ; Table 2 and  
25 Figure 1B). Similar results were found for anti-HLA class II antibodies, at baseline  
26 (14.5% vs. 16.3%,  $P=0.655$ ) and 5 weeks after vaccination (17.3% vs. 13.4%,  $P=0.303$ ;  
27 Table 3).  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

41 In the group of 59 patients vaccinated within the first six months after transplantation,  
42 no significant increase in the number of patients positive for anti-HLA class I ( $P=$   
43 0.414) and anti-HLA class II antibodies ( $P= 0.500$ ) was found after vaccination. When  
44 we compared patients receiving the influenza vaccine within the first six months vs.  
45 after six months post-transplantation, no significant differences were found on anti-  
46 HLA class I at baseline (15.2% vs. 15.7%,  $P=0.918$ ) and 5 weeks after vaccination  
47 (10.1% vs. 13.8%,  $P= 0.550$ ; Table 2 and Figure 1C), and anti-HLA class II antibodies  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 at baseline (15.3% vs. 16.0%, P=0.882) and 5 weeks post-vaccination (11.8% vs. 14.6%,  
4  
5 P=0.485; Table 3).

6  
7 We also analyzed patients that randomly received one vs. two doses of the influenza  
8  
9 vaccine. In the group of 130 patients receiving two doses, no increase was found  
10  
11 compared with baseline in the percentage of patients that became positive for anti-HLA  
12  
13 class I antibodies at 5 weeks (4.6% vs. 3.8%, P=0.990) or at 1 year (4.6% vs. 3.8%,  
14  
15 P=0.688), while a significant increase was found at 5 weeks after the second dose (4.6%  
16  
17 vs. 14.6%, P=0.003; Table 2 and Figure 1D). For anti-HLA class II antibodies no  
18  
19 differences were found at 5 weeks, 10 weeks or 1 year after the first dose (10% vs. 6.9%  
20  
21 P=0.990, 10% vs. 13.0% P=0.688, 10% vs. 6.9% P=0.727, respectively; Table 3). In the  
22  
23 group of 136 patients receiving one dose of the vaccine no differences were found  
24  
25 compared to baseline in the percentage of patients that became positive neither for anti-  
26  
27 HLA class I, at 5 weeks (8.0% vs. 10.2% P=0.454), 10 weeks (8.0% vs. 12.5%,  
28  
29 P=0.125) and 1 year (8.0% vs. 2.9%, P=0.344) post-vaccination (Table 2) or class II  
30  
31 antibodies (6.6% vs. 9.5% P=0.344, 6.6% vs. 8.0%, P=0.125, and 6.6% vs. 7.3%  
32  
33 P=0.219, respectively; Table 3).

34  
35  
36  
37  
38 When evaluating the production of anti HLA antibodies according to the transplanted  
39  
40 organ, no differences were found in the number of positive patients for either anti HLA-  
41  
42 class I or II at 5 weeks, 10 weeks or 1 year post-vaccination compared with baseline  
43  
44 (Tables 2 and 3; Figure 1 E-F), with the exception in the group receiving a liver  
45  
46 transplant, where a significant decrease in the percentage of patients positive for anti-  
47  
48 HLA class I at 10 weeks after vaccination compared with baseline was observed (16.1%  
49  
50 vs. 11.5%, P=0.043).

51  
52  
53 **Anti-HLA alloantibody positive response.** A group of 75 (15.3%) patients developed  
54  
55 *de novo* anti-HLA antibodies (were negative, had less than 10% reactivity at baseline,  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 and became positive for anti-HLA antibodies) after immunization: 52 patients (69.3%)  
4  
5 at 5 weeks, 19 (25.3%) at 10 weeks and 4 (5.3%) one year. Of them, 41 patients became  
6  
7 positive for anti-HLA class I antibodies after vaccination: 11 (26.8%) had received the  
8  
9 influenza A/(H1N1)pdm adjuvanted vaccine, 2 (4.8%) were vaccinated within the first  
10  
11 six months after transplantation, 17 (41.4%) received one dose more than six months  
12  
13 post-transplantation and 11 (26.8%) received two doses. By type of organ: 16 (39.0%)  
14  
15 were liver recipients, 8 (19.5%), kidney, 5 (12.1%) heart, 10 (24.3%) lung and 2 (4.8%)  
16  
17 received a combined transplant.  
18

19  
20 A group of 25 patients became positive for anti-HLA class II after vaccination: 4  
21  
22 (16.0%) received the pandemic adjuvanted vaccine, 12 (48.0%) received one dose more  
23  
24 than six months after transplantation and 9 (36.0%) received two doses. Analyzed by  
25  
26 type of organ: 17 (68.0%) patients were liver recipients, 2 (8.0%) kidney recipients, 3  
27  
28 (12.0%) heart recipients, and 3 (12.0%) lung recipients. A group of 9 patients became  
29  
30 positive for both anti-HLA class I and II antibodies after vaccination: 2 (22.2%)  
31  
32 received the pandemic adjuvanted vaccine, 5 (55.5%) two doses and 2 (22.2%) were  
33  
34 vaccinated within the first six months post-transplantation; and of them 7 (77.7 %)  
35  
36 received a liver transplant, one (11.1%) kidney and one (11.1%) heart.  
37  
38

39  
40 Changes in the MFI were analyzed in the group of 75 patients that developed de novo  
41  
42 anti-HLA antibodies after immunization. No significant differences in the levels of MFI  
43  
44 were found compared with baseline at 5 weeks after vaccination for anti-HLA class I  
45  
46 (2477.78 vs. 2766.69, P=0.647) or class II antibodies (6621.84 vs. 5164.7, P=0.157); at  
47  
48 10 weeks after vaccination for anti-HLA class I (2477.78, vs. 12023.66, P=0.184) and  
49  
50 class II (6621.84 vs. 7919, P=0.277) antibodies and at one year after vaccination for  
51  
52 anti-HLA antibodies (9510.66 vs. 16609.50, p=0.378).  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Correlation between neutralizing antibody levels and development of anti-HLA**

**antibodies.** We analyzed whether the level of neutralizing antibodies correlated with developing *de novo* anti-HLA antibodies. Patients that developed *de novo* anti-HLA class I antibodies did not have higher neutralizing antibody titers after vaccination compared with patients that did not develop anti-HLA (class I or class II) antibodies for any of the influenza strains (Table 4).

**Multivariate analysis.** We performed a multivariate logistic regression analysis to evaluate possible confounding factors involved in developing a positive anti-HLA response (Table 5). Patients that were positive at baseline were at higher risk to remain positive at 10 weeks after influenza vaccination for both anti-HLA class I (OR = 10.53 (2.07-48.77),  $p=0.004$ , and class II (237 (20.08-2341.47),  $p<0.010$  respectively). In addition, positive patients at baseline were at higher risk to remain positive for anti-HLA class II antibodies one year after influenza vaccination (OR= 48.40 (10.20-229.54;  $p<0.010$ ). Time since transplantation, type of organ and the administration of two doses of vaccine were not associated with anti-HLA antibody production.

**Donor Specific Antibody Production.** We next determined whether the anti-HLA antibodies were donor specific. Only 5 (1.02 %) patients had DSA (Supplementary Table 1). Two patients developed DSA within 10 weeks after vaccination. One patient, that received a combined liver-kidney transplantation and one dose of the 2009 (H1N1)pdm adjuvanted influenza vaccine 57 months after transplantation developed DSA class I antibodies, subtype A\*01:01, 02:02, which is not related to graft rejection [31]. The second patient was a kidney recipient that received two doses of the non-adjuvanted influenza vaccine 14 months after transplantation, and developed DSA class II antibodies 5 weeks after the second vaccination, subtype DRB1\*01:03 and DRB3, which had been associated with graft rejection [32]. However, DSA were also detected

1  
2  
3 in the patient's serum at baseline, and there was an increase of antibody levels after  
4 vaccination. In both patients there was a decrease in the MFI levels and neither of them  
5 developed organ rejection during follow-up.  
6  
7

8  
9 The other three patients developed DSA 1 year after vaccination. A lung recipient that  
10 received two doses of the influenza vaccine 52 months after transplantation and  
11 developed DSA class II antibodies DR52. Another lung recipient that received one dose  
12 of non-adjuvanted vaccine 49 months after transplantation developed DSA class II  
13 antibodies DQ7 and DQ4. Finally, a kidney recipient that received one dose of the  
14 vaccine 6 months after transplantation developed DSA class II antibodies DQ2 and  
15 DQ9. None of them had graft rejection during the follow-up.  
16  
17

18  
19 In one of the 75 patients DSA was not performed because genotyping of the donor was  
20 not available.  
21  
22

23  
24 **Rejection episodes.** Only two (0.4%) patients were diagnosed with graft rejection  
25 during follow-up. None of them received the influenza vaccine within the first six  
26 months after transplantation or the adjuvanted vaccine or developed DSA. A lung  
27 recipient (12 months after transplantation) was diagnosed with acute graft rejection 10  
28 days after receiving one dose of the trivalent influenza vaccine. A decreased of FEV<sub>1</sub>  
29 had been detected before vaccination coinciding with infra-therapeutic levels of  
30 tacrolimus. A heart recipient (6 months after transplantation) was diagnosed with acute  
31 cellular graft rejection IIIA 70 days after receiving two doses of non-adjuvanted  
32 influenza vaccine. No other circumstances indicated the presence of acute rejection.  
33  
34 Both patients had favourable outcome after rejection.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Discussion

This study was designed to explore the production of DSA after influenza vaccination and its impact on graft function in SOTR. We analyzed whether the different strategies used to improve vaccination response such as the time from transplant to vaccination, the presence of an adjuvant in the composition of the vaccine and the number of doses administered, stratifying by the type of organ transplanted, were related to the production of DSA and rejection.

Some studies, including human and animal models, have shown that antigens derived from influenza immunization may cross-react with alloantigens involved in graft rejection, and have proposed a risk of vaccination to induce alloimmune response [25, 33]. However, in our cohort of 490 SOTR we found no correlation between developing neutralizing antibodies against influenza viruses and *de novo* anti-HLA antibodies. Importantly, influenza vaccination was not related with the production of *de novo* DSA or with rejection, with no differences based on the type of transplant. Katerinis *et al.* have previously shown that 11.9 % of patients developed *de novo* anti-HLA antibodies after immunization in a cohort of 151 SOTR [24], and they hypothesized about the possible role of the adjuvant in the composition of the vaccine in this response. Our results, after analyzing 110 patients who received one dose of the adjuvanted influenza vaccine suggest that the vaccine composition has little or no influence on alloimmune response and graft rejection.

Some studies and expert opinions suggest that influenza immunization in SOTR early after transplantation (1-6 months) may be associated with lower vaccine efficiency and increased risk for graft rejection [34, 35]. In a study published recently by our group, we found a similar response to influenza vaccination in patients vaccinated before or after

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

six months post transplantation [17]. Thus, in the present study we found no relationship between the timing of influenza vaccination after transplantation and the production of DSA. Thus, our results support the idea that early influenza vaccination within the first 6 months post-transplantation is not related with graft rejection.

We have previously shown that patients with detectable antibody levels before influenza vaccination had an improved antibody response to vaccination, and concluded that the administration of a booster dose of influenza vaccine to SOTR may improve the humoral response in those patients [17, 28]. In this study, we found that although patients that received a second dose developed more anti-HLA class I antibodies, although these antibodies were not DSA. Thus, we demonstrate that receiving a booster dose had no effect on DSA production (only 0.4% of cases), or graft rejection. In addition, we found no differences in patients receiving one *versus* two doses.

The HLA system is highly polymorphic, and has numerous subtypes, and only Class II antibodies have been related with graft rejection [36]. In our study, only four patient (0.2%) had increased DSA class II levels after influenza vaccination however, in one case that received two doses of the vaccine, DSA were also detected before vaccination, although at lower levels, and the patient did not develop graft rejection during the follow-up. The other three (0.6%) patients had increased DSA class II levels at one year after vaccination with no graft rejection. These results suggest that influenza vaccination after transplantation does not induce an alloimmune response related with graft rejection.

The safety of influenza vaccine in transplant patients has been questioned due to concerns of vaccine inducing alloreactive memory responses. Our results suggest that having anti-HLA antibodies at baseline does not predispose for an increase in anti-HLA

1  
2  
3 antibodies after vaccination, in fact we observed a decrease in reactivity in this group of  
4  
5 patients. However, patients with pre-existing levels of anti-HLA antibodies had more  
6  
7 risk to remain positive after vaccination, although none of the patients had an increase  
8  
9 in reactivity after immunization. Additionally, in our cohort, patients who received two  
10  
11 doses of the adjuvanted vaccine were more prone to develop *de novo* anti-HLA  
12  
13 antibodies. Some authors have proposed that to reach a critical threshold that promotes  
14  
15 rejection it is necessary to generate a sufficient number of alloreactive memory T cells  
16  
17 that may be related with the number of stimulations [33], which may explain the results  
18  
19 observed in patients receiving two doses of the vaccine. Additionally, the fact that  
20  
21 patients receiving the vaccine within six months after transplantation had less  
22  
23 alloreactive response may be related to higher levels of immunosupresant drugs during  
24  
25 this period.  
26  
27  
28

29  
30 Of the two (0.4%) patients that were diagnosed with graft rejection in this cohort, one of  
31  
32 them experienced decreased lung function before influenza vaccination, and in the  
33  
34 second no other concomitant circumstances apart from vaccination justified the graft  
35  
36 rejection. However, none of the patients developed *de novo* DSA after influenza  
37  
38 vaccination suggesting that rejection episodes were not related with influenza  
39  
40 immunization.  
41  
42  
43

44  
45 In summary, our results suggest that influenza vaccination may not be associated with  
46  
47 graft rejection in SOTR. In addition, strategies to improve the immune response after  
48  
49 vaccination such as earlier vaccination after transplantation, the use of an adjuvant in  
50  
51 the composition of the vaccine, or the use of a booster dose may not increase rates of  
52  
53 rejection.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### **Acknowledgements**

This study was funded by from the Consejería de Salud (grant number: PI-0119-2012), Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (grant number: EC11-456 and GR09/0041) and – co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0001). PPR is supported by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP11/00314) co-financed by the Programa Nicolás Monardes (S-C020) Servicio Andaluz de Salud, Junta de Andalucía. The authors thank Michael McConnell for critical reading of the manuscript.

### **Disclosure**

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the American Journal of Transplantation.

**References**

- 1 Perez-Romero P, Aydillo TA, Perez-Ordóñez A, et al. Reduced incidence of pneumonia in influenza-vaccinated solid organ transplant recipients with influenza disease. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: E533-540.
- 2 Kumar D, Michaels MG, Morris MI, et al. Outcomes from pandemic influenza a h1n1 infection in recipients of solid-organ transplants: A multicentre cohort study. *The Lancet Infect Dis* 2010; 10: 521-526.
- 3 Duchini A, Hendry RM, Redfield DC, Pockros PJ. Influenza infection in patients before and after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6: 531-542.
- 4 Gottlieb J, Schulz TF, Welte T, et al. Community-acquired respiratory viral infections in lung transplant recipients: A single season cohort study. *Transplantation* 2009; 87: 1530-1537.
- 5 Ison MG, Michaels MG. Rna respiratory viral infections in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9 Suppl 4: S166-172.
- 6 Kunisaki KM, Janoff EN. Influenza in immunosuppressed populations: A review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 493-504.
- 7 Vilchez RA, McCurry K, Dauber J, et al. Influenza virus infection in adult solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2002; 2: 287-291.
- 8 Birdwell KA, Ikizler MR, Sannella EC, et al. Decreased antibody response to influenza vaccination in kidney transplant recipients: A prospective cohort study. *Am J Transplant* 2009; 54: 112-121.
- 9 Dopp JM, Wiegert NA, Moran JJ, et al. Effect of annual influenza immunization on antibody response in lung transplant patients. *Prog Transplant* 2009; 19: 153-159.
- 10 Gaeta GB, Pariani E, Amendola A, et al. Influenza vaccination in patients with cirrhosis and in liver transplant recipients. *Vaccine* 2009; 27: 3373-3375.
- 11 Manuel O, Humar A, Chen MH, et al. Immunogenicity and safety of an intradermal boosting strategy for vaccination against influenza in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2567-2572.
- 12 Soesman NM, Rimmelzwaan GF, Nieuwkoop NJ, et al. Efficacy of influenza vaccination in adult liver transplant recipients. *Journal of medical virology*. 2000; 61: 85-93.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

13 Cordero E, Perez-Ordóñez A, Aydillo TA, et al. Therapy with m-tor inhibitors decreases the response to the pandemic influenza a h1n1 vaccine in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2011; 11: 2205-2213.

14 Schuurmans MM, Tini GM, Dalar L, Fretz G, Benden C, Boehler A. Pandemic 2009 h1n1 influenza virus vaccination in lung transplant recipients: Coverage, safety and clinical effectiveness in the zurich cohort. *Heart Lung Transplant* 2011; 30: 685-690.

15 Cordero E, Aydillo TA, Perez-Ordóñez A, et al. Deficient long-term response to pandemic vaccine results in an insufficient antibody response to seasonal influenza vaccination in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2012; 93: 847-854.

16 Zhu FC, Wang H, Fang HH, et al. A novel influenza a (h1n1) vaccine in various age groups. *N Engl J Med* 2009; 361: 2414-2423.

17 Perez-Romero P, Bulnes-Ramos A, Torre-Cisneros J, et al. Influenza vaccination during the first 6 months after solid organ transplantation is efficacious and safe. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 1040 e1011-1048.

18 Kumar D, Campbell P, Hoschler K, et al. Randomized controlled trial of adjuvanted versus nonadjuvanted influenza vaccine in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2015.

19 Lopez C, Simmons RL, Mauer SM, Najarian JS, Good RA, Gentry S. Association of renal allograft rejection with virus infections. *Am J Med* 1974; 56: 280-289.

20 Briggs WA, Rozek RJ, Migdal SD, et al. Influenza vaccination in kidney transplant recipients: Cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med* 1980; 92: 471-477.

21 Blumberg EA, Fitzpatrick J, Stutman PC, Hayden FG, Brozena SC. Safety of influenza vaccine in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 1075-1080.

22 Vermeiren P, Aubert V, Sugamele R, et al. Influenza vaccination and humoral alloimmunity in solid organ transplant recipients. *Transpl Int* 2014; 27: 903-908.

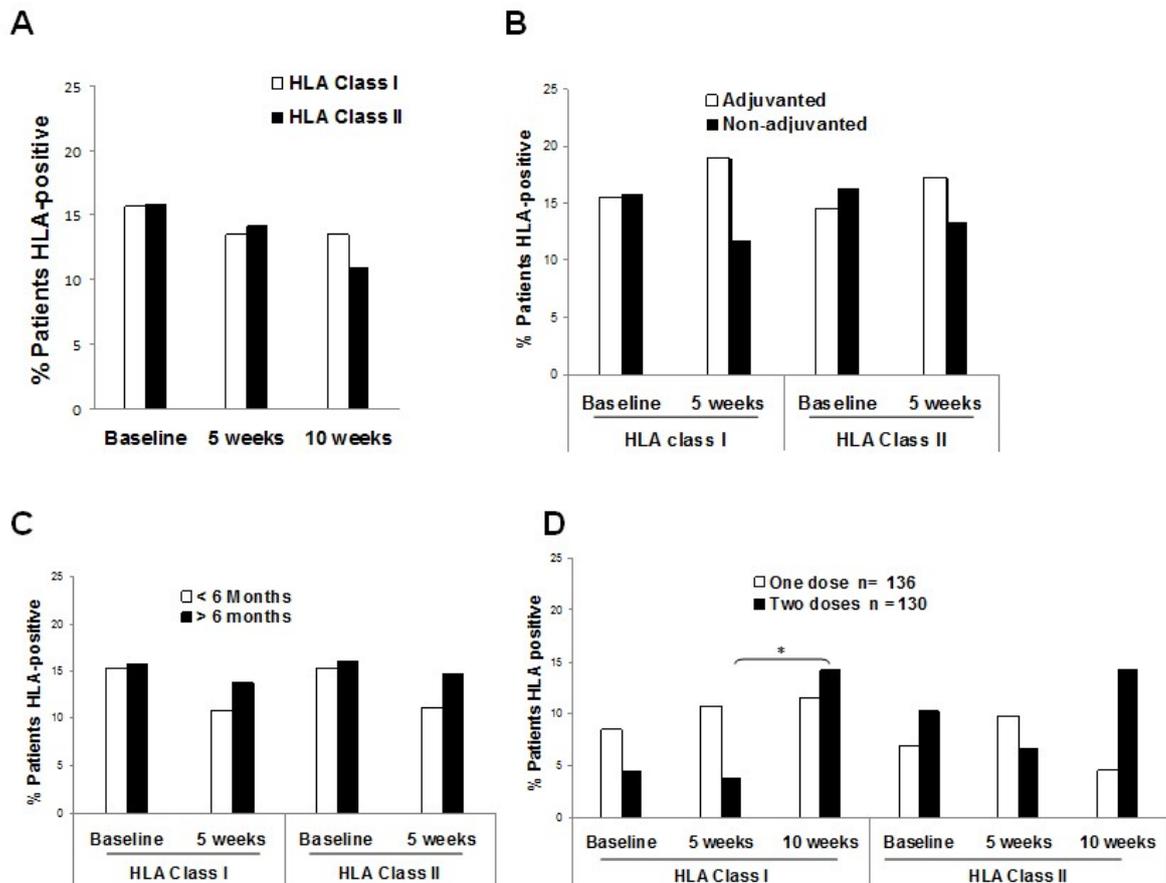
23 Schaffer SA, Husain S, Delgado DH, Kavanaugh L, Ross HJ. Impact of adjuvanted h1n1 vaccine on cell-mediated rejection in heart transplant recipients. *Am J Transplant* 2011; 11: 2751-2754.

- 1  
2  
3 24 Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R, et al. De novo anti-hla antibody after  
4 pandemic h1n1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant  
5 recipients. *Am J Transplant* 2011; 11: 1727-1733.  
6  
7  
8 25 Candon S, Thervet E, Lebon P, et al. Humoral and cellular immune responses  
9 after influenza vaccination in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*  
10 2009; 9: 2346-2354.  
11  
12 26 Danziger-Isakov L, Cherkassky L, Siegel H, et al. Effects of influenza  
13 immunization on humoral and cellular alloreactivity in humans. *Transplantation*  
14 2010; 89: 838-844.  
15  
16 27 Baluch A, Humar A, Eurich D, et al. Randomized controlled trial of high-dose  
17 intradermal versus standard-dose intramuscular influenza vaccine in organ  
18 transplant recipients. *Am J Transplant* 2013; 13: 1026-1033.  
19  
20 28 Martinez-Atienza J, Rosso-Fernandez C, Roca C, et al. Efficacy and safety of a  
21 booster dose of influenza vaccination in solid organ transplant recipients,  
22 transgripe 1-2: Study protocol for a multicenter, randomized, controlled clinical  
23 trial. *Trials* 2014; 15: 338.  
24  
25 29 Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 meeting report: New concepts in  
26 antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2012; 12: 563-570.  
27  
28 30 Greenberg ME, Lai MH, Hartel GF, et al. Response to a monovalent 2009  
29 influenza a (h1n1) vaccine. *N Engl J Med* 2009; 361: 2405-2413.  
30  
31 31 Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, et al. De novo donor-specific antibody at the  
32 time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and  
33 late graft failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2532-2541.  
34  
35 32 Slavcev A, Lacha J, Honsova E, et al. Clinical relevance of antibodies to hla  
36 antigens undetectable by the standard complement-dependent cytotoxicity test.  
37 *Transpl Int* 2003; 16: 872-878.  
38  
39 33 Adams AB, Williams MA, Jones TR, et al. Heterologous immunity provides a  
40 potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2003; 111: 1887-1895.  
41  
42 34 Danziger-Isakov L, Kumar D. Vaccination in solid organ transplantation. *Am J*  
43 *Transplant* 2013; 13 Suppl 4: 311-317.  
44  
45 35 Kumar D, Blumberg EA, Danziger-Isakov L, et al. Influenza vaccination in the  
46 organ transplant recipient: Review and summary recommendations. *Am J*  
47 *Transplant* 2011; 11: 2020-2030.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

36 Yamamoto T, Watarai Y, Takeda A, et al. De novo anti-hla dsa characteristics and subclinical antibody-mediated kidney allograft injury. Transplantation 2015.

For Peer Review



**Figure 1.** Percentage of patients that were positive for anti-HLA class I or II antibodies:

**A)** before and after influenza vaccination; **B)** comparing patients receiving the adjuvanted or non-adjuvanted vaccine at the indicated time of receiving the influenza vaccine immunization; **C)** comparing patients that received the influenza vaccine within the first 6 months (<6 months) or after 6 months (>6 months) post-transplantation; **D)** comparing patients receiving one or two doses of the influenza vaccine; **E)** comparing patients based on the organ type for anti-HLA class I antibodies; **F)** comparing patients based on the organ type for anti-HLA class II antibodies. Notes: Baseline refers to the time of administration of the first dose of influenza vaccine, 5 weeks refers to 5 weeks after the first dose, 10 weeks: refers to 5 weeks after the second dose and one year refers to one year after immunization.\*  $P < 0.05$ , statistically significant difference.

Table 1. Patient baseline characteristics and comorbidities.

Variables	Total n= 490	Adjuvanted vaccine n=110	<6 months n=59	One dose n=130	Two doses n=136
<b>Male- n (%)</b>	315 (64.3)	66 (60.0)	12 (20.3)	85 (65.4)	101 (74.3)
<b>Age (median, IQR)</b>	56.0 (46- 63)	53.5 (44.0 – 61.0)	46.5 (43.0 - 57.2)	55.5 (46.8 - 63.4)	57 (47.2 - 62.0)
<b>Type of transplant</b>					
<b>Kidney- n(%)</b>	143 (29.2)	30 (27.3)	23 (39.0)	31 (23.8)	33 (24.3)
<b>Liver- n(%)</b>	155 (31.6)	31 (28.2)	25 (42.4)	32 (24.6)	37 (27.2)
<b>Heart- n(%)</b>	95 (19.4)	31 (28.2)	7 (11.9)	26 (20.6)	29 (21.3)
<b>Lung -n(%)</b>	92 (18.8)	17 (15.5)	3 (5.1)	38 (29.6)	37 (27.2)
<b>Combined-n(%)</b>	5 (1.0)	1 (0.9)	1 (1.7)	3 (2.3)	0 (0)
<b>Immunosuppressive therapy</b>					
<b>Tacrolimus- n(%)</b>	340 (69.4)	53 (48.2)	50 (84.7)	108 (83.1)	97 (71.3)
<b>Mycophenolate mofetil-n(%)</b>	366 (74.7)	80 (72.7)	44 (74.6)	92 (70.8)	97 (71.3)
<b>Cyclosporine- n(%)</b>	106 (21.6)	46 (41.8)	5 (8.5)	18 (13.8)	22 (16.2)
<b>mTOR inhibitors -n(%)</b>	65 (13.3)	22 (20.0)	2 (3.4)	14 (10.8)	16 (11.8)
<b>Comorbidites- n (%)</b>					
<b>Chronic liver disease- n(%)</b>	47 (9.6)	4 (3.6)	12 (20.3)	18 (13.8)	16 (11.8)
<b>Diabetes mellitus- n(%)</b>	133 (27.1)	27 (24.5)	12 (20.3)	46 (35.4)	33 (24.3)
<b>Chronic heart disease- n(%)</b>	99 (20.2)	25 (22.7)	7 (11.9)	30 (23.1)	33 (24.3)
<b>Chronic kidney disease -n(%)</b>	68 (13.9)	22 (20.0)	8 (13.6)	7 (5.4)	7 (5.1)
<b>Hypogammaglobulinemia -n(%)</b>	20 (4.1)	3 (2.7)	8 (13.6)	22 (16.9)	17 (12.5)
<b>Previous season influenza vaccination- n(%)</b>	360 (73.4)	77 (70.0)	42 (71.2)	95 (73.1)	88 (64.7)

Data are presented as n (%) unless otherwise indicated. IQR, interquartile range.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
110

Table 2. Percentage of patients that were positive for anti-HLA class I and II antibodies for each of the indicated vaccination strategies.

	% HLA Class I						
	Baseline	5 weeks Post-vaccination	P	10 weeks Post-vaccination	P	1 Year Post-vaccination	P
<b>Total cohort n-(%)</b>	77 (15.7)	66 (13.4)	0.396	36 (13.5)	0.263	9 (4.9)	0.804
<b>Vaccine composition n-(%)</b>							
<b>Adjuvanted</b>	17 (15.4)	21 (19.0)	0.118				
<b>Non-adjuvanted</b>	60 (15.7)	45 (11.8)	0.054				
<b>Time from Transplant to vaccination n-(%)</b>							
<b>≤ 6 months</b>	9 (15.2)	7 (10.1)	0.414				
<b>&gt; 6 months</b>	68 (15.7)	59 (13.6)	0.403				
<b>Number of vaccine doses n-(%)</b>							
<b>One dose</b>	11 (8.0)	14 (10.2)	0.454	17 (12.5)	0.125	4 (2.9)	0.344
<b>Two doses</b>	6 (4.6)	5 (3.8)	0.99	19 (14.6)	0.003	5 (3.8)	0.688
<b>Type of transplant n-(%)</b>							
<b>Kidney</b>	35 (24.5)	31 (24.4)	0.999	11 (17.1)	0.980	5 (7.8)	0.727
<b>Liver</b>	25 (16.1)	16 (11.1)	0.064	8 (11.5)	0.043	1 (1.4)	0.999
<b>Heart</b>	11 (11.6)	11 (12.9)	0.999	7 (12.7)	0.250	1 (1.8)	0.999
<b>Lung</b>	5 (5.4)	5 (5.9)	0.999	9 (12.0)	0.109	1 (1.3)	0.999
<b>Combined (liver-kidney)</b>	1 (20.0)	3 (60.0)	0.500	1 (33.3)	0.999	1 (33.3)	0.999

Parameters were compared using Mc Nemar test or Chi-square test when procedure.

**Table 3.** Percentage of patients that were positive for anti-HLA class II antibodies for each of the indicated vaccination strategies.

	% HLA Class II						
	Baseline	5 weeks Post-vaccination	P	10 weeks Post-vaccination	P	1 Year Post-vaccination	P
<b>Total cohort n-(%)</b>	78 (15.9)	63 (14.0)	0.360	28 (10.8)	0.754	19 (7.1)	0.180
<b>Vaccine composition n-(%)</b>							
<b>Adjuvanted</b>	16 (14.5)	19 (17.3)	0.508				
<b>Non-adjuvanted</b>	62 (16.3)	51 (13.4)	0.123				
<b>Time from Transplant to vaccination n-(%)</b>							
<b>&lt; 6 months</b>	9 (15.3)	7 (11.8)	0.500				
<b>&gt; 6 months</b>	69 (16.0)	62 (14.6)	0.39				
<b>Number of vaccine doses n-(%)</b>							
<b>One dose</b>	9 (6.6)	13 (9.5)	0.344	11 (8.0)	0.125	10 (7.3)	0.219
<b>Two doses</b>	13 (10.0)	9 (6.9)	0.990	17 (13.0)	0.688	9 (6.9)	0.727
<b>Type of transplant n-(%)</b>							
<b>Kidney</b>	31 (21.7)	23 (18.1)	0.549	9 (14.0)	0.999	9 (14.0)	0.375
<b>Liver</b>	29 (18.7)	23 (15.9)	0.523	6 (8.6)	0.975	3 (4.3)	0.625
<b>Heart</b>	12 (12.6)	10 (11.7)	0.999	6 (10.9)	0.500	3 (5.4)	0.495
<b>Lung</b>	4 (4.3)	5 (5.9)	0.999	6 (8.0)	0.999	3 (4.0)	0.999
<b>Combined (liver-kidney)</b>	2 (40.0)	2 (40.0)	0.999	1 (33.3)	0.999	1 (33.3)	0.999

Parameters were compared using Mc Nemar test or Chi-square test when appropriate.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

**Table 4.** Analysis of the relationship between the geometric mean titer (GMT) after vaccination for each of the indicated influenza virus strains and developing anti-HLA class I and II antibodies after vaccination.

GMT -post vaccination (IQR)	Positive for anti-HLA Class I post-vaccination			Positive for anti-HLA Class II post-vaccination			Positive for anti-HLA Class I and II post-vaccination		
	Yes	No	P	Yes	No	P	Yes	No	P
<b>A/H1N1-pdm</b>	76.13 (20.0-1280.0)	88.24 (5.0-1280)	0.523	40.0 (8.40-160)	90.18 (20-320)	0.675	69.44 (14.1 - 452.52)	88.82 (20.0 - 1280.0)	0.446
<b>A/H3N2</b>	83.93 (33.63 - 1280.0)	90.46 (20.0-640.0)	0.933	52.78 (5.0-2228.6)	92.10 (20-640)	0.316	40.0 (14.14 - 160.0)	92.28 (20.0 - 640.0)	0.282
<b>Influenza B</b>	195.04 (80.0-1280.0)	146.76 (40.0 - 1280.0)	0.645	226.27 (80.0 - 1194.2)	146.57 (40 - 1280)	0.183	320.0 (56.56 - 1810.1)	147.97 (40.0 - 1280)	0.319

GMT : geometric mean titer. Parameters were compared using T-Student test.

Table 5. Regression model of factor influencing positive of anti-HLA class I and II.

Variables	% HLA Class I positives				% HLA Class II positives			
	10 weeks after vaccination		1 year after vaccination		10 weeks after vaccination		1 year after vaccination	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
<b>First six months from Transplant (yes vs. no)</b>	1.17 (0.30-4.48)	0.812	0.501 (0.054-4.60)	0.541	1.17 (0.16-8.15)	0.873	2.36 (0.58-9.58)	0.229
<b>Type of Transplant</b>								
<b>Liver</b>	1		1		1		1	
<b>Kydney</b>	1.19 (0.27-5.15)	0.817	0.39 (0.043-3.55)	0.404	1.87 (0.26-13.29)	0.529	0.90 (0.19-4.15)	0.892
<b>Heart</b>	2.46 (0.76-8.00)	0.133	0.23 (0.026-2.14)	0.200	0.69 (0.07-6.81)	0.757	0.29 (0.054-1.56)	0.151
<b>Lung</b>	4E10 (0.00- )	0.999	21.94 (0.93-515.02)	0.055	2E9 (0.00- )	0.999	2.07 (0.02-161.77)	0.743
<b>Mycophenolate (yes vs. no)</b>	1.31 (0.43-4.00)	0.632	1.54 (0.28-8.36)	0.617	19.48 (0.93-404.82)	0.055	0.79 (0.22-2.82 )	0.717
<b>Two doses of vaccination (yes vs. no)</b>	2.43 (0.67-8.75)	0.174	2.36 (0.50-11.06)	0.273	16.16 (0.70-369.04)	0.081	0.79 (0.24-2.59)	0.700
<b>Anti-HLA positive at baseline (yes vs. no)</b>	10.53 (2.07-48.77)	0.004	5.96 (0.91-38.80)	0.062	237.44 (20.08-2341.47)	<0.001	48.40 (10.20 -229.54)	<0.010

Notes: CI: confidence interval; OR: odds ratio. Parameters were compared using adjusted logistic regression.

**Supplementary Table 1.** Clinical parameters of patients developing DSA.

Months from transplantation	Organ	HLA	Subtype	Time from baseline to anti-HLA determination	Increase in MFI from baseline (%)	Rejection	Outcome
57	Combined Liver-Kidney	Class I	HLA I-A 01:01	5 Weeks	-83.1 %	No	Favorable
14	Kidney	Class II	HLA II DRB1*01:03	10 Weeks	-40.2 %	No	Favorable
52	Lung	Class II	HLA II DR52	1 Year	37.4 %	No	Favorable
49	Lung	Class II	HLA II DQ9, DQ2	1 Year	83.55%	No	Favorable
6	Kidney	Class II	HLA DQ7, DQ4	1 Year	* Indetectable at baseline	No	Favorable



## **7. RESUMEN DE RESULTADOS**



A continuación, se presenta un resumen de los resultados de los artículos incluidos en esta tesis doctoral.

## **6.1 Artículo 1.**

### **Título.**

**Influenza vaccination during the first 6 months after solid organ transplantation is efficacious and safe.**

### **Introducción.**

La infección por influenza en los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido (TOS) se ha asociado con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en los primeros tres meses tras el trasplante (31, 99). La vacunación de la gripe se ha propuesto como una medida eficaz para la prevención de la infección en estos pacientes (60, 66, 67).

Sin embargo, las recomendaciones de las guías clínicas establecen que la vacunación en el paciente trasplantado debe realizarse a partir del sexto mes post-trasplante y nunca antes del tercer mes, para evitar las posibles complicaciones tras la vacunación que se pueden producir por la alta inestabilidad del sistema inmunológico de los pacientes en este periodo, en el que se teoriza la posibilidad de que la inmunización pueda generar eventos de rechazo en los pacientes (60, 142). Además se plantea que podría tener una baja eficacia, basado en pocos estudios en los que se demuestra que los pacientes vacunados en los primeros 6 meses desde el trasplante, tienen una menor respuesta que aquellos que se vacunan más tarde (135, 143).

Dada la experiencia previa del grupo sobre la infección y vacunación frente al virus influenza en el receptor de trasplante de órgano sólido, en este estudio hipotetizamos que la vacuna de la gripe administrada en los primeros seis meses tras el trasplante es segura, y presenta una eficacia comparable a la de los pacientes vacunados más tardíamente.

### **Objetivo.**

El objetivo por tanto fue determinar la respuesta a la vacunación en los receptores de TOS vacunados en los primeros seis meses tras el trasplante y compararla con la respuesta de los pacientes vacunados a partir del sexto mes.

### **Metodología.**

Diseñamos un estudio de cohortes multicéntrico, prospectivo, en el que incluimos receptores de trasplante de órgano sólido que recibieron la vacunación gripal a partir del primer mes post-trasplante. La inclusión de pacientes se realizó durante cuatro temporadas gripales consecutivas, entre el año 2009 y 2013. Se incluyeron receptores de TOS, mayores de 15 años, que recibieron una dosis de la vacuna frente a la gripe entre Noviembre de 2009 y Enero de 2013, en 12 hospitales españoles pertenecientes a la Red Española de Investigación en Patologías Infecciosas (REIPI). Los pacientes fueron excluidos en caso de presentar alergia al huevo o algún componente de la vacuna antigripal, si fueron vacunados durante el primer mes post-trasplante o en caso de embarazo.

Se recogieron muestras de suero en el momento de la vacunación (basal), y cinco semanas después para la determinación de anticuerpos neutralizantes, que se realizó mediante ensayos de microneutralización (104). Al final del estudio, incluimos 798 receptores de trasplante hepático, renal, cardíaco, pulmonar o combinado hepático-renal, 130 de los cuales habían recibido la vacuna de la gripe en los primeros seis meses desde el trasplante.

### **Resultados y discusión.**

Los resultados de este trabajo muestran que la vacunación frente a influenza en los receptores de TOS vacunados en los primeros seis meses desde el trasplante es segura y eficaz, observándose una respuesta e incidencia de eventos adversos similar a la de los pacientes vacunados a partir del sexto mes post-trasplante.

La respuesta a la vacunación en los receptores de TOS es variable, con rangos de seroprotección post-vacunal variables, entre el 15 y el 90% (99, 103, 104), y se ha descrito que diversos factores como el tipo de trasplante o el uso de medicación inmunosupresora como micofenolato o mTOR, están relacionados con una menor

respuesta a la vacunación (99, 105, 143). Sin embargo, no hay evidencias concluyentes de cómo afecta el estado inmunológico del receptor de TOS en los primeros meses desde el trasplante en la respuesta a la vacuna de la gripe y si está aumentando el riesgo de rechazo. Las recomendaciones actuales de no inmunizar a los receptores de TOS frente a la gripe, están basadas en opiniones de expertos y en el análisis de series de pacientes pequeñas y con pocos pacientes vacunados en los primeros seis meses desde el trasplante.

En este estudio, analizamos la mayor cohorte diseñada hasta la fecha para determinar la respuesta humoral tras la vacunación en los receptores de TOS, con 798 pacientes receptores de trasplante hepático, renal, cardíaco, pulmonar o combinado, 130 de los cuales habían recibido la vacuna antigripal entre el primer y el sexto mes post-trasplante.

El análisis de los resultados revela que la vacunación en los seis primeros meses desde el trasplante no está asociada con una peor respuesta humoral en estos pacientes, ni siquiera en aquellos que fueron vacunados en los tres primeros meses desde el trasplante, ya que no observamos diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de pacientes seroprotectidos, 73,1% vs. 76,5% para A(H1N1)pdm ( $p=0,49$ ), 67,5% vs. 74,1% para A/H3N2 ( $p=0,17$ ) and 84,2% vs. 85,2% para influenza B ( $p=0,80$ ), respectivamente, ni en el título de anticuerpos en el suero, después de la vacunación 117.32 (intervalo de confianza (IC) al 95%, 81.52 - 168.83) vs. 87.43 (95% IC, 72,87 - 104,91) para A(H1N1)pdm, 120,45 (95% IC 82,17- 176,57) vs. 97,86 (95% CI 81,34 - 117,44) para A/H3N2 y 143.32 (95% CI 103.46 - 198.53) vs. 145.54 (95% CI 122.35- 174.24) para influenza B respectivamente. Incluso observamos, al estratificar el grupo de pacientes con vacunación temprana, que los pacientes que recibieron la vacuna en los tres primeros meses post-trasplante, presentaban mayores títulos prevacunales frente a influenza, posiblemente por la proximidad con el estado inmunocompetente y menor tiempo de exposición a la medicación inmunosupresora. Este grupo de pacientes desarrolló una mejor respuesta vacunal que los que recibieron la vacuna entre el cuarto y el sexto mes post-trasplante. Este hecho no había sido descrito anteriormente, y pone de manifiesto una buena capacidad de respuesta inmunológica a la vacuna de la gripe de los receptores de TOS en los primeros seis meses desde el trasplante.

Los análisis multivariantes realizados, en los que se tuvieron en cuenta, tanto las variables con relación estadísticamente significativa en el bivariante, y aquellas con significado clínico para nuestro estudio, como el tipo de trasplante, la medicación inmunosupresora recibida, las comorbilidades de los pacientes, la vacunación previa y otros datos demográficos, revelaron para las tres cepas de estudio, que el único factor asociado con una mejor respuesta a la vacunación es la presencia de títulos de anticuerpos detectables en el suero de los pacientes en el momento de la vacunación. Observamos que los pacientes con títulos detectables, desarrollaron una mejor respuesta post-vacunal, tanto en mayores niveles de anticuerpos como en el porcentaje de pacientes seroprotectidos tras la vacunación y que el tiempo transcurrido desde el trasplante a la vacunación no se relacionaba con la respuesta cuando se ajustaba por otros posibles factores de confusión.

Durante el seguimiento de los pacientes, no se detectaron efectos adversos ni eventos de rechazo del injerto relacionados con la administración de la vacuna de la gripe en función del tiempo de administración. En resumen y como conclusión final, a la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que la vacuna de la gripe en los primeros seis meses desde el trasplante, es tan segura y efectiva como a partir del sexto mes. Por tanto, pensamos que la inmunización frente a influenza en los receptores de TOS debería estar recomendada desde el primer mes post-trasplante. Además, se recomienda la vacunación frente a la gripe estacional anual previa al trasplante en pacientes con enfermedad de órgano terminal con el fin de promover una mejor protección inmunológica temprana después del trasplante.

## **6.2 Artículo 2.**

### **Título.**

**Influenza vaccination does not induce donor-specific anti-HLA antibodies or rejection in solid organ transplant recipients.**

### **Introducción.**

Los receptores de trasplante de órgano sólido (TOS), debido a su estado de inmunosupresión permanente, son un grupo de riesgo del desarrollo de complicaciones y mortalidad debidas a la infección por el virus de la gripe (58). La vacunación anual frente a influenza se ha propuesto como el método más eficaz para prevenir la infección y por tanto minimizar estas complicaciones (43, 44, 62, 144, 145).

La mayoría de los estudios realizados para evaluar la eficacia de la vacunación en este grupo de pacientes han reflejado una respuesta humoral óptima en el receptor de TOS tras la vacunación (103, 109, 126, 146, 147), aunque inferior a la descrita en la población inmunocompetente (99), con un porcentaje variable de pacientes, entre el 1 y el 47% que no responde a la vacunación (58, 99, 129). En base a estos resultados se han propuesto diferentes estrategias para aumentar la efectividad de la vacunación en este grupo como la utilización de una vacuna adyuvantada, la administración de la vacuna en los primeros meses desde el trasplante o la administración de una segunda dosis de vacuna.

Aunque la vacunación antigripal ha demostrado aportar efectos beneficiosos en la protección frente a la infección en estos pacientes receptores de TOS, algunos autores se mantienen reticentes a la vacunación, debido al riesgo hipotético de que la vacunación pudiera producir una hiperactivación del sistema inmune generando una respuesta aloinmune, incrementando la producción de anticuerpos anti-HLA frente al órgano trasplantado y desencadenando el rechazo (43, 124, 148, 149).

La escasa información disponible en la literatura sobre este aspecto de la seguridad de la vacunación gripal en el paciente trasplantado, está basada en opiniones de expertos y análisis de cohortes pequeñas.

Un estudio publicado por Katerinis en 2011 en el que analiza una cohorte de 151 receptores de trasplante renal, concluye con que la vacunación induce la producción *de novo* de anticuerpos anti-HLA en el 17,3% de los pacientes que recibieron la vacuna adyuvantada en 2009, 6 semanas después del trasplante, y en el 11,9% de los que la recibieron a los seis meses después del trasplante (121). Otros estudios más recientes, no observan esta respuesta tras la vacunación e hipotetizan acerca de la posibilidad de que el desarrollo de anti-HLA reflejado en el estudio previo se deba al adyuvante de la composición de la vacuna que ella analiza (106, 150, 151). En un estudio posterior de Kumar *et al.*, en una cohorte de 2012 de receptores de TOS vacunados por vía intramuscular o intradérmica únicamente detectó un paciente que desarrolló anticuerpos anti-HLA específicos frente al donante. Resultados similares a los descritos por Vermeiren *et al.* tras analizar una cohorte de 169 pacientes en 2014 (151).

No hay datos en la bibliografía acerca de la relación entre la vacunación temprana, en los primeros tres a seis meses desde el trasplante, o el aumento del número de dosis con la producción de anticuerpos anti-HLA, estrategias vacunales cuya eficacia ha sido descrita previamente en nuestro grupo.

Pensamos que es necesario el análisis de cohortes numerosas de pacientes que permitan obtener conclusiones firmes acerca de este importante aspecto de la seguridad de la vacunación gripal, tan necesaria en el receptor de TOS dado el alto riesgo de desarrollar complicaciones al que se exponen por su estado de inmunosupresión.

### **Objetivo.**

El objetivo de este estudio fue determinar si la vacuna de la gripe induce la producción de anticuerpos anti-HLA donante específico en el receptor de TOS y el impacto en la viabilidad del órgano trasplantado.

### **Material y método.**

Desarrollamos un estudio multicéntrico, prospectivo, longitudinal de casos consecutivos de receptores de TOS que recibieron la vacunación gripal durante cuatro temporadas gripales consecutivas, de 2009 a 2013. Los pacientes fueron incluidos en 12 hospitales españoles pertenecientes a la Red de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI). Se

incluyeron receptores de TOS, mayores de 15 años y que recibieron la vacuna de la gripe a partir del primer mes post-trasplante. Los pacientes fueron excluidos en caso de presentar alergia al huevo o algún componente de la vacuna antigripal, si fueron vacunados durante el primer mes post-trasplante o en caso de embarazo.

Se recogieron muestras de suero de los pacientes en el momento de la vacunación y cinco semanas después. Los pacientes vacunados en la temporada 2012-2013 procedían del ensayo clínico TRANSGRIPE 1-2 desarrollado en nuestro grupo en el que eran aleatorizados para recibir una o dos dosis de vacuna, y se recogieron muestras adicionales a las 10 semanas y al año de la vacunación.

La determinación de anticuerpos anti-HLA se realizó mediante el Kit comercial FlowPRA™ Screening Test, One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, que permite determinar los niveles de anti-HLA en el suero por citometría de flujo. Se determinó la positividad del paciente en caso de que la reactividad entre el suero y el kit fuese superior al 10%.

En aquellos pacientes negativos en el momento de la vacunación y positivos 5 semanas después, se caracterizaron los anti-HLA detectados mediante tecnología Luminex (Life Match fluoroanalyzer, Luminex 100 IS) considerándose las muestras positivas en caso de que la intensidad media de fluorescencia (MFI) fuese superior a 1500 y se compararon con el genotipo del donante para establecer la especificidad. La muestra fue considerada positiva.

### **Resultados y discusión.**

Este estudio se diseñó para analizar la producción de DSA después de la vacunación frente a influenza, en receptores de TOS en función de tres estrategias de mejora para la vacunación: la adición de un adyuvante a la composición vacunal, la vacunación en los primeros meses desde el trasplante y la administración de una segunda dosis de vacuna.

Al final del estudio incluimos 490 receptores de TOS vacunados entre 2009 y 2013, 110 de los cuales habían recibido la vacuna adyuvantada frente a A(H1N1)pdm, 59 recibieron una dosis de vacuna trivalente estacional en los primeros seis meses desde el trasplante, 130 recibieron dos dosis de vacuna trivalente estacional, y 191 pacientes recibieron una dosis de vacuna trivalente estacional después de los seis primeros meses desde el trasplante.

Algunos estudios basados en ensayos en células humanas y modelos animales han demostrado que la inmunización frente a influenza puede hacer reacción cruzada con aloanticuerpos relacionados con la respuesta de rechazo del injerto (106, 152). Sin embargo, en nuestra cohorte de 490 receptores de TOS, no encontramos ninguna asociación entre el desarrollo de anticuerpos neutralizantes tras la vacunación y la producción de anticuerpo anti-HLA.

Al contrario de lo que se había descrito previamente por algunos autores , en este estudio no hemos encontrado diferencias en la producción de anticuerpos anti-HLA tras la vacunación en función del tipo de órgano trasplantado (121).

Centrándonos en los análisis de la producción de anticuerpos anti-HLA en función de las estrategias de mejora propuestas para la vacunación antigripal, en nuestros análisis no encontramos relación entre la producción de estos anticuerpos y la composición vacunal, adyuvantada o no, y la vacunación temprana, en los primeros seis meses desde el trasplante.

Resultados previos en nuestro grupo reflejaban que los pacientes con títulos detectables de anticuerpos neutralizantes en el momento de la vacunación desarrollaban una mejor respuesta post-vacunal (104), por lo que pensamos que una segunda dosis de vacuna que imite este efecto, podría mejorar la respuesta a la vacunación en el receptor de TOS. En este estudio, analizamos la producción de anti-HLA en 130 pacientes que recibieron dos dosis de vacuna, a las 5, 10 semanas y al año de la vacunación, únicamente observamos un aumento significativo de anti-HLA a las 10 semanas de la primera inmunización, en los pacientes que recibieron una segunda dosis, aunque este aumento fue de anti-HLA clase I, en menor medida relacionado con el rechazo (153), y en ningún caso fueron anticuerpos anti-HLA donante específicos.

De los 75 (14,4%) casos que siendo negativos en el momento de la vacunación, desarrollaron niveles positivos de anticuerpos anti-HLA tras la vacunación, únicamente en cinco (1,02%) pacientes fueron anticuerpos donante específicos, y ninguno de ellos desarrolló rechazo del injerto durante el seguimiento.

Los únicos dos casos de rechazo detectados en la cohorte durante el seguimiento fueron negativos en la detección de anticuerpos anti-HLA.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la vacunación gripal no está asociada con el rechazo de órgano en los receptores de TOS. Además, las estrategias planteadas para mejorar la respuesta inmune a la vacunación, como la administración de una vacuna adyuvantada, la vacunación en los primeros meses tras el trasplante y la administración de una segunda dosis, no están relacionadas con el aumento de anticuerpos anti-HLA relacionados con el rechazo del injerto.



## **8. DISCUSIÓN**



La infección por influenza es una causa principal de morbilidad y mortalidad en el receptor de TOS. Se han descrito complicaciones graves tras la infección en estos pacientes, como neumonía viral y bacteriana primaria y secundaria, enfermedad pulmonar, rechazo del órgano trasplantado e incluso la muerte (99). En las guías de práctica clínica se propone la vacuna de la gripe como la medida más eficaz para prevenir la infección en estos pacientes. Aunque la vacunación en el receptor de TOS protege al paciente de las complicaciones de la gripe (99, 104) su eficacia es variable, con una proporción de receptores de TOS seroprottegidos tras la vacunación entre el 15% y el 90%, (13, 26, 31, 67, 112, 143) , valores en todo caso inferiores a los alcanzados por los individuos inmunocompetentes.

Por ello, es fundamental adoptar medidas para mejorar la eficacia vacunal en la población trasplantada especialmente vulnerable a la infección por el virus de la gripe.

Se han propuesto distintas medidas para aumentar la efectividad de la vacuna frente a la infección por influenza en el receptor de TOS, como la vacunación temprana tras el trasplante, acortando el tiempo desde el trasplante a la vacunación, la administración de una vacuna adyuvantada o el aumento del número de dosis para conseguir un efecto "booster".

Aunque se ha sugerido que la vacunación durante los primeros seis meses del trasplante puede afectar a la seguridad de la vacuna, no existen evidencias experimentales de que la vacunación en este periodo no sea segura, y actualmente las recomendaciones están basadas en opiniones de expertos que se fundamentan en resultados obtenidos en series pequeñas de pacientes (60, 135, 143, 154).

También se ha planteado la hipótesis de que una estimulación excesiva del sistema inmune en estos pacientes, sometidos a medicación inmunosupresora, pueda generar una respuesta aloinmune inespecífica mediada por anticuerpos anti-HLA que resulte en el rechazo del órgano trasplantado, especialmente en los primeros meses tras el trasplante. Este hecho podría además magnificarse al adicionar un compuesto adyuvante a la vacuna o el aumentar el número de dosis administradas (121, 155, 156).

Hasta la fecha, existen pocos estudios que hayan evaluado estos importantes aspectos de la seguridad de la vacunación gripal en relación con el tiempo de administración y su relación con el rechazo de órgano en estos pacientes. Los resultados al respecto en los

que se basan las recomendaciones de las guías de práctica clínica actuales son en muchos casos discordantes o provienen del análisis de series cortas de pacientes, no diseñadas específicamente para evaluar estos aspectos. En este trabajo analizamos una serie de pacientes receptores de TOS con un tamaño muestral elevado, la mayor publicada hasta la fecha, con carácter prospectivo, lo cual ha permitido obtener resultados concluyentes acerca de la eficacia y la seguridad de la vacunación gripal en estos pacientes, teniendo en cuenta las estrategias de mejora mencionadas.

Discutimos a continuación los resultados obtenidos al respecto.

### **8.1 Vacunación gripal en pacientes receptores de TOS.**

La vacunación estacional frente al virus de la gripe es el método más eficaz para evitar las complicaciones derivadas de la infección por el virus y en las guías clínicas se recomienda la administración de la vacuna antigripal anualmente a los receptores de TOS a partir de los tres-seis meses del trasplante (60).

En un estudio publicado por Horst *et al.* se analizó la evolución clínica durante un año tras la vacunación gripal en 9.678 pacientes receptores de riñón, inmunizados entre seis meses y un año después del trasplante. La vacunación se asoció con un menor riesgo de infección por influenza, rechazo del injerto y complicaciones graves o muerte, al compararlos con 42.052 receptores de TOS que no recibieron la vacuna de la gripe (125).

Sin embargo, la vacuna de la gripe ha demostrado una eficacia variable en pacientes con TOS que oscila entre el 15 y el 90% (58, 99, 103, 105-112, 126), en función de la clínica del paciente, la composición de la vacuna y la estrategia de vacunación, con ratios de seroprotección de entre un 40% y un 80% para los pacientes con trasplante renal, por encima del 80% en los receptores hepáticos y hasta el 46% en los pacientes que reciben un trasplante pulmonar. En distintos estudios multicéntricos coordinados por nuestro grupo, en los que se midieron el título de anticuerpos neutralizantes tras recibir una dosis de la vacuna pandémica en 2009-2010 o la vacuna estacional en 2010-2011, observamos una eficacia dentro de los mínimos exigidos internacionalmente (100), aunque inferior a la descrita para la población inmunocompetente, con tasas de seroconversión de entre el 73,1 y el 82,9% y seroprotección entre el 73 y el 90% (99, 104). En estas cohortes en el 1.1% de pacientes que recibieron la vacuna de la gripe

---

A(H1N1)pdm en la temporada 2009-2010 y en el 3.1% de aquellos vacunados en la temporada 2010-2011, fracasó a la vacunación ya que desarrollaron gripe confirmada microbiológicamente tras la vacunación. Sin embargo, a pesar de que los pacientes vacunados desarrollaron infección gripal, la vacuna de la gripe redujo en un 70% el riesgo de desarrollar neumonía (58).

En esta tesis analizamos la respuesta humoral frente a influenza A(H1N1)pdm, influenza A/H3N2 e influenza B, tras la vacunación en una cohorte de 798 receptores de trasplante de órgano sólido, durante 4 temporadas gripales consecutivas. Nuestros resultados muestran que aunque la respuesta a la vacunación de seroprotección y seroconversión está por encima del 70% de para las tres cepas estudiadas, esta respuesta es menor a la observada en la población inmunocompetente, que sería la deseable de alcanzar en nuestros pacientes por tener mayor riesgo de complicaciones tras la infección.

## **8.2 Factores relacionados con la respuesta a la vacuna de la gripe.**

### **8.2.1 Relación de las comorbilidades y la respuesta a la vacunación en el receptor de TOS.**

Aunque algunos estudios han mostrado que los receptores de TOS que han recibido la vacuna de la gripe que presentan otras patologías o comorbilidades en el momento de la vacunación desarrollan una peor respuesta de anticuerpos frente a la vacuna, entre ellos los pacientes con diabetes mellitus o aquellos con enfermedad hepática crónica (135, 147), nuestros resultados muestran una respuesta similar a la vacunación independientemente de las comorbilidades del paciente en el momento de la administración de la misma. De hecho en el análisis multivariante de los posibles factores confusores que puedan afectar a la respuesta humoral tras la vacunación no observamos relación entre las comorbilidades estudiadas: diabetes mellitus, hepatopatía, nefropatía y cardiopatía.

### **8.2.2. Relación entre la inmunosupresión y la respuesta a la vacunación en el receptor de TOS.**

Otro de los factores que se ha relacionado con una peor respuesta a la vacunación gripal es la medicación inmunosupresora que es administrada al paciente tras el trasplante. Recientemente, un metanálisis empleando datos de 947 receptores de TOS, obtenidos de 15 ensayos clínicos, mostró menores ratios de seroprotección frente al virus influenza en los pacientes que recibieron micofenolato mofetilo como medicación inmunosupresora, y no se describían diferencias en los que recibieron tacrólimus, sirólimus, ciclosporina o azatioprina (157). En un estudio previo realizado en nuestro grupo, en el que analizamos una cohorte de 346 pacientes que recibieron una dosis de la gripe pandémica adyuvantada, encontramos que aquellos pacientes que habían recibido inhibidores del mTOR como medicación inmunosupresora, desarrollaban una respuesta humoral frente a influenza A(H1N1)pdm inferior que los pacientes que recibieron un inmunosupresor distinto (OR 0.90, IC95% 0,8 - 1,1) como micofenolato, ciclosporina o tacrólimus (99). Sin embargo en el presente estudio, con una cohorte de pacientes mucho mayor, de 798 receptores de TOS, vacunados en cuatro temporadas gripales consecutivas, entre 2009 y 2013, no observamos diferencias estadísticamente significativas en relación a la medicación inmunosupresora y el porcentaje de seroprotección frente a A(H1N1)pdm, A/H3N2 o influenza B. Este resultado aunque puede resultar contradictorio a lo observado anteriormente, podría justificarse por el hecho de que la mayoría de los pacientes que recibieron m-TOR tenían títulos de anticuerpos en el momento de la vacunación, y como también hemos demostrado previamente la respuesta vacunal es mejor en pacientes con títulos prevacunales (104).

### **8.2.3. Relación entre el tipo de órgano trasplantado y la respuesta a la vacunación en el receptor de TOS.**

Como se ha comentado anteriormente la incidencia y complicaciones por la infección gripal varía en función del tipo de órgano. Algunos trabajos proponen que la eficacia de la vacunación en los pacientes con TOS puede variar también en función del tipo de injerto. A modo de ejemplo, se ha descrito una menor respuesta a la vacunación gripal en los pacientes con trasplante pulmonar que puede variar en un rango 8-46%, mientras

que los pacientes con trasplante renal o hepático la eficacia de la vacunación puede alcanzar entre el 80 y el 90% (44, 59, 61, 126, 158).

Esta diferencia en la respuesta podría estar influida por el diferente estado neto de inmunosupresión en función del tipo de trasplante y/o por las comorbilidades asociadas a los distintos tipos de trasplante, como son la insuficiencia renal o hepática, la cardiopatía o enfermedad pulmonar.

En el presente trabajo, en la cohorte de 798 pacientes con trasplante renal, hepático, cardíaco y/o pulmonar incluidos durante cuatro temporadas gripales consecutivas, observamos una menor respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a influenza A(H1N1)pdm y H3N2 en los receptores de trasplante renal, y frente a influenza B en los trasplantados cardíacos, con respecto a los observados en los receptores de trasplante hepático. Sin embargo, en todos los casos, más del 80% de los pacientes estaban seroprotegidos tras la vacunación.

#### **8.2.4. Vacunación en los primeros meses tras el trasplante.**

Durante los primeros meses tras el trasplante, los receptores de TOS tienen cinco veces más riesgo de desarrollar complicaciones graves derivadas de la infección por influenza (31). Sin embargo, las guías actuales de práctica clínica recomiendan la administración de la vacuna de la gripe a partir de los primeros tres a seis meses desde el trasplante (143). Como se ha comentado con anterioridad, el nivel de evidencias de estas recomendaciones es bajo. Sin embargo el beneficio de la vacunación aunque sea pequeño, siempre que sea segura y no se asocie a un aumento de riesgo de rechazo para el paciente, dadas las complicaciones derivadas de una posible infección por influenza hace que debiera recomendarse la vacunación precoz tras el trasplante. Estudios previos de nuestro grupo observaron en una cohorte de 346 pacientes, de los cuales 58 habían sido vacunados en los primeros seis meses del trasplante, que la respuesta a la vacuna no se asociaba con el tiempo transcurrido desde el trasplante (99).

En este trabajo hemos ampliado el número de pacientes incluidos en los que hemos estudiado la eficacia y seguridad tras la vacunación en una cohorte de 798 receptores de TOS de los cuales 130 pacientes habían sido vacunados en los primeros seis meses post-trasplante respecto a los 668 vacunados más de seis meses tras el trasplante, siendo la

mayor serie de pacientes publicada hasta la fecha. Nuestros datos demuestran que la vacunación es segura y no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de anticuerpos neutralizantes entre ambos grupos de pacientes para ninguna de las cepas de influenza analizadas. Al estratificar el grupo de pacientes que recibió la vacuna en los primeros seis meses post-trasplante en < tres meses, cuatro meses, cinco meses y seis meses tampoco observamos diferencias en la respuesta inmune entre los grupos analizados. Los resultados obtenidos fueron similares, e incluso en los pacientes que recibieron la vacuna en los tres primeros meses tras el trasplante observamos la respuesta de anticuerpos neutralizantes tendió a ser mayor y con mayores tasas de seroprotección tras la vacunación.

La justificación de esta observación probablemente esté en relación con la presencia de títulos basales previos a la vacunación, que si bien no son protectores si promueven una mejor respuesta a la vacunación (104).

En esta tesis, confirmamos este aspecto ya que al analizar 798 pacientes vacunados la presencia de títulos previos a la vacunación, fue el único factor asociado significativamente a una mejor respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a las tres cepas de influenza analizadas.

En la cohorte estudiada tan sólo un paciente, receptor de trasplante renal, vacunado 118 meses tras el trasplante tuvo un episodio de rechazo tras la vacunación. Sin embargo, este paciente tuvo otras posibles causas que podrían explicar el rechazo ya que tenía niveles bajos de inmunosupresores por interacción con rifampicina, que le fue administrada para tratar un episodio de tuberculosis, por lo que sugiere que el rechazo crónico detectado durante el seguimiento no estuvo relacionado con la administración de la vacunación gripal.

Por este motivo consideramos importante vacunar a todos los pacientes con enfermedad de órgano terminal que esté en la lista de espera para el trasplante para promover la presencia de títulos de anticuerpos en el post-trasplante.

Otros estudios han demostrado que aunque el mantenimiento de la respuesta inmune humoral frente a influenza es inferior a la desarrollada en los pacientes

inmunocompetentes, la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero, previos a la vacunación, mejora la respuesta a inmune humoral (26, 104). Una forma de promover la presencia de títulos de anticuerpos previos a la vacunación que puedan promover una respuesta

“booster” es la administración de una segunda dosis de vacunación gripal para los receptores de TOS, que pueda emular el efecto sumatorio en la respuesta que hemos observado en los pacientes que mantenían títulos de anticuerpos basales.

### **8.3 Vacunación de la gripe y rechazo.**

En la población general, la vacuna de la gripe es segura y reduce la incidencia de efectos adversos graves(159). En el receptor de TOS, se ha planteado la posibilidad teórica de que la vacunación de la gripe pueda desencadenar un rechazo del injerto (40, 125, 160).

Este aspecto se ha analizado en diversos estudios en los que se incluyeron receptores de trasplante tras recibir la vacuna de la gripe. La mayoría de ellos no muestran relación entre la vacunación gripal y el desarrollo de una respuesta de rechazo del injerto en receptores de trasplante renal (105, 107, 145), o cardíaco (124, 161, 162). Sin embargo, David *et al.*, en una serie de 130 receptores de trasplante hepático, observaron el desarrollo de rechazo agudo un mes después de la administración de la vacuna de la gripe aunque sólo en dos de los pacientes (160).

Una producción *de novo* de anticuerpos anti-HLA DSA podría explicar esta hipótesis, (121, 148). Sin embargo, se ha postulado que la adición de un adyuvante a la composición vacunal, que aumenta la inmunogenicidad de la misma, pueda simultáneamente incrementar el riesgo de rechazo del injerto al promover el aumento de anticuerpos anti-HLA, como en el caso del estudio realizado por Katerinis *et al.*, en el que un 17,3% de receptores renales vacunados seis semanas tras el trasplante y un 11,9% de los vacunados seis meses tras el trasplante, aumentaron sus niveles de anticuerpos anti-HLA tras recibir la vacuna adyuvantada (121).

En esta tesis se han analizado en una cohorte prospectiva de receptores de TOS la presencia de rechazo y la producción *de novo* de anticuerpos anti-HLA tras la

vacunación gripal, en 490 receptores de trasplante hepático, renal, cardíaco y pulmonar, centrándonos en la influencia de las distintas estrategias mencionadas para mejorar la respuesta inmune con el rechazo del injerto. A continuación se discuten cada una de estas estrategias.

#### **8.4 Relación de la vacunación gripal durante los primeros seis meses del trasplante con el rechazo y la producción de anticuerpos anti-HLA *de novo*.**

La seguridad de la vacunación de la gripe en los primeros meses del trasplante es un aspecto fundamental para establecer la indicación de la misma.

En la presente tesis demostramos que la vacunación de la gripe es segura a partir del primer mes post- trasplante.

Como se ha comentado anteriormente el tiempo tras el trasplante a partir del cual administrar la vacuna antigripal es un aspecto no consensuado en la literatura. La recomendación actual propone vacunar a la población con TOS tras tres a seis meses del trasplante (31) Los datos de la presente tesis confirman que el tiempo transcurrido desde el trasplante no se relaciona con la aparición de rechazo en los pacientes. Además, el tiempo desde el trasplante no se relacionó con la producción *de novo* de anticuerpos anti-HLA DSA o no DSA. Es por ello, que dada la respuesta inmunológica, la falta de efectos adversos y la alta tasa de complicaciones producidas como consecuencia de la infección por influenza en los primeros seis meses tras el trasplante, consideramos que la administración de la vacuna antigripal debe ser recomendada a partir primer mes post-trasplante.

#### **8.5 Adición de un adyuvante a la composición vacunal.**

Para producir una respuesta inmunológica rápida y eficaz frente a la gripe pandémica, que se extendió rápidamente y con gran virulencia en varios países en el último trimestre de 2009, se llevó a cabo una formulación de la vacuna pandémica en la que se incorporó un adyuvante a su composición. El efecto del adyuvante es promover un aumento inespecífico de la respuesta inmune, que puede tener efectos positivos en la

respuesta alcanzada por los pacientes (131). El mecanismo exacto por el que determinados compuestos alumínicos como el MF59 y ASO3 causan este efecto activador no se conoce, pero se ha comprobado que atrae de forma inespecífica a células del sistema inmune hacia el lugar de la inyección (131, 151). Aunque no hay resultados concluyentes de que la vacunación antigripal mediante la formulación adyuvantada mejore significativamente la respuesta en comparación con la vacuna no adyuvantada en la población trasplantada en general, hay estudios que muestran una mejor respuesta en determinados grupos de edad (151). En un estudio previo realizado por nuestro grupo, analizamos la respuesta a la vacunación gripal en una cohorte de 346 receptores de TOS que recibieron una dosis de la vacuna antigripal pandémica adyuvantada en 2009, observamos una respuesta adecuada a la vacunación en todos los grupos de edad, y una mejor respuesta en aquellos pacientes con títulos detectables de anticuerpos neutralizantes en el momento de la vacunación (99).

Sin embargo, algunos estudios sugieren que la vacuna adyuvantada podría desencadenar una respuesta de rechazo del injerto mediada por la producción de anticuerpos anti-HLA donante específicos, debido probablemente a la activación inespecífica del sistema inmune que provoca el adyuvante (121).

Posteriormente, en un ensayo clínico reciente publicado por Kumar *et al.*, con un ensayo clínico en el que compara la respuesta de los pacientes que reciben la fórmula adyuvantada y la no adyuvantada, no encontraron relación entre la vacunación adyuvantada y el rechazo del injerto (151). Aunque en este estudio únicamente se analiza la seguridad de la vacunación en pacientes receptores de trasplante renal.

Los datos de la presente tesis muestran que no hay diferencias en la producción de anticuerpos anti-HLA entre los receptores de TOS que recibieron la vacuna adyuvantada y los que recibieron la vacuna no adyuvantada. Y aunque uno de los 110 pacientes que recibieron una dosis de vacuna adyuvantada desarrolló anti-HLA DSA, no tuvo ningún evento de rechazo durante el seguimiento, por lo que no encontramos relación entre la composición de la vacuna y el desarrollo de eventos de rechazo del injerto en los receptores de TOS.

### **8.6 Uso de varias dosis de vacuna de la gripe.**

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de títulos basales prevacunales aumenta la respuesta a la vacuna de la gripe. El uso de dos dosis de vacunas podría emular el efecto sumatorio en la respuesta que hemos observado en los pacientes que mantenían títulos de anticuerpos detectables a largo plazo y mejorar la respuesta en el receptor de TOS,(99, 104).

En el contexto de estos estudios y de los resultados previos, nuestro grupo diseñó un ensayo clínico en el que los pacientes fueron aleatorizados para recibir una o dos dosis de la vacuna trivalente estacional en la temporada gripal 2012-2013, administrando la segunda dosis 5 semanas tras la primera inmunización (163). Un aspecto crucial de esta intervención fue valorar la seguridad de esta estrategia y su relación con el rechazo.

En la presente tesis hemos querido confirmar si la administración de una segunda dosis de vacuna se asocia con un mayor riesgo de rechazo y de producción de anticuerpos anti-HLA DSA. Observamos que aunque en pacientes que recibieron dos dosis de vacuna observamos un aumento significativo en la proporción de pacientes con anticuerpos anti-HLA de clase I, cinco semanas después de la segunda dosis, aunque éstos no fueron anticuerpos donante específicos ya que sólo en un paciente tuvo anticuerpos anti-HLA DSA y en este caso el paciente no desarrolló eventos de rechazo durante el seguimiento.

Por otro lado, el porcentaje de pacientes con detección positiva de anticuerpos anti-HLA de clase II, que son los anticuerpos implicados generalmente con el rechazo el injerto, no aumentó significativamente tras la administración de una segunda inmunización, por lo que el número de dosis no está relacionado con el aumento de anti-HLA implicados en el rechazo del injerto.

Un año tras la vacunación, sólo tres pacientes habían desarrollado anticuerpos anti-HLA DSA. En dos casos, los pacientes habían recibido una única dosis de vacuna, y el tercero recibió una segunda dosis. Sin embargo, ninguno de ellos desarrolló episodios de rechazo durante el seguimiento, por lo que podemos concluir que la administración

---

de una segunda dosis de vacuna no está relacionada con el rechazo clínico del injerto mediado por anticuerpos a largo plazo.

Nuestros resultados sugieren que tener anticuerpos anti-HLA en el momento de la vacunación no predispone para un aumento de los anticuerpos anti-HLA después de la vacunación, de hecho se observó una disminución en la reactividad en este grupo de pacientes. Sin embargo, los pacientes con niveles preexistentes de anticuerpos anti-HLA tenían más riesgo de seguir presentándolos después de la vacunación, aunque ninguno de los pacientes tuvo un incremento en los niveles de anticuerpos después de la inmunización. Sin embargo, en nuestra cohorte, los pacientes que recibieron dos dosis de la vacuna eran más propensos a desarrollar anticuerpos *de novo* anti-HLA. Algunos autores han propuesto que para llegar a un umbral crítico que promueve el rechazo es necesario generar un número suficiente de células T de memoria alorreactivas que pueden estar relacionados con el número de dosis de vacuna de la gripe administradas (57), lo que puede explicar los resultados observados en los pacientes que recibieron dos dosis de la vacuna, a pesar de haber tenido un aumento de anticuerpos anti-HLA, no se alcanzó dicho umbral, por lo que no desarrollaron el rechazo del injerto.

De los dos (0,4%) pacientes que fueron diagnosticados con rechazo del injerto en esta cohorte, uno de ellos experimentó una reducción en la función pulmonar antes de la vacunación de la gripe, y el segundo tuvo otras circunstancias concomitantes, aparte de la vacunación que pueden justificar el rechazo del injerto. Sin embargo, ninguno de los pacientes desarrolló *de novo* DSA.

En este trabajo hemos tenido varias limitaciones que deben ser mencionadas. La primera es que el diagnóstico del rechazo ha sido en todo momento clínico, no realizándose biopsias rutinarias a los pacientes. No obstante todos los pacientes han sido seguidos durante un año, y tan sólo se diagnosticó el rechazo en los casos descritos. Por otra parte, de haber existido episodios de rechazo subclínicos, estos no tuvieron consecuencias en la supervivencia o funcionalidad del injerto. Segunda, debido a que no se han realizado detecciones de infecciones asintomáticas por el virus influenza en nuestra cohorte, no hemos podido relacionar la relación entre la vacunación y la ausencia de infección asintomática. Tercera, aunque el número de receptores de TOS

que recibieron la vacuna de la gripe en los primeros tres meses tras el trasplante puede resultar bajo, la cohorte analizada en esta tesis, es la mayor serie de pacientes vacunados en los primeros tres meses post-trasplante publicada hasta la fecha. Cuarta, ya que muy pocos pacientes recibieron tratamiento de depleción de linfocitos o rituximab como medicación inmunosupresora, nuestros resultados no serían aplicables a los receptores de TOS que reciben este tipo de tratamientos. Finalmente, aunque el número de receptores de trasplante cardíaco vacunados en los primeros seis meses desde el trasplante es bajo, el porcentaje de seroprotección fue superior al 67% para las tres cepas estudiadas, por lo que se puede considerar que la vacuna de la gripe es efectiva en este grupo de pacientes.

En resumen, nuestros resultados en el presente estudio muestran que la vacunación gripal administrada dentro de los primeros seis meses post-trasplante es tan inmunógena como cuando se administra más allá del sexto mes del trasplante. Dada la respuesta inmunológica y la falta de efectos adversos tras la vacunación así como la alta tasa de complicaciones producidas como consecuencia de la infección por influenza en los primeros seis meses tras el trasplante, la administración de la vacuna antigripal debería ser recomendada a partir del primer mes post-trasplante. Además, debería recomendarse la vacunación anual de la gripe a los pacientes con enfermedad de órgano terminal para promover la presencia de títulos de anticuerpos neutralizantes y una mejor protección inmunológica en los primeros momentos tras el trasplante. Además, los resultados mostrados en esta tesis demuestran que la vacunación gripal en el receptor de TOS es segura y no está relacionada con la producción de aloanticuerpos anti-HLA relacionados con el rechazo de órgano, desde el primer mes post-trasplante independientemente del órgano trasplantado, del régimen de inmunosupresión o las comorbilidades diagnosticadas en el paciente.

## **9. CONCLUSIONES**



1. La vacuna de la gripe es efectiva en el receptor de trasplante según los criterios internacionales, aunque la tasa de seroprotección y seroconversión son menores a las descritas en la población general
2. El receptor de TOS que recibe la vacunación gripal en los primeros seis meses post-trasplante, desarrolla una respuesta humoral a la vacunación similar a la de los pacientes vacunados a partir del sexto mes.
3. La eficacia de la vacunación en el receptor de TOS no se ve influenciada por las comorbilidades ni el tratamiento inmunosupresor recibido, aunque sí por el tipo de trasplante, siendo la respuesta menor en los receptores de trasplante renal.
4. La presencia de títulos de anticuerpos basales aumenta la respuesta a la vacuna de la gripe.
5. Es importante reforzar la vacunación de la gripe en los pacientes con enfermedad de órgano terminal de cara a aumentar los títulos basales en las primeras etapas y mejorar la respuesta a la vacuna tras el trasplante.
6. La vacuna de la gripe no se relaciona con la presencia de rechazo clínico en el receptor de TOS.
7. El tiempo transcurrido tras el trasplante a la vacunación gripal no se asocia con el desarrollo de rechazo clínico.
8. El uso de vacuna adyuvantada o de dos dosis de vacuna de la gripe no aumentan el riesgo de rechazo.
9. La administración de la vacuna de la gripe en el receptor de trasplante de órgano sólido no está relacionada con el aumento de anticuerpos anti-HLA donante específicos que desencadenen una respuesta de rechazo del injerto.
10. La vacunación gripal en los primeros meses desde el trasplante no está relacionada con el aumento de anticuerpos anti-HLA.
11. Dado su seguridad y eficacia, la vacuna de la gripe debería administrarse a partir del primer mes del trasplante en todo receptor de órgano sólido.

12. La adición de un compuesto adyuvante a la composición vacunal, no está relacionada con el aumento de anticuerpos anti-HLA en el receptor de TOS.

13. La administración de una segunda dosis de vacuna en el receptor de TOS aumenta la producción de anticuerpos anti-HLA clase I aunque no se relacionan con el rechazo del injerto.

14. La administración de una segunda dosis de vacuna de la gripe en el receptor de TOS no está relacionada con el aumento de anticuerpos anti-HLA clase II y con el rechazo del injerto.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**



1. Aras S, Aiyar A, Amedee AM, Gallaher WR. Molecular character of influenza A/H1N1 2009: Implications for spread and control. *Indian journal of microbiology* 2009;49(4):339-347.
2. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews* 1992;56(1):152-179.
3. Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annual review of immunology* 1990;8:737-771.
4. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009;459(7249):931-939.
5. Shepherd J, Jones J, Takeda A, Davidson P, Price A. Adefovir dipivoxil and pegylated interferon alfa-2a for the treatment of chronic hepatitis B: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2006;10(28):iii-iv, xi-xiv, 1-183.
6. Webster RG, Laver WG. Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. *Virology* 1980;104(1):139-148.
7. Watts G. A/H1N1 influenza virus: the basics. *BMJ* 2009;339:b3046.
8. Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *The New England journal of medicine* 2009;361(3):279-285.
9. Waffarn EE, Baumgarth N. Protective B cell responses to flu--no fluke! *J Immunol* 2011;186(7):3823-3829.
10. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Janke BH, Richt JA. Swine influenza viruses a North American perspective. *Advances in virus research* 2008;72:127-154.
11. Braciale TJ, Sun J, Kim TS. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nature reviews Immunology* 2012;12(4):295-305.
12. Achdout H, Meninger T, Hirsh S, Glasner A, Bar-On Y, Gur C et al. Killing of avian and Swine influenza virus by natural killer cells. *Journal of virology* 2010;84(8):3993-4001.
13. Yewdell JW, Schubert U, Bennink JR. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *Journal of cell science* 2001;114(Pt 5):845-851.

14. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annual review of immunology* 1998;16:323-358.
15. Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute* 2013;105(16):1172-1187.
16. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annual review of immunology* 1993;11:403-450.
17. Valkenburg SA, Rutigliano JA, Ellebedy AH, Doherty PC, Thomas PG, Kedzierska K. Immunity to seasonal and pandemic influenza A viruses. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2011;13(5):489-501.
18. Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus research* 2011;162(1-2):19-30.
19. Wu C, Zanker D, Valkenburg S, Tan B, Kedzierska K, Zou QM et al. Systematic identification of immunodominant CD8+ T-cell responses to influenza A virus in HLA-A2 individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(22):9178-9183.
20. Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS pathogens* 2008;4(6):e1000085.
21. Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, Huang AK, Perkins M, Liebner JC et al. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nature medicine* 2012;18(2):274-280.
22. Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Hoschler K, Adamson W, Carman W et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nature medicine* 2013;19(10):1305-1312.
23. Webster RG, Laver WG. Preparation and properties of antibody directed specifically against the neuraminidase of influenza virus. *J Immunol* 1967;99(1):49-55.
24. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunological reviews* 2010;236:265-275.
25. DiLillo DJ, Tan GS, Palese P, Ravetch JV. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo. *Nature medicine* 2014;20(2):143-151.

26. Lofano G, Kumar A, Finco O, Del Giudice G, Bertholet S. B Cells and Functional Antibody Responses to Combat Influenza. *Frontiers in immunology* 2015;6:336.
27. Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* 2004;172(9):5598-5605.
28. Stanekova Z, Vareckova E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology journal* 2010;7:351.
29. Han T, Marasco WA. Structural basis of influenza virus neutralization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1217:178-190.
30. Eccles R. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *The Lancet Infectious diseases* 2005;5(11):718-725.
31. Cordero E, Perez-Romero P, Moreno A, Len O, Montejo M, Vidal E et al. Pandemic influenza A(H1N1) virus infection in solid organ transplant recipients: impact of viral and non-viral co-infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012;18(1):67-73.
32. Review of the 2015 influenza season in the southern hemisphere. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2015;90(48):645-660.
33. Schaffer FL, Soergel ME, Straube DC. Survival of airborne influenza virus: effects of propagating host, relative humidity, and composition of spray fluids. *Archives of virology* 1976;51(4):263-273.
34. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS pathogens* 2007;3(10):1470-1476.
35. Monto AS, Kioumeh F. The Tecumseh Study of Respiratory Illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966--1971. *American journal of epidemiology* 1975;102(6):553-563.
36. Jost S, Quillay H, Reardon J, Peterson E, Simmons RP, Parry BA et al. Changes in cytokine levels and NK cell activation associated with influenza. *PloS one* 2011;6(9):e25060.

37. III SdVdlGeESIdSC. Desde la Semana 40/2015 hasta la semana 20/2016.<http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientificotecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/gripe.shtml>. 2016.
38. Schepetiuk S, Papanoum K, Qiao M. Spread of influenza A virus infection in hospitalised patients with cancer. *Australian and New Zealand journal of medicine* 1998;28(4):475-476.
39. Billings JL, Hertz MI, Savik K, Wendt CH. Respiratory viruses and chronic rejection in lung transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2002;21(5):559-566.
40. Briggs JD, Timbury MC, Paton AM, Bell PR. Viral infection and renal transplant rejection. *British medical journal* 1972;4(5839):520-522.
41. Garantziotis S, Howell DN, McAdams HP, Davis RD, Henshaw NG, Palmer SM. Influenza pneumonia in lung transplant recipients: clinical features and association with bronchiolitis obliterans syndrome. *Chest* 2001;119(4):1277-1280.
42. Keane WR, Helderman JH, Luby J, Gailiunas P, Hull AR, Kokko JP. Epidemic renal transplant rejection associated with influenza A victoria. *Proceedings of the Clinical Dialysis and Transplant Forum* 1978;8:232-236.
43. Vilchez RA, McCurry K, Dauber J, Lacono A, Griffith B, Fung J et al. Influenza virus infection in adult solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2002;2(3):287-291.
44. Kumar D, Michaels MG, Morris MI, Green M, Avery RK, Liu C et al. Outcomes from pandemic influenza A H1N1 infection in recipients of solid-organ transplants: a multicentre cohort study. *The Lancet Infectious diseases* 2010;10(8):521-526.
45. Kusne S, Dummer JS, Singh N, Iwatsuki S, Makowka L, Esquivel C et al. Infections after liver transplantation. An analysis of 101 consecutive cases. *Medicine* 1988;67(2):132-143.
46. Wendt CH. Community respiratory viruses: organ transplant recipients. *The American journal of medicine* 1997;102(3A):31-36; discussion 42-33.

47. Kaiser L, Fritz RS, Straus SE, Gubareva L, Hayden FG. Symptom pathogenesis during acute influenza: interleukin-6 and other cytokine responses. *Journal of medical virology* 2001;64(3):262-268.
48. Smud A, Nagel CB, Madsen E, Rial Mdel C, Barcan LA, Gomez AA et al. Pandemic influenza A/H1N1 virus infection in solid organ transplant recipients: a multicenter study. *Transplantation* 2010;90(12):1458-1462.
49. Low CY, Kee T, Chan KP, Oon LL, Tan CK, Tee NW et al. Pandemic (H1N1) 2009 infection in adult solid organ transplant recipients in Singapore. *Transplantation* 2010;90(9):1016-1021.
50. Ng BJ, Glanville AR, Snell G, Musk M, Holmes M, Chambers DC et al. The impact of pandemic influenza A H1N1 2009 on Australian lung transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11(3):568-574.
51. Mauch TJ, Bratton S, Myers T, Krane E, Gentry SR, Kashtan CE. Influenza B virus infection in pediatric solid organ transplant recipients. *Pediatrics* 1994;94(2 Pt 1):225-229.
52. Seville MT, Blair JE, Vikram HR, Kusne S. 2009 H1N1 influenza in hospitalized transplant recipients. *Transplantation* 2010;90(5):571-574.
53. Aschan J, Ringden O, Ljungman P, Andersson J, Lewensohn-Fuchs I, Forsgren M. Influenza B in transplant patients. *Scandinavian journal of infectious diseases* 1989;21(3):349-350.
54. Viasus D, Pano-Pardo JR, Pachon J, Riera M, Lopez-Medrano F, Payeras A et al. Pneumonia complicating pandemic (H1N1) 2009: risk factors, clinical features, and outcomes. *Medicine* 2011;90(5):328-336.
55. Jain S, Benoit SR, Skarbinski J, Bramley AM, Finelli L. Influenza-associated pneumonia among hospitalized patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus--United States, 2009. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012;54(9):1221-1229.
56. Metersky ML, Masterton RG, Lode H, File TM, Jr., Babinchak T. Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating

- influenza. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 2012;16(5):e321-331.
57. Garcia-Vidal C, Barba P, Arnan M, Moreno A, Ruiz-Camps I, Gudiol C et al. Invasive aspergillosis complicating pandemic influenza A (H1N1) infection in severely immunocompromised patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011;53(6):e16-19.
58. Perez-Romero P, Aydillo TA, Perez-Ordóñez A, Muñoz P, Moreno A, López-Medrano F et al. Reduced incidence of pneumonia in influenza-vaccinated solid organ transplant recipients with influenza disease. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012;18(12):E533-540.
59. Helanterä I, Anttila VJ, Lappalainen M, Lempinen M, Isoniemi H. Outbreak of Influenza A(H1N1) in a Kidney Transplant Unit-Protective Effect of Vaccination. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2015;15(9):2470-2474.
60. Danzinger-Isakov L, Kumar D. Guidelines for vaccination of solid organ transplant candidates and recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2009;9 Suppl 4:S258-262.
61. Kumar D, Husain S, Chen MH, Moussa G, Himsworth D, Manuel O et al. A prospective molecular surveillance study evaluating the clinical impact of community-acquired respiratory viruses in lung transplant recipients. *Transplantation* 2010;89(8):1028-1033.
62. Gottlieb J, Schulz TF, Welte T, Fuehner T, Dierich M, Simon AR et al. Community-acquired respiratory viral infections in lung transplant recipients: a single season cohort study. *Transplantation* 2009;87(10):1530-1537.
63. Martin ST, Torabi MJ, Gabardi S. Influenza in solid organ transplant recipients. *The Annals of pharmacotherapy* 2012;46(2):255-264.
64. Milstone AP, Brumble LM, Barnes J, Estes W, Loyd JE, Pierson RN, 3rd et al. A single-season prospective study of respiratory viral infections in lung transplant recipients. *The European respiratory journal* 2006;28(1):131-137.

65. Murphy BR, Kasel JA, Chanock RM. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *The New England journal of medicine* 1972;286(25):1329-1332.
66. Kumar D, Morris MI, Kotton CN, Fischer SA, Michaels MG, Allen U et al. Guidance on novel influenza A/H1N1 in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2010;10(1):18-25.
67. Lopez-Medrano F, Cordero E, Gavalda J, Cruzado JM, Marcos MA, Perez-Romero P et al. Management of influenza infection in solid-organ transplant recipients: consensus statement of the Group for the Study of Infection in Transplant Recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 2013;31(8):526 e521-526 e520.
68. Struijk GH, Lammers AJ, Brinkman RJ, Lombarts MJ, van Vugt M, van der Pant KA et al. Immunization after renal transplantation: current clinical practice. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 2015;17(2):192-200.
69. Dong G, Peng C, Luo J, Wang C, Han L, Wu B et al. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): frequency and distribution of M2 gene mutations. *PloS one* 2015;10(3):e0119115.
70. Yen HL. Current and novel antiviral strategies for influenza infection. *Current opinion in virology* 2016;18:126-134.
71. Colman PM. Neuraminidase inhibitors as antivirals. *Vaccine* 2002;20 Suppl 2:S55-58.
72. Spagnuolo PJ, Zhang M, Xu Y, Han J, Liu S, Liu J et al. Effects of antiviral treatment on influenza-related complications over four influenza seasons: 2006-2010. *Current medical research and opinion* 2016:1-9.
73. Heneghan CJ, Onakpoya I, Jones MA, Doshi P, Del Mar CB, Hama R et al. Neuraminidase inhibitors for influenza: a systematic review and meta-analysis of regulatory and mortality data. *Health Technol Assess* 2016;20(42):1-242.
74. Moscona A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *The New England journal of medicine* 2009;360(10):953-956.

75. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *Jama* 2009;301(10):1034-1041.
76. Harper SA, Bradley JS, Englund JA, File TM, Gravenstein S, Hayden FG et al. Seasonal influenza in adults and children--diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009;48(8):1003-1032.
77. Zurcher T, Yates PJ, Daly J, Sahasrabudhe A, Walters M, Dash L et al. Mutations conferring zanamivir resistance in human influenza virus N2 neuraminidases compromise virus fitness and are not stably maintained in vitro. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2006;58(4):723-732.
78. Hayden FG, Gubareva LV, Monto AS, Klein TC, Elliot MJ, Hammond JM et al. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. *Zanamivir Family Study Group. The New England journal of medicine* 2000;343(18):1282-1289.
79. Monto AS, Webster A, Keene O. Randomized, placebo-controlled studies of inhaled zanamivir in the treatment of influenza A and B: pooled efficacy analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1999;44 Suppl B:23-29.
80. Monto AS, Pichichero ME, Blanckenberg SJ, Ruuskanen O, Cooper C, Fleming DM et al. Zanamivir prophylaxis: an effective strategy for the prevention of influenza types A and B within households. *The Journal of infectious diseases* 2002;186(11):1582-1588.
81. Baz M, Abed Y, Papenburg J, Bouhy X, Hamelin ME, Boivin G. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *The New England journal of medicine* 2009;361(23):2296-2297.
82. Monto AS, Robinson DP, Herlocher ML, Hinson JM, Jr., Elliott MJ, Crisp A. Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. *Jama* 1999;282(1):31-35.
83. LaForce C, Man CY, Henderson FW, McElhaney JE, Hampel FC, Jr., Bettis R et al. Efficacy and safety of inhaled zanamivir in the prevention of influenza in community-dwelling, high-risk adult and adolescent subjects: a 28-day, multicenter,

- randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical therapeutics* 2007;29(8):1579-1590; discussion 1577-1578.
84. Newall AT, Jit M, Beutels P. Economic evaluations of childhood influenza vaccination: a critical review. *Pharmacoeconomics* 2012;30(8):647-660.
85. Postma MJ, Baltussen RP, Palache AM, Wilschut JC. Further evidence for favorable cost-effectiveness of elderly influenza vaccination. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research* 2006;6(2):215-227.
86. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V et al. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 2008;26 Suppl 4:D31-34.
87. Cox NJ, Brammer TL, Regnery HL. Influenza: global surveillance for epidemic and pandemic variants. *European journal of epidemiology* 1994;10(4):467-470.
88. III SdVdlGeESIdSC. Informes semanales.<http://vgripe.isciii.es/gripe/inicio.do>.
89. Update: influenza activity--United States, October 1, 2006-February 3, 2007. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2007;56(6):118-121.
90. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices--United States, 2013-2014. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 2013;62(RR-07):1-43.
91. Belongia EA, Kieke BA, Donahue JG, Greenlee RT, Balish A, Foust A et al. Effectiveness of inactivated influenza vaccines varied substantially with antigenic match from the 2004-2005 season to the 2006-2007 season. *The Journal of infectious diseases* 2009;199(2):159-167.
92. Kilbourne ED, Schulman JL, Schild GC, Schloer G, Swanson J, Bucher D. Related studies of a recombinant influenza-virus vaccine. I. Derivation and characterization of virus and vaccine. *The Journal of infectious diseases* 1971;124(5):449-462.
93. Maassab HF. Biologic and immunologic characteristics of cold-adapted influenza virus. *J Immunol* 1969;102(3):728-732.
94. Tosh PK, Boyce TG, Poland GA. Flu myths: dispelling the myths associated with live attenuated influenza vaccine. *Mayo Clinic proceedings* 2008;83(1):77-84.
95. Alvarez MM, Lopez-Pacheco F, Aguilar-Yanez JM, Portillo-Lara R, Mendoza-Ochoa GI, Garcia-Echauri S et al. Specific recognition of influenza A/H1N1/2009

- antibodies in human serum: a simple virus-free ELISA method. *PloS one* 2010;5(4):e10176.
96. Allwinn R, Geiler J, Berger A, Cinatl J, Doerr HW. Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunofluorescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? *Medical microbiology and immunology* 2010;199(2):117-121.
97. Ross T, Zimmer S, Burke D, Crevar C, Carter D, Stark J et al. Seroprevalence Following the Second Wave of Pandemic 2009 H1N1 Influenza. *PLoS currents* 2010;2:RRN1148.
98. Schultsz C, Nguyen VD, Hai le T, Do QH, Peiris JS, Lim W et al. Prevalence of antibodies against avian influenza A (H5N1) virus among Cullers and poultry workers in Ho Chi Minh City, 2005. *PloS one* 2009;4(11):e7948.
99. Cordero E, Perez-Ordenez A, Aydiillo TA, Torre-Cisneros J, Gavalda J, Lara R et al. Therapy with m-TOR inhibitors decreases the response to the pandemic influenza A H1N1 vaccine in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11(10):2205-2213.
100. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) Ad Hoc Working Party on Influenza Vaccines: summary record of meeting on the choice of strains for influenza vaccine for the 1995-1996 vaccination campaign. Brussels, 27 February 1995. 1995.
101. Maruszak H, Jeganathan S, Smith DE, Robertson P, Barnes T, Furner V. Improved serological response to H1N1 monovalent vaccine associated with viral suppression among HIV-1-infected patients during the 2009 influenza (H1N1) pandemic in the Southern Hemisphere. *HIV medicine* 2012;13(6):352-357.
102. Ballet C, Roussey-Kesler G, Aubin JT, Brouard S, Giral M, Miqueu P et al. Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2006;6(11):2796-2801.
103. Birdwell KA, Ikizler MR, Sannella EC, Wang L, Byrne DW, Ikizler TA et al. Decreased antibody response to influenza vaccination in kidney transplant recipients:

- 
- a prospective cohort study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2009;54(1):112-121.
- 104.Cordero E, Aydillo TA, Perez-Ordóñez A, Torre-Cisneros J, Lara R, Segura C et al. Deficient long-term response to pandemic vaccine results in an insufficient antibody response to seasonal influenza vaccination in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2012;93(8):847-854.
- 105.Scharpe J, Evenepoel P, Maes B, Bammens B, Claes K, Osterhaus AD et al. Influenza vaccination is efficacious and safe in renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2008;8(2):332-337.
- 106.Candon S, Thervet E, Lebon P, Suberbielle C, Zuber J, Lima C et al. Humoral and cellular immune responses after influenza vaccination in kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2009;9(10):2346-2354.
- 107.Sánchez-Fructuoso AI, Prats D, Naranjo P, Fernández-Pérez C, González MJ, Mariano A et al. Influenza virus immunization effectivity in kidney transplant patients subjected to two different triple-drug therapy immunosuppression protocols: mycophenolate versus azathioprine. *Transplantation* 2000;69(3):436-439.
- 108.Blumberg EA, Albano C, Pruett T, Isaacs R, Fitzpatrick J, Bergin J et al. The immunogenicity of influenza virus vaccine in solid organ transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1996;22(2):295-302.
- 109.Soesman NM, Rimmelzwaan GF, Nieuwkoop NJ, Beyer WE, Tilanus HW, Kemmeren MH et al. Efficacy of influenza vaccination in adult liver transplant recipients. *Journal of medical virology* 2000;61(1):85-93.
- 110.Admon D, Engelhard D, Strauss N, Goldman N, Zakay-Rones Z. Antibody response to influenza immunization in patients after heart transplantation. *Vaccine* 1997;15(14):1518-1522.
- 111.Grekas D, Alivanis P, Kiriazopoulou V, Dioudis C, Sioulis A, Derveniotis V et al. Influenza vaccination on renal transplant patients is safe and serologically effective.

- International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology 1993;31(11):553-556.
112. Meyer S, Adam M, Schweiger B, Ilchmann C, Eulenburg C, Sattinger E et al. Antibody response after a single dose of an AS03-adjuvanted split-virion influenza A (H1N1) vaccine in heart transplant recipients. *Transplantation* 2011;91(9):1031-1035.
113. Kumar D, Blumberg EA, Danziger-Isakov L, Kotton CN, Halasa NB, Ison MG et al. Influenza vaccination in the organ transplant recipient: review and summary recommendations. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11(10):2020-2030.
114. Sollinger HW, Odorico JS, Knechtle SJ, D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Pirsch JD. Experience with 500 simultaneous pancreas-kidney transplants. *Annals of surgery* 1998;228(3):284-296.
115. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *Japan Marrow Donor Program. The New England journal of medicine* 1998;339(17):1177-1185.
116. Cecka JM. The role of HLA in renal transplantation. *Human immunology* 1997;56(1-2):6-16.
117. Donaldson PT, Williams R. Cross-matching in liver transplantation. *Transplantation* 1997;63(6):789-794.
118. Ontanon J, Muro M, Garcia-Alonso AM, Minguela A, Torio A, Bermejo J et al. Effect of partial HLA class I match on acute rejection in viral pre-infected human liver allograft recipients. *Transplantation* 1998;65(8):1047-1053.
119. Mehra MR, Uber PA, Uber WE, Scott RL, Park MH. Allosensitization in heart transplantation: implications and management strategies. *Current opinion in cardiology* 2003;18(2):153-158.
120. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J et al. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004;4(7):1033-1041.

- 
- 121.Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R, Ferrari-Lacraz S, Meier S, van Delden C et al. De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11(8):1727-1733.
- 122.Kumar D, Campbell P, Humar A. Donor-specific alloantibody upregulation after influenza vaccination in transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11(11):2538; author's reply 2539-2540.
- 123.Fraund S, Wagner D, Pethig K, Drescher J, Girgsdies OE, Haverich A. Influenza vaccination in heart transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 1999;18(3):220-225.
- 124.Blumberg EA, Fitzpatrick J, Stutman PC, Hayden FG, Brozena SC. Safety of influenza vaccine in heart transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 1998;17(11):1075-1080.
- 125.Hurst FP, Lee JJ, Jindal RM, Agodoa LY, Abbott KC. Outcomes associated with influenza vaccination in the first year after kidney transplantation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2011;6(5):1192-1197.
- 126.Manuel O, Humar A, Chen MH, Chernenko S, Singer LG, Cobos I et al. Immunogenicity and safety of an intradermal boosting strategy for vaccination against influenza in lung transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007;7(11):2567-2572.
- 127.Manuel O, Pascual M, Hoschler K, Giulieri S, Alves D, Ellefsen K et al. Humoral response to the influenza A H1N1/09 monovalent AS03-adjuvanted vaccine in immunocompromised patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011;52(2):248-256.
- 128.Duchini A, Hendry RM, Nyberg LM, Viernes ME, Pockros PJ. Immune response to influenza vaccine in adult liver transplant recipients. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2001;7(4):311-313.

129. Schuurmans MM, Tini GM, Dalar L, Fretz G, Benden C, Boehler A. Pandemic 2009 H1N1 influenza virus vaccination in lung transplant recipients: coverage, safety and clinical effectiveness in the Zurich cohort. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2011;30(6):685-690.
130. Keitel W, Couch R, Bond N, Adair S, Van Nest G, Dekker C. Pilot evaluation of influenza virus vaccine (IVV) combined with adjuvant. *Vaccine* 1993;11(9):909-913.
131. O'Hagan DT, Ott GS, De Gregorio E, Seubert A. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* 2012;30(29):4341-4348.
132. Wong SS, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. *Clinical microbiology reviews* 2013;26(3):476-492.
133. Clark TW, Pareek M, Hoschler K, Dillon H, Nicholson KG, Groth N et al. Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *The New England journal of medicine* 2009;361(25):2424-2435.
134. Ferguson M, Risi G, Davis M, Sheldon E, Baron M, Li P et al. Safety and long-term humoral immune response in adults after vaccination with an H1N1 2009 pandemic influenza vaccine with or without AS03 adjuvant. *The Journal of infectious diseases* 2012;205(5):733-744.
135. Lawal A, Basler C, Branch A, Gutierrez J, Schwartz M, Schiano TD. Influenza vaccination in orthotopic liver transplant recipients: absence of post administration ALT elevation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004;4(11):1805-1809.
136. Brakemeier S, Schweiger B, Lachmann N, Glander P, Schonemann C, Diekmann F et al. Immune response to an adjuvanted influenza A H1N1 vaccine (Pandemrix((R))) in renal transplant recipients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012;27(1):423-428.
137. Dengler TJ, Strnad N, Buhring I, Zimmermann R, Girgsdies O, Kubler WE et al. Differential immune response to influenza and pneumococcal vaccination in immunosuppressed patients after heart transplantation. *Transplantation* 1998;66(10):1340-1347.

- 
- 138.Falsey AR, Treanor JJ, Tornieporth N, Capellan J, Gorse GJ. Randomized, double-blind controlled phase 3 trial comparing the immunogenicity of high-dose and standard-dose influenza vaccine in adults 65 years of age and older. *The Journal of infectious diseases* 2009;200(2):172-180.
- 139.Gelinck LB, van den Bemt BJ, Marijt WA, van der Bijl AE, Visser LG, Cats HA et al. Intradermal influenza vaccination in immunocompromized patients is immunogenic and feasible. *Vaccine* 2009;27(18):2469-2474.
- 140.Morelon E, Pouteil Noble C, Daoud S, Cahen R, Goujon-Henry C, Weber F et al. Immunogenicity and safety of intradermal influenza vaccination in renal transplant patients who were non-responders to conventional influenza vaccination. *Vaccine* 2010;28(42):6885-6890.
- 141.Cohet C, Haguinet F, Dos Santos G, Webb D, Logie J, Lc Ferreira G et al. Effect of the adjuvanted (AS03) A/H1N1 2009 pandemic influenza vaccine on the risk of rejection in solid organ transplant recipients in England: a self-controlled case series. *BMJ open* 2016;6(1):e009264.
- 142.Fisman DN, Abrutyn E, Spaude KA, Kim A, Kirchner C, Daley J. Prior pneumococcal vaccination is associated with reduced death, complications, and length of stay among hospitalized adults with community-acquired pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006;42(8):1093-1101.
- 143.Danziger-Isakov L, Kumar D. Vaccination in solid organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2013;13 Suppl 4:311-317.
- 144.Duchini A, Hendry RM, Redfield DC, Pockros PJ. Influenza infection in patients before and after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2000;6(5):531-542.
- 145.Kunisaki KM, Janoff EN. Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *The Lancet Infectious diseases* 2009;9(8):493-504.

146. Dopp JM, Wiegert NA, Moran JJ, Francois ML, Radford KL, Thomas H et al. Effect of annual influenza immunization on antibody response in lung transplant patients. *Prog Transplant* 2009;19(2):153-159.
147. Gaeta GB, Pariani E, Amendola A, Brancaccio G, Cuomo G, Stornaiuolo G et al. Influenza vaccination in patients with cirrhosis and in liver transplant recipients. *Vaccine* 2009;27(25-26):3373-3375.
148. Lopez C, Simmons RL, Mauer SM, Najarian JS, Good RA, Gentry S. Association of renal allograft rejection with virus infections. *The American journal of medicine* 1974;56(3):280-289.
149. Briggs WA, Rozek RJ, Migdal SD, Shillis JL, Brackett RG, Brandon FB et al. Influenza vaccination in kidney transplant recipients: cellular and humoral immune responses. *Annals of internal medicine* 1980;92(4):471-477.
150. Danziger-Isakov L, Cherkassky L, Siegel H, McManamon M, Kramer K, Budev M et al. Effects of influenza immunization on humoral and cellular alloreactivity in humans. *Transplantation* 2010;89(7):838-844.
151. Kumar D, Campbell P, Hoschler K, Hidalgo L, Al-Dabbagh M, Wilson L et al. Randomized Controlled Trial of Adjuvanted Versus Nonadjuvanted Influenza Vaccine in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* 2016;100(3):662-669.
152. Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *The Journal of clinical investigation* 2003;111(12):1887-1895.
153. Yamamoto T, Watarai Y, Takeda A, Tsujita M, Hiramitsu T, Goto N et al. De Novo Anti-HLA DSA Characteristics and Subclinical Antibody-Mediated Kidney Allograft Injury. *Transplantation* 2015.
154. Manuel O, Lopez-Medrano F, Keiser L, Welte T, Carratala J, Cordero E et al. Influenza and other respiratory virus infections in solid organ transplant recipients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014;20 Suppl 7:102-108.
155. Schaffer SA, Husain S, Delgado DH, Kavanaugh L, Ross HJ. Impact of adjuvanted H1N1 vaccine on cell-mediated rejection in heart transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11(12):2751-2754.

- 
156. Vermeiren P, Aubert V, Sugamele R, Aubert JD, Venetz JP, Meylan P et al. Influenza vaccination and humoral alloimmunity in solid organ transplant recipients. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2014;27(9):903-908.
157. Karbasi-Afshar R, Izadi M, Fazel M, Khedmat H. Response of transplant recipients to influenza vaccination based on type of immunosuppression: A meta-analysis. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 2015;26(5):877-883.
158. Siegrist CA, Ambrosioni J, Bel M, Combescure C, Hadaya K, Martin PY et al. Responses of solid organ transplant recipients to the AS03-adjuvanted pandemic influenza vaccine. *Antiviral therapy* 2012;17(5):893-903.
159. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 2010;59(RR-8):1-62.
160. David DS, Millian SJ, Whitsell JC, Schwartz GH, Riggio RR, Stenzel KH et al. Viral syndromes and renal homograft rejection. *Annals of surgery* 1972;175(2):257-259.
161. Kimball P, Verbeke S, Flattery M, Rhodes C, Tolman D. Influenza vaccination does not promote cellular or humoral activation among heart transplant recipients. *Transplantation* 2000;69(11):2449-2451.
162. Magnani G, Falchetti E, Pollini G, Reggiani LB, Grigioni F, Coccolo F et al. Safety and efficacy of two types of influenza vaccination in heart transplant recipients: a prospective randomised controlled study. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2005;24(5):588-592.
163. Martinez-Atienza J, Rosso-Fernandez C, Roca C, Aydillo TA, Gavalda J, Moreno A et al. Efficacy and safety of a booster dose of influenza vaccination in solid organ transplant recipients, TRANSGRIPE 1-2: study protocol for a multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Trials* 2014;15:338.

