



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica, Microbiología y
Medicina Preventiva y Salud Pública, Medicina Legal y Forense

TESIS DOCTORAL

RESPUESTA HUMORAL ESPECÍFICA Y HETERÓLOGA FRENTE A VIRUS DE LA GRIPE EN VACUNADOS

Presentada por D. Iván Sanz Muñoz para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo y Silvia Rojo Rello



Universidad de Valladolid

D. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo, Profesor Titular de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, Jefe del Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y Director del Centro Nacional de Gripe de Valladolid, y

D^a. Silvia Rojo Rello, Facultativo Especialista Adjunto del Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid,

CERTIFICAN QUE:

D. Iván Sanz Muñoz ha realizado bajo su dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

**“RESPUESTA HUMORAL ESPECÍFICA Y HETERÓLOGA FRENTE A
VIRUS DE LA GRIPE EN VACUNADOS”**

Examinado dicho trabajo, damos nuestra conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral. Y para que así conste y obre a efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valladolid, en Julio del 2016.

Fdo. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo

Fdo. Silvia Rojo Rello

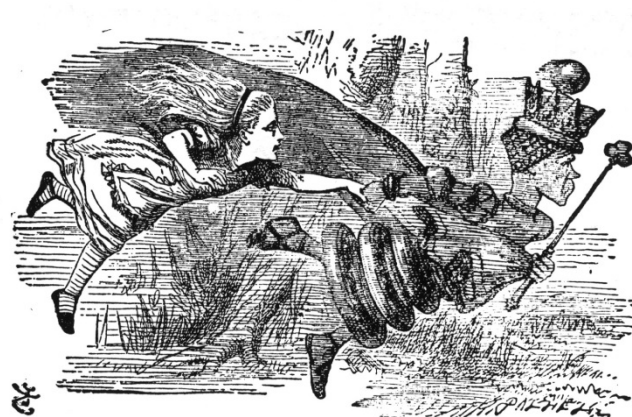
A Eva

Cuando todo aquello que es imposible ha sido eliminado, lo que quede, por muy improbable que parezca, es la verdad.

Sir Arthur Conan Doyle (Sherlock Holmes)

The Red Queen has to run faster and faster in order to keep still where she is. That is exactly what you all are doing!

Hipótesis de la Reina Roja, Leigh Van Valen



Agradecimientos

Siempre me habían dicho que los agradecimientos es la parte más difícil de escribir de una tesis. Sin embargo, al final comprendes que te falta papel, y que como en los resultados de un trabajo de este tipo es imposible contarle todo y agradecer a todo el mundo que alguna vez te ha ayudado.

Gracias Raúl por ser mi Director, Maestro, Mentor, y Amigo. Con tu confianza y fuerza has logrado completar mi mente científica sedienta de conocimiento, has logrado hacer de la perfección una bandera para mí e inculcarme que lo mejor es enemigo de lo bueno. Gracias a ti he aprendido que la ciencia es rigor y capacidad de síntesis, es transmisión y pasión. Y una de las cosas más importantes, el sentimiento de honor por un trabajo bien hecho. Gracias eternamente por abrirme la puerta de este apasionante mundo.

Gracias Silvia por ser mi Directora, ha sido todo un honor recibir toda la sabiduría y la ayuda que me has dado durante estos años. Gracias por toda la paciencia y las ganas de trabajo que has destilado siempre, eres incombustible. Gracias también por ser tan gran amiga, me has formado como científico pero también como persona en todo este tiempo. Ante todo recuerda una cosa.... "si no fuera por estos ratos"....

Gracias Eva, mi eterna compañera de viaje, por todo tu apoyo, cariño y espíritu. Cada línea escrita en esta tesis es por y para ti, y jamás podría haber sido escrita sin tu ayuda. Gracias por creer en mí y dar todo lo que está en tu mano y un poco más para cumplir un solo sueño, volar. Te prometo y firmo aquí que viviré por siempre.

Gracias Sonia por tu gran apoyo en que esto siga adelante. Me has dado ideas geniales y has apoyado otras muchas más que aunque sonaran inverosímiles hemos logrado sacar adelante. Gracias por formar parte de nuestro día a día.

Gracias también a Alberto Caballero y a Lola Marina del Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL) por su inestimable ayuda con esta tesis y toda la labor que hacemos, sin ellos tampoco sería posible la realización de nuestro trabajo.

Gracias Rosa, ¡actúas como madre cohesora del grupo y habría que ponerte un monumento! ¡Tú decides la época y el tipo de escultura, pero no elijas canecillos! Gracias también Lola por compartir un rato de café cada mañana entre parrafadas que nos libran de la agitación mental.

Gracias a ti también Maisa por tu cariño y la gran labor logística que haces, esta tesis no hubiera sido posible sin tu organización ¡lo que me tienes que aguantar! Gracias también a las *pitus* por su gran labor en el Centro de Gripe.

Gracias al personal del Centro Colaborador de la OMS del *Francis Crick Institute* de *Mill Hill* de Londres, y en especial a los doctores John McCauley y Rod Daniels, por la formación tan importante que recibí allí y por suministrarnos los virus A/H1N1 antiguos utilizados en esta tesis.

Gracias a los médicos, enfermeras y coordinadores de la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León por su diligencia y buen trabajo que año tras año realizan para que podamos seguir comprendiendo cómo funciona la inmunidad y cómo evolucionan los virus de la gripe. Gracias también a Marta Rodríguez y a todo el personal del Servicio de enfermedades autoinmunes del Hospital Universitari Mútua Terrasa, sin los cuales hubiera sido imposible realizar una parte muy importante de este trabajo.

Gracias a Ángel Barcia, *mozu* y apasionado veterinario de la Facultad de Medicina, por tu gran ayuda para sangrar a las gallinas y por haber removido cielo y tierra para conseguir sangre de caballo para las probatinas, lástima que al final no funcionara. Con los animales sé que logré sacar una tesis, contigo sé que logré obtener un amigo. Gracias también a las gallinas que se prestaron sin rechistar a las extracciones de sangre.

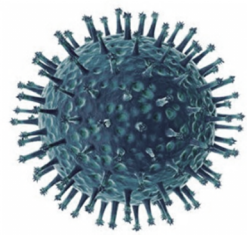
Gracias a mis compañeros de laboratorio, que en mayor o menor medida han puesto un granito de arena en el día a día. Gracias Pepe, Julia, Paz, Carmen, Ana, Pilar, Concha,... Imposible nombrarlos a todos. Muchas gracias en especial a la Dra. Mercedes Nocito por todo su apoyo en la serología, he ganado mucho amor hacia las placas multipocillo gracias a tus enseñanzas. Mil gracias también a Ana Montoya, que logra que compaginemos algo extremadamente importante, la asistencia clínica diaria con la investigación biomédica. Gracias Anita a ti también por darme ánimos en las últimas etapas y por aplanar sin querer el camino burocrático, ¡no sabes cómo te lo agradezco!

Gracias a mis amigos por su gran apoyo y confianza, Héctor, María, Sara, Ángel, Miguel, Vicky, Ildy. Gracias Mary por ayudarnos en todo y comprendernos tanto como haces hermanita, espero verte algún día en la misma TESItura que yo. Gracias también a Alberto, por los "*brain storming*" con cada cerveza y por apoyarme cuando alguna piedra se trababa en el camino.

Gracias a toda mi familia por su cariño y apoyo. Espero podáis sentir os tan orgullosos de este trabajo cuando lo leáis como yo me he sentido cuando lo he escrito. Gracias también a mi abuelo, aunque no puedas verlo sé que estarías también orgulloso de leer estas páginas.

Gracias a todos

ÍNDICE

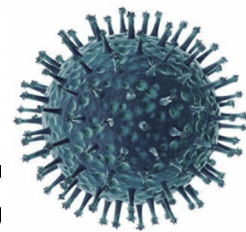


| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | 9 |
| ÍNDICE | 11 |
| ABREVIATURAS | 17 |
| INTRODUCCIÓN | 21 |
| Características de los virus de la gripe | 23 |
| Historia y clasificación | 23 |
| Estructura y composición genética | 24 |
| Sistemas de variación antigénica | 28 |
| Ciclo infeccioso de los virus de la gripe | 31 |
| Historia epidemiológica de los virus de la gripe durante los siglos XX y XXI | 33 |
| Epidemiología de las infecciones por virus de la gripe..... | 44 |
| Respuesta inmune humoral ante la infección por virus de la gripe..... | 47 |
| Vacunación frente a los virus de la gripe..... | 50 |
| Las vacunas, el mayor avance médico de los siglos XX y XXI | 50 |
| Mecanismos de desarrollo de las vacunas antigripales | 51 |
| Medios de fabricación de las vacunas antigripales | 52 |
| Tipos de vacunas antigripales | 53 |
| Grupos de administración preferente y campañas de vacunación..... | 56 |
| Evaluación de la eficacia y efectividad de la vacuna antigripal | 59 |
| Nuevas perspectivas en la vacunación antigripal | 60 |
| Sistema de redes centinela de vigilancia epidemiológica de la gripe | 63 |
| The WHO Global Influenza Surveillance Network..... | 67 |
| Flujos de trabajo de los Centros Nacionales de Gripe..... | 68 |
| Monitorización de la eficacia vacunal | 71 |

| | |
|--|------------|
| OBJETIVOS | 73 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 77 |
| Diseño del estudio | 79 |
| Material..... | 80 |
| Grupo de individuos mayores de 65 años | 80 |
| Grupo de individuos con enfermedades autoinmunes | 83 |
| Comité de Ética – Consentimiento informado..... | 85 |
| Métodos..... | 86 |
| Análisis serológicos..... | 86 |
| Análisis de las secuencias genéticas de virus de la gripe A..... | 96 |
| Análisis estadístico | 98 |
| RESULTADOS | 101 |
| Análisis de Acs previos a la vacunación y de la respuesta inmune humoral tras la vacunación en población mayor de 65 años frente a distintos virus de la gripe | 103 |
| Características demográficas y clínicas de los individuos mayores de 65 años..... | 103 |
| Estudio de los Acs HAs pre-vacunales y la respuesta inmune humoral tras la vacunación con vacuna trivalente anual frente a virus de gripe A y B estacionales..... | 107 |
| Estudio de los Acs HAs pre-vacunales y la respuesta inmune humoral heterotípica frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas tras la vacunación con vacuna trivalente anual | 127 |
| Estudio de los Acs HAs pre-vacunales y la respuesta inmune humoral heterotípica frente a virus de gripe aviar tras la vacunación con vacuna trivalente anual | 140 |
| Análisis filogenético de las cepas de gripe A incluidas en el estudio | 150 |

| | |
|--|------------|
| Análisis de Acs HAs previos a la vacunación y de la respuesta inmune humoral frente a virus de la gripe A y B tras la vacunación monovalente pandémica frente al subtipo A/H1N1pdm09 en enfermos autoinmunes | 153 |
| Características demográficas y clínicas de los individuos con enfermedades autoinmunes y controles sanos | 153 |
| Estudio de los Acs HAs pre-vacunales y de la eficacia de la vacuna monovalente frente a cepas de gripe A y B estacionales en individuos con enfermedades autoinmunes..... | 156 |
| Análisis comparativo de los Acs HAs previos a la vacunación frente a virus de la gripe A y B entre los diferentes grupos de individuos incluidos en el estudio | 167 |
| DISCUSIÓN | 171 |
| Estudio de los Acs previos a la vacunación y de la respuesta a la vacuna trivalente estacional en la cohorte de individuos ≥ 65 años | 174 |
| Ámbito poblacional de estudio..... | 174 |
| Análisis frente a subtipos y linajes de gripe A y B estacionales en población mayor de 65 años..... | 176 |
| Análisis frente a subtipos de virus de la gripe A/H1N1 antiguos en población mayor de 65 años | 194 |
| Análisis frente a subtipos de virus de la gripe aviar en población mayor de 65 años..... | 208 |
| Estudio de los Acs previos a la vacunación y de la respuesta a la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 en el grupo de enfermos autoinmunes..... | 217 |
| Ámbito poblacional de estudio..... | 217 |
| Análisis frente a subtipos y linajes de gripe A y B estacionales en individuos con enfermedades autoinmunes | 218 |
| CONCLUSIONES | 229 |
| RENDIMIENTO CIENTÍFICO | 235 |
| ANEXOS | 239 |
| BIBLIOGRAFÍA | 243 |

ABREVIATURAS

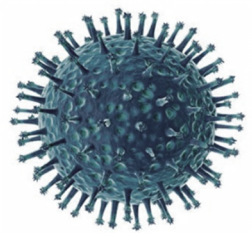


Abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| Acs | Anticuerpos |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| BPL | Beta-propiolactona |
| B(Vict) | Linaje Victoria de la Gripe B |
| B(Yam) | Linaje Yamagata de la Gripe B |
| CDC | <i>Center for Disease Control and Prevention</i> |
| CLH | Concentrado lavado de hematíes |
| CPMP | <i>European Committee for Proprietary Medicinal Products</i> |
| CS | Controles sanos |
| DE | Desviación estándar |
| EA | Enfermos autoinmunes |
| EMA | <i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i> |
| FDA | <i>American Food and Drug Agency</i> |
| GISRS | <i>Global Influenza Surveillance and Response System</i> |
| HA | Proteína Hemaglutinina |
| HAs | Anticuerpos Hemaglutinantes |
| HCUV | Hospital Clínico Universitario de Valladolid |
| HPAI | <i>High Pathogenic Avian Influenza</i> (Gripe aviar de alta patogenicidad) |
| IC | Intervalo de confianza |
| LAL | Líquido alantoideo |
| LAM | Líquido amniótico |
| LPAI | <i>Low Pathogenic Avian Influenza</i> (Gripe aviar de baja patogenicidad) |
| MGT | Media geométrica de los títulos de anticuerpos |
| NA | Proteína Neuraminidasa |

| | |
|---------------|--|
| NDEV | Número de días entre la administración de la vacuna y la extracción del suero post-vacunal |
| NIC | <i>National Influenza Centre</i> (Centro Nacional de Gripe) |
| OIE | Organización Mundial de Sanidad Animal |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PBS | Buffer salino fosfato |
| PVIG | Programa de Vigilancia de la Gripe |
| RCSCyL | Red Centinela Sanitaria de Castilla y León |
| RIC | Razón de incremento de la media geométrica de los títulos de anticuerpos |
| RIH | Reacción de inhibición de hemaglutinación |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| TPP | Tasa de protección previa |
| TPV | Tasa de protección vacunal |
| TS | Tasa de seroprotección |
| TSC | Tasa de seroconversión |
| VAD | Vacunas de tipo Adyuvado |
| VFR | Vacunas de tipo Fraccionado |

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Características de los virus de la gripe

Historia y clasificación

Los virus de la gripe A fueron descubiertos y aislados por primera vez en el año 1930 en el cerdo (1) y posteriormente en el año 1933 en el ser humano y en hurones (2,3), mientras que los virus de la gripe B no fueron descubiertos hasta el año 1939 (4). No fue hasta el año 1951 en el que se aisló por primera vez un virus de la gripe del grupo C (5), de menor importancia clínica y solo presente en la población humana, cerdos y perros (6), aunque también ampliamente distribuido por todo el mundo (7). La investigación de estos virus desde su descubrimiento pasó desde los primeros métodos rudimentarios de cultivo, como por ejemplo el cultivo en huevos embrionados o la inoculación en ratones (técnicas que se siguen realizando en la actualidad) (8), hasta los modernos métodos de detección de ácidos nucleicos y de secuenciación masiva que se utilizan en los laboratorios a día de hoy. La capacidad de los eritrocitos por la aglutinación de virus de la gripe no fue descubierta hasta el año 1941 gracias a Hirst (9), lo que permitió realizar los primeros análisis antigénicos de los aislamientos virales que aún son de mucha utilidad en la actualidad. Por otra parte, la mejora y puesta a punto de los procesos de aislamiento y cultivo de los virus de la gripe permitió en la década de 1940 sentar las bases para la producción de vacunas inactivadas con alta eficacia, siendo desde ese momento usadas de manera común hasta nuestros días. (8)

Los virus de la gripe A, B y C pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, cuyo nombre deriva de la alta afinidad que presentan estos virus por la mucina, proteína que está presente en el moco producido por algunas mucosas y en algunos receptores epiteliales, membranas de los hematíes y en el suero (lo que les otorga la capacidad hemaglutinante) (9,10). En esta familia están incluidos además de los tres géneros de virus de la gripe, otros géneros virales que infectan a humanos entre otros animales, como los virus *Thogoto*, *Dhori* y *Batken*, y otros eminentemente zoonóticos, como los *Isavirus* (Tabla 1).



| Género | Tipo |
|------------------|-------------------------------|
| Influenzavirus A | Virus de la gripe A |
| Influenzavirus B | Virus de la gripe B |
| Influenzavirus C | Virus de la gripe C |
| Thogotovirus | Thogotovirus |
| | Dhori virus |
| | Batken virus |
| Isavirus | Virus de la anemia del Salmón |

Tabla 1. Clasificación de los virus de la familia *Orthomyxoviridae*.

En la actualidad se está considerando la creación de un nuevo género dentro de la familia *Orthomyxoviridae*, que correspondería con el género *Influenzavirus D*, actualmente incluido en el género *Influenzavirus C* pero con una homología muy baja entre sus genes como para ser considerados dentro del mismo género (11). Los virus de la gripe B y C son virus que afectan sobre todo al ser humano, y en mucha menor medida a otros mamíferos como las focas, perros y cerdos (12–14). Sin embargo, los virus de la gripe A circulan entre un amplio rango de hospedadores, la mayoría de ellos aves y mamíferos, entre los que se encuentra el hombre (15).

La nomenclatura estándar internacional de los virus de la gripe se determina en primera instancia por el tipo de virus de la gripe frente al que nos encontramos, A, B o C (16,17). Posteriormente se incluye el nombre del lugar del aislamiento, número de aislamiento de la cepa dentro del laboratorio que lo identifica, y por último el año en el que ha sido aislada dicha cepa. Junto a esta nomenclatura y únicamente en los virus de gripe A, se suele incluir entre paréntesis el subtipo frente a la que nos encontramos en función del tipo de hemaglutinina y neuraminidasa presentes en el virión, como por ejemplo “(H1N1)”. En el caso de los virus de gripe B, al no existir subtipos antigénicamente determinables mediante este tipo de nomenclatura, únicamente se indica la descripción antes mencionadas. Algunos ejemplos de este sistema son los siguientes: A/Brisbane/59/2007 (H1N1); A/Wisconsin/67/2005; B/Malaysia/2506/2004.

Estructura y composición genética

Los virus de la gripe forman viriones de tipo envuelto de un tamaño entre 100 y 200 nm de diámetro, y aunque su forma es frecuentemente esférica, se han descrito otros viriones con formas filiformes que pueden llegar a exceder los 1.000 nm (18,19). El genoma de los virus de la gripe está formado por ARN de cadena sencilla y polaridad negativa, formados por unos

13.500 nucleótidos dispuesto en 8 genes o segmentos que codifican 10 proteínas distintas (20) (Figura 1).

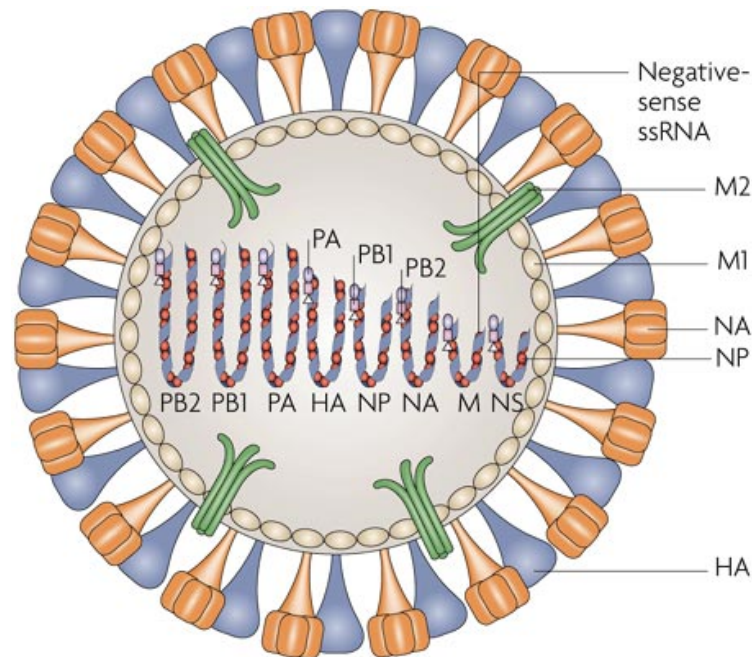


Figura 1. Estructura, disposición de las proteínas y de los genes constituyentes de un virión modelo de virus de la gripe. Fuente: *Nat Rev Genet.* 2007;8(3):196-205 (21).

El exterior de estas partículas virales está formado por una bicapa lipídica que es originaria de las células que infecta, por lo que este virus es relativamente inestable en el ambiente y es fácilmente inactivable mediante calor, desecación o el uso de detergentes (22). Esta bicapa lipídica se comporta según el modelo del mosaico fluido y contiene compuestos como el colesterol y lípidos presentes en la membrana celular del hospedador (23). En esta bicapa se encuentran alojadas las dos glucoproteínas más relevantes de los virus de la gripe, la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA), que forman alrededor de 1 millar de proyecciones hacia el exterior de la membrana (1). De estas dos glucoproteínas, la más representada es la HA, que supone el 25% de todas las proteínas del virión (1) y el 80% de las proyecciones de la bicapa lipídica (18). La HA es una proteína homotrimérica transmembrana (24) con una cabeza globular en el exterior de la bicapa (Figura 2). La función principal de esta proteína es la fijación del virión a los receptores mucoproteicos de ácido siálico de la célula hospedadora del epitelio respiratorio, así como de los eritrocitos (25). Además, la HA promueve la fusión de la envuelta del virión con el endosoma de la célula para permitir el internamiento de los componentes víricos en el citoplasma. Por otra parte, la HA es el principal

antígeno de los virus de la gripe, por lo que este componente es el mayor responsable de la respuesta del sistema inmune ante la generación de Acs (26).

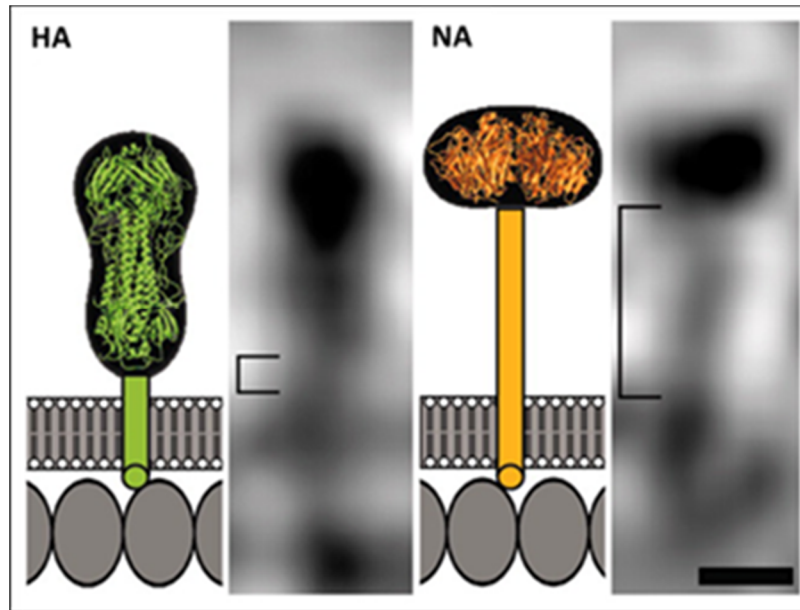


Figura 2. Esquema de la estructura tridimensional de los dominios membrana y transmembrana de las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Fuente: *Harris A. et al. PNAS 2006, 13:19123-7 (27)*.

La NA es una proteína homotetramérica transmembrana que representa el 5% de todas las proteínas del virus, y cuya forma tridimensional está caracterizada por un largo tallo culminado en una subestructura plana (28,29). La función de la NA consiste en la liberación del virión de la superficie celular una vez que ha finalizado el ciclo de infección, de forma que el virus pueda continuar su actividad infecciosa. Esta acción sucede como consecuencia de la capacidad enzimática de esta proteína por la escisión de las glicoproteínas de los receptores ácido siálico de las células infectadas (30). La acción conjunta de la HA y la NA permite el internamiento y salida de los virus de la gripe en las células susceptibles de ser infectadas.

El gen M (Matriz) codifica la creación de dos proteínas con estructura y funciones diferentes (M1 y M2). La proteína M1 es la partícula más abundante en los virus de la gripe, y se encuentra formando un armazón interno debajo de la bicapa lipídica (18). Directamente asociada a esta se encuentra la proteína NEP (*Nuclear Export Protein*) o proteína NS2, que se encarga de la exportación de ribonucleoproteínas (RNPS) al citoplasma de la célula infectada (31,32). Por su parte, la proteína M2 solo está presente en un número muy reducido en la partícula vírica, y forma canales iónicos trans-membrana que comunican el exterior del virión con el interior del mismo para permitir el correcto desarrollo de la infección (18,33).

Más internamente en el virión se localizan los ocho segmentos de ARN monocatenario que codifican cada proteína viral. Estos genes se encuentran envueltos y protegidos por la proteína NP o Nucleoproteína (RNPv) (34). El resto de los componentes proteicos (proteínas PB1, PB2 y PA) forman un núcleo enzimático con actividad autocatalítica de ARN, cuyo fin es la duplicación del material genético del virus y su empaquetamiento posterior dentro de cada virión (34,35).

Existen otras dos proteínas de las que en la actualidad no se conoce bien su función (NS1 y PB1-F2). Estas dos proteínas se encuentran en las células infectadas pero no se encuentran presentes en las partículas víricas libres. La proteína NS1 ejerce acciones sobre todo en la evasión del sistema inmune por parte del virión, así como la regulación de los procesos de expresión génica del ARN (36). Esta proteína se ha localizado en las mitocondrias de las células infectadas y se ha relacionado con procesos de apoptosis celular (37,38).

Las 11 proteínas descritas anteriormente se generan a través de los 8 genes mediante mecanismos de *splicing* o de procesamiento alternativo y de la utilización de una fase de lectura abierta (ORF) (39). La función de cada proteína se encuentra descrita en la Tabla 2.

| Nº Segmento | Proteína | Peso Molecular (kD) | Función |
|-------------|----------------|---------------------|---|
| 1 | PB1 | 96 | Transcripción y replicación del material genético |
| 2 | PB2 | 87 | |
| 3 | PA | 85 | |
| 4 | HA0 (HA1, HA2) | 80 | Glucoproteína de adhesión y fusión a la célula hospedadora |
| 5 | NP | 60 | Componente mayor de la nucleocápside. Síntesis de RNA. Ordenación helicoidal. |
| 6 | NA | 60 | Hidrólisis del ácido siálico para salida del virión |
| 7 | M1 | 17 | Maduración y liberación del virus |
| | M2 | 12 | Canal iónico de membrana |
| 8 | NS1 | 25 | Función desconocida |
| | NS2 | 12 | Función desconocida |

Tabla 2. Funciones y pesos moleculares de los productos codificados por los ocho segmentos ribonucleoproteicos presentes en la partícula vírica. Modificado de R. Ortiz de Lejarazu y R. Almansa.

Sistemas de variación antigénica

Una de las principales propiedades de los virus ARN, y más concretamente de los virus de la gripe, es la gran capacidad evolutiva que poseen en comparación con otros microorganismos cuya base genética es el ADN. Esta capacidad viene otorgada por un complejo enzimático polimerasa muy poco fiable en la inclusión de los nucleótidos durante la duplicación del material genético (40–42), lo que conlleva la aparición frecuente de mutaciones en el ARN. Lejos de que estas mutaciones sean no deseables para el virus, como suele ocurrir muchas veces en la especie humana y en la mayoría de los metazoos, estos cambios genéticos muchas veces le otorgan ventajas adaptativas que les permiten un mejor escape al sistema inmune del hospedador o una mayor capacidad replicativa, afectando directamente en el *fitness* viral (43).

La tasa de mutación de los virus de la gripe A es mayor que los virus B, y se estima en torno a $2,0 \times 10^{-6}$ mutaciones/sitio/ciclo infeccioso (44,45). Además, el complejo polimerasa no posee acción exonucleasa, por lo que no puede corregir los errores introducidos en la secuencia (22). La tasa de mutación no es igual en todos los genes que componen al virión, sino que es más elevada en aquellos que expresan proteínas que se encuentran en la superficie, las cuales son las que están más en contacto con las células y factores del sistema inmune del individuo. La presión selectiva que el sistema inmune genera sobre el virus provoca una continua selección de las mutaciones más ventajosas con el consecuente escape inmunológico del patógeno, pudiendo existir en un momento dado varias *quasiespecies* de la misma cepa infectando simultáneamente a un individuo (45,46) (Figura 3).

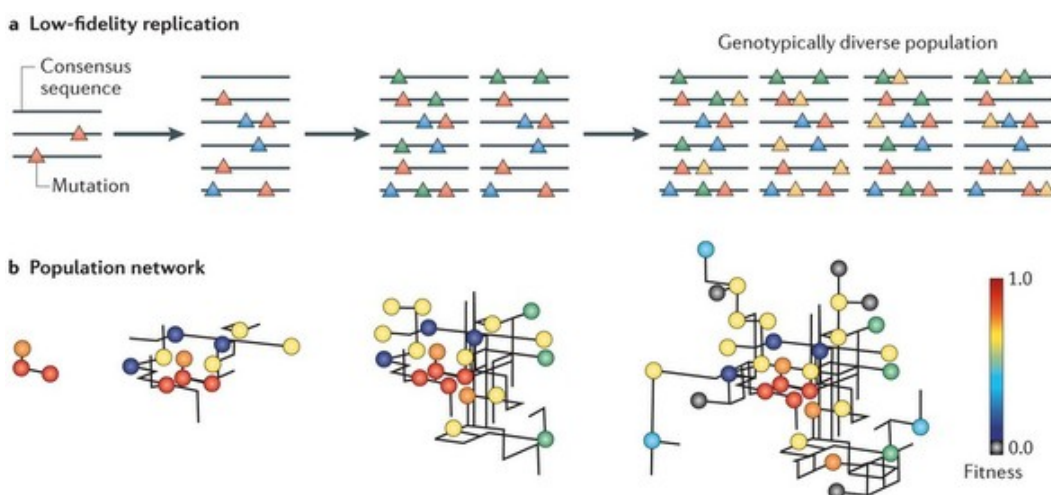


Figura 3. Mecanismo de aparición de *quasiespecies* a partir de un individuo fundador gracias a un bajo nivel de fidelidad en el mecanismo replicativo del material genético. Fuente: *Lauring Adam S. et al. Nat Rev Microbiol 2013;11(5):327-336 (45).*

Las dos proteínas con mayor poder antigénico en los virus de la gripe son la HA y la NA, y la denominación tradicional de estos virus deriva de la conjunción de estos dos tipos diferentes de proteínas. En la actualidad se han descrito 16 tipos diferentes de HA y 9 de NA estando ampliamente distribuidas dentro de la fauna aviar. Sin embargo, existen algunas de ellas capaces de infectar al hombre y otras especies como el cerdo u otros mamíferos, aunque en algunos casos no se ha demostrado transmisión inter-humana sostenida como en los casos de las variantes H5 y H7 (Figura 4) (47).

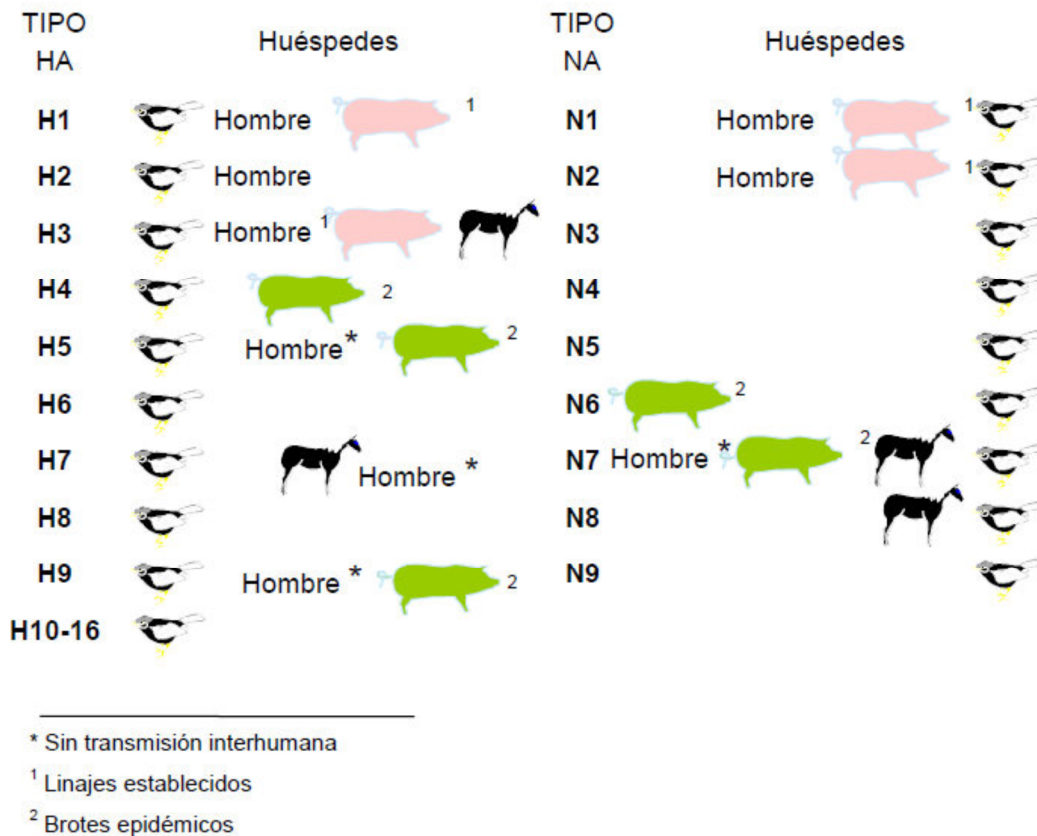


Figura 4. Distribución de los diferentes tipos de HA y NA según las especies susceptibles.

Debido a la alta tasa de mutaciones antes descrita, en los virus de la gripe se dan dos tipos diferentes de cambios genéticos:

- **Variaciones menores o deriva antigénica (Drift antigénico):**

La deriva antigénica sucede sobre todo en las glicoproteínas de superficie HA y NA que están expuestas al sistema inmune del individuo (48,49). Este tipo de variación produce un cambio continuo en estas proteínas que conlleva la aparición de una nueva cepa muy similar a la anterior, pero con características diferenciales para las cuales la población susceptible no posee anticuerpos (Acs) específicos. Ante estas situaciones, los mutantes de escape son

seleccionados y la relativa ausencia de Acs permite a esta nueva cepa dispersarse de forma eficaz entre la población. Las epidemias anuales de gripe se producen a causa de este proceso (50).

- **Variaciones mayores o reemplazo antigénico (Shift antigénico):**

El reemplazo antigénico sucede cuando existe un cambio radical en la composición genética de un virus de la gripe, con la consiguiente aparición de una nueva variante (49,51). Si este reemplazo genético ocurre en los genes HA y NA, es posible que la nueva cepa tenga la capacidad de propagarse de forma eficiente o incluso de provocar mayor morbi-mortalidad entre la población. Este reemplazo genético es el acontecimiento desencadenante de las grandes pandemias de gripe conocidas hasta la fecha (52,53). Este proceso de reemplazo genético puede darse por la co-infección de varias cepas de gripe de diferente tipo en un mismo individuo reservorio, lo que puede producir una recombinación genética entre los 8 segmentos que aporta cada variante. Como consecuencia, se puede obtener un nuevo virus quimérico que contenga características de unos y otros virus implicados en este proceso (Figura 5).

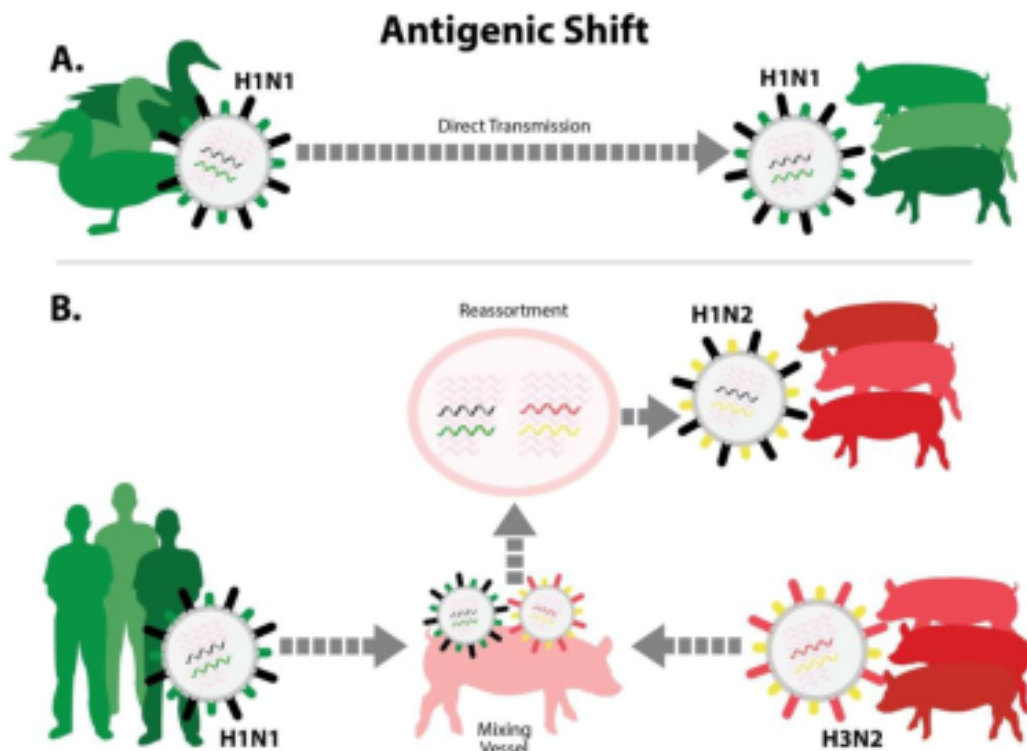


Figura 5. Mecanismos de reemplazo antigénico de los virus de la gripe. Fuente: *Sandbulte MR et al. Vaccines 2015;3:22-73* (54).

Por otra parte, la transmisión inter-específica a través del salto de barrera de especie puede introducir de forma directa variantes de gripe que no circulen en una determinada especie, como por ejemplo de las aves al ser humano. Debido a que la proteína HA de los virus de gripe aviáres poseen afinidad por los receptores ácido siálico unidos por enlaces α -2-3, estos virus sufren una imposibilidad física por unirse a los receptores α -2-6 típicos de humanos y otros mamíferos, imposibilitando este tipo de transmisión (24). Sin embargo, con cierta frecuencia se han descrito brotes de este tipo de virus en el ser humano (55), de carácter autolimitado y sin transmisión inter-humana sostenida, hecho que es vigilado constantemente por la OMS debido a la posibilidad de desarrollo de una nueva pandemia por este tipo de mecanismo.

En el año 2009 se produjo el último caso de reemplazo genético que provocó la aparición del nuevo subtipo A/H1N1pdm09, fruto del cuádruple reordenamiento genético de virus de la gripe procedentes de aves, cerdos y humanos en un hospedador porcino (56).

Ciclo infeccioso de los virus de la gripe

Los virus de la gripe que infectan a humanos se transmiten fundamentalmente por vía aérea y su vía de entrada en el individuo es a través de las vías respiratorias. Las células *target* de este tipo de virus serán en primer lugar las del epitelio respiratorio superior e inferior, en cuya superficie expresan los anteriormente mencionados receptores de ácido siálico de tipo α -2-6 (57). La unión del virus a través de las proteínas HA a estos receptores promueve la creación de vesículas de internamiento celular que transportarán al virión al citosol de la célula huésped a través de endosomas, y el bajo pH de estos permite la unión del virión a su propia membrana lipídica (57) (Figura 6). En ese momento la bomba de protones del virión, conformada por la proteína M2, acidifica el interior del mismo con la consiguiente liberación de las RNPv de la proteína M1, lo que permite que el material genético del virus se interne en el citoplasma de la célula infectada (33,58). Posteriormente las RNPv son llevadas al núcleo celular donde comenzará la replicación del material genético a través de un sistema de secuestro de la maquinaria celular (59), generando una ARN polimerasa a partir de los componentes PB1, PB2 y PA del virus (RdRp) (22).

Para realizar la transcripción del ARN del virión, el sistema de secuestro se basa en la utilización de los ARNm (ARN mensajero) de la célula hospedadora en los moldes o primers de los ARNm del virus, utilizando posteriormente una ARN polimerasa tipo II de la propia célula para la elongación de estos oligonucleótidos (59). Por su parte, la ARN polimerasa RdRp

escinde pequeñas regiones de la caperuza de los ARNm celulares antes descritos, en un proceso que se denomina “cap-snatching” o “robo de cabeza” (60).

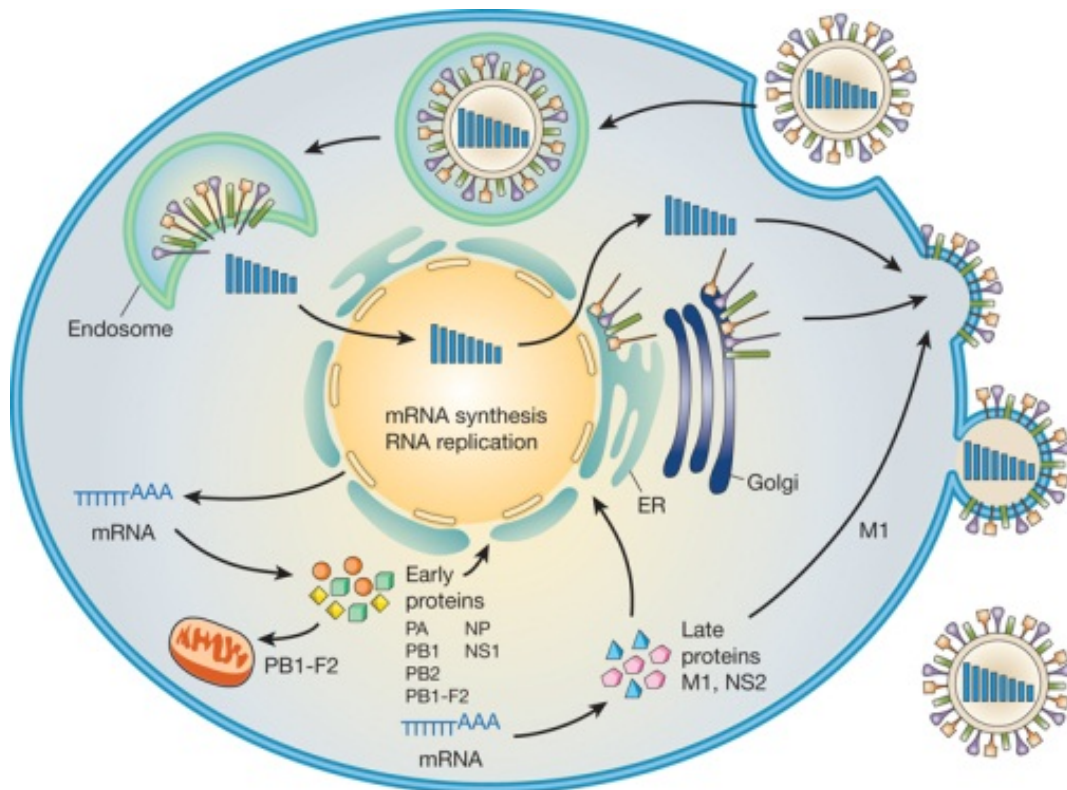


Figura 6. Ciclo infeccioso de los virus de la gripe. Fuente: *Neumann G et al. Nature. 2009;459(7249):931-939 (61).*

Posteriormente, el ARNm viral será llevado al citoplasma donde se realizará la traducción de las proteínas, en el aparato de Golgi en el caso de la HA y NA, y con mecanismos más complejos en el caso del resto de proteínas. En el caso de las proteínas que forman el complejo RdRp, se unirán con la NP y el ARN viral para interactuar con la proteína M1 que las recubre (36), migrando hasta la membrana plasmática de la célula en zonas ricas en colesterol donde se encuentra ancladas las proteínas HA y NA maduras (62). La salida de los viriones se da por un mecanismo llamado gemación o *budding* (59), asociándose al trozo de bicapa lipídica celular al que estaban ancladas las proteínas maduras. La escisión del virus de la célula hospedadora se da gracias a la acción de la NA, que hidroliza los receptores de la membrana celular, evitando agregación de los viriones y liberación al espacio del aparato respiratorio (63).

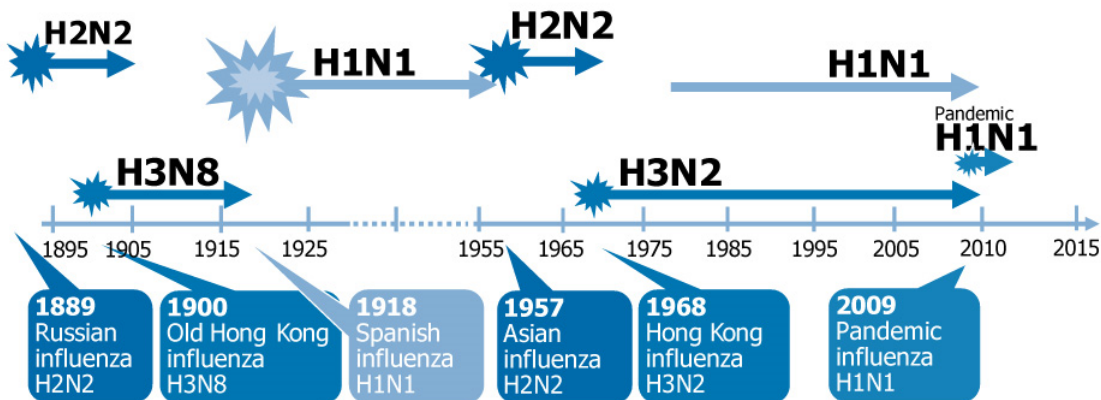
Historia epidemiológica de los virus de la gripe durante los siglos XX y XXI

Durante el siglo XX y XXI, la población humana ha sufrido varias veces la aparición súbita de un nuevo tipo de virus de la gripe que se ha distribuido de forma global en un corto periodo de tiempo, generando un número muy elevado de casos, y según el subtipo emergente, un número más elevado de muertes que en las situaciones epidémicas estacionales. Estos eventos de elevada dispersión de una nueva cepa se denominan pandemias, y en la actualidad, una de las definiciones más aceptada sobre este evento lo define como “una epidemia que ocurre a nivel global, o sobre una zona muy extensa, que cruza las fronteras internacionales y normalmente causa un gran número de afectados” (64). Sin embargo, con la aparición del subtipo de gripe A/H1N1pdm09 durante el año 2009, la OMS ha realizado una aportación más técnica que define una pandemia como “la emergencia de un nuevo patógeno significativamente diferente a sus predecesores, con las siguientes tres características: capaz de infectar humanos; capaz de causar enfermedad en los humanos; capaz de transmitirse eficientemente entre humanos” (65). A pesar de esto, una definición epidemiológica también realizada por la OMS mucho más clara de un evento de este tipo define una serie de fases por las que un patógeno pasa antes de generar una pandemia (Figura 7)(66).

| WHO Pandemic Influenza Phases | |
|-------------------------------|--|
| Phase | Description |
| Phase 1 | No animal influenza virus circulating among animals have been reported to cause infection in humans. |
| Phase 2 | An animal influenza virus circulating in domesticated or wild animals is known to have caused infection in humans and is therefore considered a specific potential pandemic threat. |
| Phase 3 | An animal or human-animal influenza reassortant virus has caused sporadic cases or small clusters of disease in people, but has not resulted in human-to-human transmission sufficient to sustain community-level outbreaks. |
| Phase 4 | Human to human transmission of an animal or human-animal influenza reassortant virus able to sustain community-level outbreaks has been verified. |
| Phase 5 | Human-to-human spread of the virus in two or more countries in one WHO region. |
| Phase 6 | In addition to the criteria defined in Phase 5, the same virus spreads from human-to-human in at least one other country in another WHO region. |
| Post peak period | Levels of pandemic influenza in most countries with adequate surveillance have dropped below peak levels. |
| Post pandemic period | Levels of influenza activity have returned to the levels seen for seasonal influenza in most countries with adequate surveillance |

Figura 7. Fases de transición de un patógeno desde su aparición hasta la generación de una pandemia. Fuente: OMS 2009.

Siguiendo esta descripción de fases, una pandemia estaría restringida a la fase 6, en la que el patógeno emergente se encontraría difundiendo activamente entre la población humana en al menos dos países de la misma región OMS, además de haberse demostrado transmisión interhumana efectiva en al menos otro país de otra región OMS diferente (16). Siguiendo estas premisas, durante el pasado y el presente siglo han ocurrido un total de cuatro pandemias, las cuales se describen a continuación (Figura 8):



Source: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2009
 Reproduced and adapted (2009) with permission of Dr Masato Tashiro, Director, Center for Influenza Virus Research, National Institute of Infectious Diseases (NIID), Japan.

Figura 8. Orden cronológico de aparición de los eventos pandémicos de gripe pertenecientes a los siglos XIX, XX y XXI con los respectivos subtipos gripales emergentes en cada una. Fuente: ECDC 2009.

- **Gripe Española de 1918:**

La pandemia de gripe de 1918 fue uno de los eventos con mayor mortalidad de la historia reciente, al que se le asoció un número de muertes cercano a los 50 millones de personas con un ratio de mortalidad cercano al 2,5% (67), y en la que se vio afectada un tercio de la población mundial, lo que supuso alrededor de 500 millones de personas (68). Este virus, denominada como “Gripe Española” por las tropas aliadas y alemanas durante la Primera Guerra Mundial debido a la censura de la época y a la labor de las autoridades por evitar el conocimiento de la incapacidad de las mismas (69), es un virus del subtipo A/H1N1 del que se ha sugerido que su origen se debe a un fenómeno de reemplazo antigénico debido a la triple recombinación de genes de virus de la gripe originarios de humanos, cerdos y aves durante un periodo de varios años (70).

La pandemia de Gripe Española sucedió en tres oleadas consecutivas. La primera de ellas se registró en la primavera de 1918, y comenzó en Marzo difundiendo el virus por EEUU, Europa y ciertas partes de Asia. Esta onda duro aproximadamente 6 meses y registró una alta

tasa de infectividad pero un valor de mortalidad moderado, muy similar a los valores normales para una epidemia estacional. La segunda onda pandémica se registró a comienzos del otoño empezando en los meses de Septiembre-Octubre (71). La difusión del virus en este caso se dio por todo el globo, registrándose los mayores valores de mortalidad de toda la pandemia, llegando incluso a tasa de mortalidad del 3%. La tercera onda pandémica comenzó en Enero de 1919 y tuvo similares características a la anterior con una menor tasa de mortalidad (72).

Una de las principales características que tuvo esta pandemia es la alta afectación y mortalidad que se registró en el grupo de población de individuos adultos-jóvenes (20-40 años), mientras que no fue tal en las edades extremas de la vida (niños y ancianos) (1). En España la pandemia también cursó con tres ondas, registrándose mayor mortalidad en la segunda de ellas también en el grupo de individuos jóvenes-adultos. El número oficial de defunciones que se registró en este país a raíz de la pandemia fue de alrededor de 140.000, muchas de ellas causadas por bronconeumonías fulminantes o por sobreinfecciones bastante frecuentes por *Haemophilus influenzae* (1).

Las causas por las que la aparición de una nueva cepa de gripe A causó una pandemia sin precedentes con una mortalidad tan excesiva ha sugerido hipótesis muy controvertidas, aunque la causa de este exceso de mortalidad parece radicar en su origen. En la actualidad existen discusiones acerca de la exactitud de la procedencia de cada gen de este virus, aunque, como se ha comentado anteriormente, algunas de las hipótesis apuntan a que el origen puede ser triple recombinante (70). Sin embargo, gracias a los análisis reconstructivos de secuencias se conoce que la aparición de este nuevo subtipo es probable que no se deba a la inclusión de nuevos genes de un virus que ya circulaba entre la población humana, sino que el origen más probable es aviar desde un subtipo desconocido muy diferente a los subtipos aviares actuales (73,74). Estos análisis reconstructivos revelaron que el gen de la HA poseía un cambio aminoacídico que permitió al virus aviar reconocer los receptores de ácido siálico α -2-6 presentes en los humanos, lo que permitió al nuevo virus diseminarse rápidamente entre la población humana.

El mecanismo exacto por el que este virus fue altamente patogénico en la población es aún desconocido. Algunos estudios recientes han desvelado que algunas de las cepas aviares actuales de tipo HPAI (High Pathogenic Avian Influenza) tienen genes muy similares al virus de 1918 que solo difieren en pocos aminoácidos (75), por lo que la alta patogenia de esta cepa podría estar relacionada con los mecanismos actuales que caracterizan a virus aviares como

A/H5N1 y A/H7N9. Por otra parte, la alta tasa de mortalidad que se registró en la población joven-adulta puede derivar de la exposición que estos sujetos tuvieron en la infancia frente a la antigua cepa A/H3N8 que se estima circuló durante los años 1890 (76). Debido a esto, esta población sería posteriormente susceptible a un linaje H1 ya que no tuvo la oportunidad de establecer su primer contacto en la vida con este subtipo, como sí lo hicieron posteriormente los nacidos anteriormente a esta fecha y también los que nacieron a partir de 1900, los cuales estuvieron en contacto con la cepa A/H1N8 (76)(Figura 9).

Estos hallazgos suponen una valiosa lección para conocer los mecanismos que pueden darse en la actualidad que permitan a un virus aviar adaptarse al ser humano y generar una pandemia. Con la aparición de la nueva variante A/H2N2 en 1957, los linajes derivados de la cepa A/H1N1 de 1918 desaparecieron, aunque quedaron ligados al cerdo como ente enzoonótico (71).

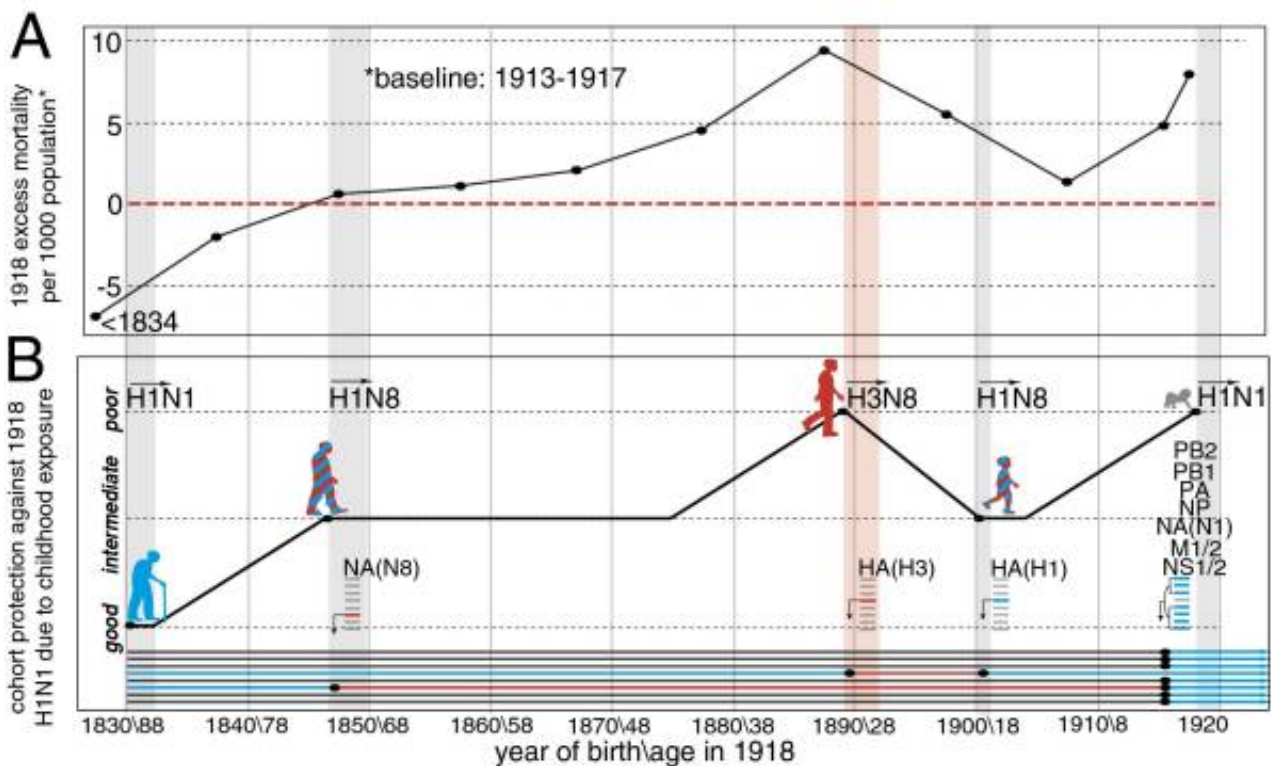


Figura 9. Subtipos de gripe A circulantes con las que la población nacida antes de 1918 tuvo su primer contacto y exceso de mortalidad según grupos etarios en la gripe de 1918. Fuente: *Worobey M et al. Proc Natl Sci USA. 2014;111(22):8107-8112 (76).*

- **Gripe Asiática de 1957:**

A comienzos del año 1957 surgió un nuevo virus de la gripe en la provincia china de Kwichow y difundió por todo el mundo en un plazo de tan solo 10 meses desde su aparición

(77). La pandemia sucedió en dos ondas, distribuidas entre el año que apareció y el comienzo de 1958. Este virus fue denominado como A/H2N2, y pese a su elevada difusión, provocó solo un leve incremento de la mortalidad con respecto a la gripe estacional que no pudo ser en ningún caso comparado con el provocado por la gripe española, causando de forma global en torno a 2 millones de muertos, frecuentemente en personas con co-morbilidades o con infecciones bacterianas subsecuentes (78). En España este virus se estima que provocó en torno a los 6,7 millones de casos (1).

El análisis genético del subtipo A/H2N2 mostró que el virus surgió por un proceso de recombinación genética entre cepas aviarias y los virus de la gripe humana A/H1N1 previamente existentes, sustituyendo los genes HA, NA y PB1 de la gripe derivada de los virus de 1918 por segmentos de virus aviarios (79) (Figura 10). Los análisis serológicos demostraron que en la población mayor de 70 años existían Acs capaces de reconocer esta cepa, por lo que se estima que antes de su aparición tuvieron que haber circulado virus similares a este a finales del siglo XIX, lo que explicó también la menor afectación de este grupo etario durante los años 1957-58 (1).

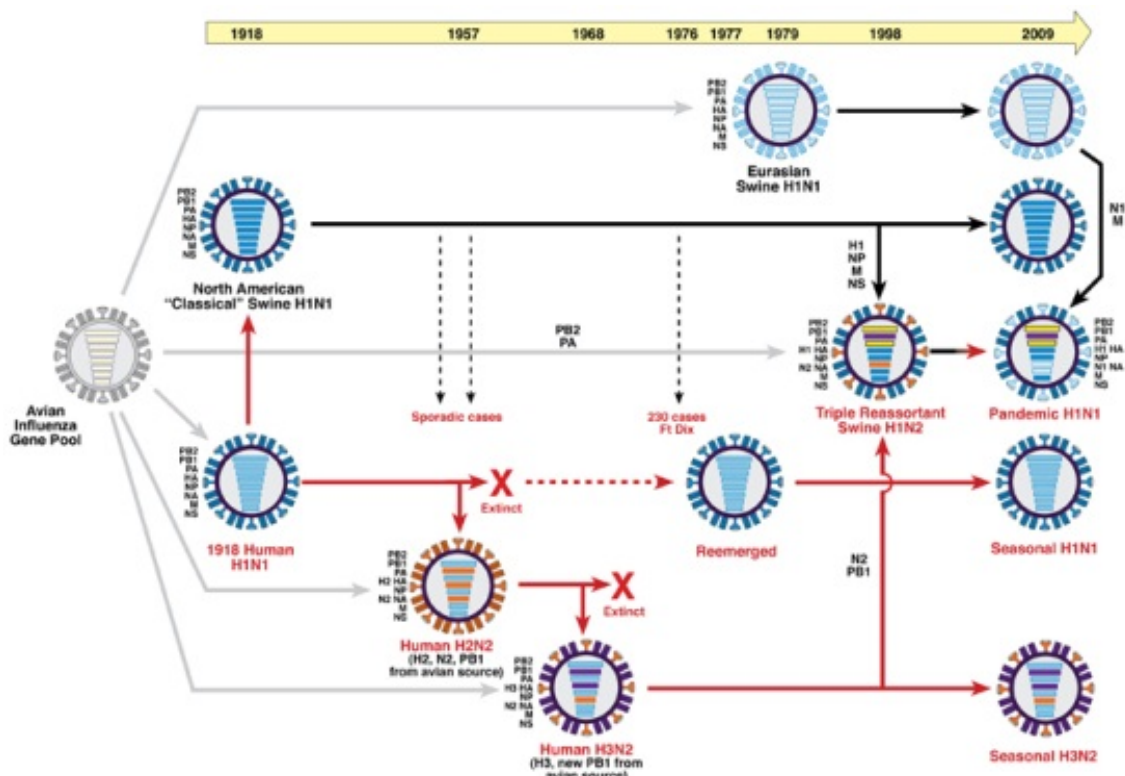


Figura 10. Cronología de los fenómenos de recombinación genética entre los diferentes genes de virus de la gripe A en los siglos XX y XXI. Fuente: *National Institute of Allergy and Infectious diseases 2009*.



Posteriormente a la emergencia de este virus, este comenzó a circular de forma estacional pasados dos años hasta la aparición del subtipo A/H3N2 en 1968 (80), documentándose únicamente dos variantes menores en los años 1962 y 1967 (1).

- Gripe de Hong Kong de 1968:

La pandemia del año 1968 fue producida por la aparición de una nueva variante de gripe A denominada A/H3N2. Este virus apareció por primera vez en la República Popular de China, y se extendió rápidamente en los primeros meses por todo el sureste asiático, siguiendo un patrón de dispersión similar al observado en la pandemia del subtipo A/H2N2 en el año 1957 (81). Sin embargo, una de las grandes diferencias con respecto a la pandemia precedente fueron las diferentes tasas de mortalidad registradas en los diferentes países afectados, como en EEUU donde en la primera onda pandémica se observaron valores similares a los registrados en 1957, mientras que en otros puntos la mortalidad fue muy similar a la de la gripe epidémica (1). La morbilidad de esta nueva variante de gripe fue muy elevada durante las dos ondas registradas, ya que la dispersión de la nueva gripe por el mundo fue bastante rápida.

El origen de esta nueva cepa fue fruto de la recombinación de la mayoría de los genes de la antigua cepa A/H2N2 que dio lugar a la pandemia de gripe asiática con genes de HA y PB1 de virus aviares (82,83). Este origen aviar, que otorgó una HA muy similar a la que estaba presente en los virus A/H3N8 circulantes antes de 1918 (76), puede estar detrás de la mayor incidencia de esta cepa en la población joven-adulta, y no en la población anciana que ya estuvo en contacto en los primeros años de su vida con este tipo de hemaglutinina.

Posteriormente a esta pandemia, el subtipo A/H3N2 ha continuado circulando hasta el presente en la población humana en forma de epidemias estacionales, observándose progresivamente una variación debida al *drift* antigénico sufrido durante todos estos años. La adaptación que este subtipo ha sufrido hacia el ser humano desde su aparición hasta nuestros días ha provocado incluso que actualmente la propagación de este virus en huevos embrionados de gallina sea prácticamente imposible (84).

- Gripe pandémica de 2009:

La gripe pandémica del año 2009 es el último evento pandémico registrado entre la población humana en el que un virus de la gripe ha sufrido una aparición súbita y se ha

dispersado por toda la población. Este evento fue de gran relevancia para la comunidad científica porque permitió estudiar en tiempo real el desarrollo de una pandemia con los medios actuales, aumentado superlativamente el conocimiento sobre los virus de la gripe y sobre los mecanismos que permiten la aparición de este tipo de eventos.

El subtipo implicado en esta pandemia se bautizó como A/H1N1pdm09. El origen del mismo es cuádruple recombinante, pues está formada por los genomas de virus aviar, porcino clásico, porcino euroasiático y linaje humano (61,85,86). El origen porcino norteamericano clásico aportó los genes HA, NP, NS1 y NS2, mientras que el linaje euroasiático aportó los genes NA, M1 y M2. Por su parte, el linaje aviar aportó los genes PB2 y PA, y el linaje humano procedente de la cepa A/H3N2 aportó el gen PB1 (Figura 11).

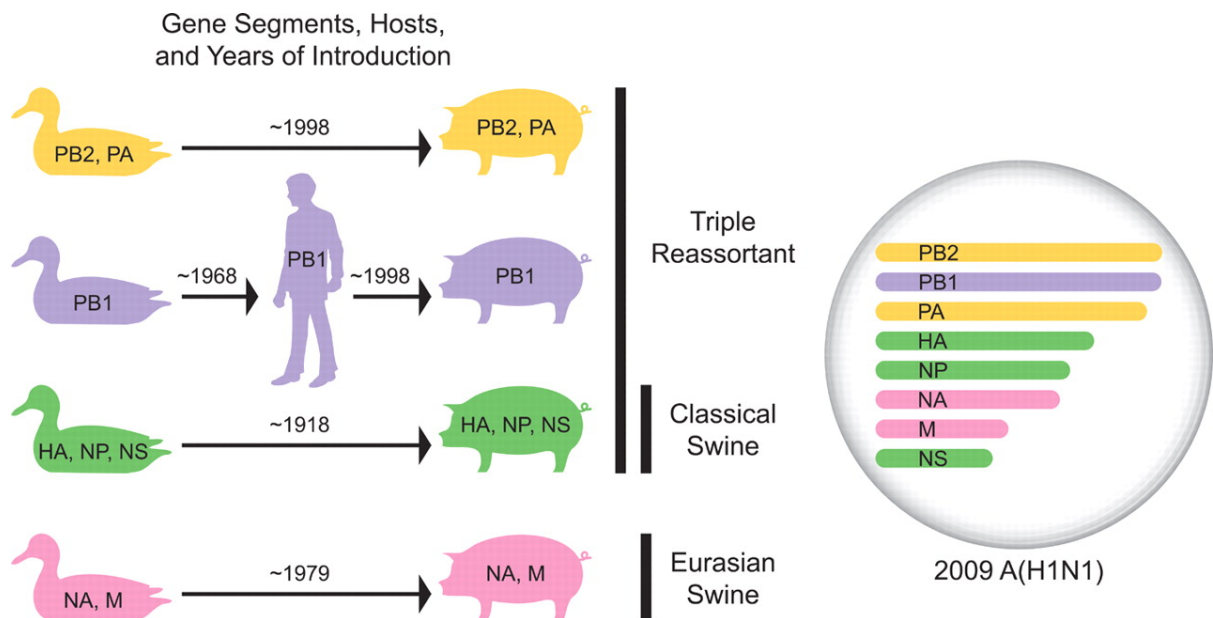


Figura 11. Procedencia de los genes componentes del virus cuádruple recombinante A/H1N1pdm09 emergente en el año 2009. *Garten RJ et al. Science 2009;325:197-201 (85).*

La dispersión de este nuevo subtipo de gripe comenzó a principios del año 2009, en el que se observó un aumento significativo de los casos de neumonía de origen viral declarándose un total de 845 casos y 59 muertes en la capital de México. Este nuevo virus fue identificado posteriormente como A/H1N1pdm09 (87), asegurando que se trataba de un virus de alta transmisibilidad pero de baja virulencia (88,89).



El día 26 de Abril de 2009 la OMS declaró el estado de emergencia de Sanidad Pública de importancia internacional, y el día 11 de Junio de 2009 declaró el nivel de alerta de Pandemia nivel 6 al haberse extendido este nuevo patógeno por 74 países (36). La pandemia cursó con dos ondas netamente diferentes. La primera de ellas comenzó en el lugar de origen del brote y se extendió rápidamente por EEUU y posteriormente por el resto del hemisferio norte entre los meses de Abril a Agosto. La segunda onda pandémica comenzó en Septiembre dando lugar a una dispersión del virus mucho más elevada por todo el globo (36).

De forma similar a lo ocurrido en otras pandemias anteriormente mencionadas, la gripe de 2009 afectó sobre todo a la población joven-adulta, produciendo una casuística significativamente menor de la esperada en el estrato de población anciana. La gripe A/H1N1pdm09 se caracterizó por una afectación mayor de la población que poseía enfermedades de tipo crónico o factores predisponentes (90), y por una tasa de mortalidad muy reducida, similar a la registrada en las epidemias estacionales de gripe. Finalmente, la OMS declaró en Agosto de 2010 el final de la pandemia con un total de 18.449 muertes.

Además de estos cuatro eventos pandémicos de gran relevancia para la humanidad, durante los dos últimos siglos han ocurrido otra serie de eventos singulares, en los cuales han aparecido otros subtipos de virus de la gripe, que si bien no han logrado hasta el momento elevar la alerta sanitaria hasta niveles como los previamente descritos, sí que han requerido una atención más detallada de su evolución. Estos eventos se describen a continuación:

- **Pseudopandemia de 1947:**

La pseudopandemia de 1947 ocurrió por la aparición de una variante de gripe A/H1N1 notablemente diferente de las gripes procedentes de la cepa de 1918 que produjeron epidemias estacionales en la década de 1940. Este evento comenzó con un brote a finales de 1946 en zonas militares ocupadas por tropas japonesas, coreanas y estadounidenses a finales de la Segunda Guerra Mundial, dispersándose posteriormente por las bases militares de EEUU como Fort Monmouth en New Jersey (el lugar que dio nombre a esta cepa: A/Fort Monmouth/1/47) (78). A este evento se le denominó como “pseudopandemia de 1947” debido a que la dispersión del virus fue bastante elevada pero su mortalidad muy baja (91). El origen de este virus parece ser la evolución paralela de un brazo filogenético de las cepas del subtipo A/H1N1 circulantes en los años anteriores, el cual no habría producido epidemias detectables hasta su emergencia en 1947 (92).

Uno de los eventos más relevantes de esta pseudopandemia es el fallo total de vacunación que se observó con respecto a la cepa administrada en la vacuna ese año, la cepa A/Weiss/43, la cual si fue efectiva en las temporadas de gripe de 1943-44 y 1944-45. Los estudios antigénicos realizados en esas fechas para dicha cepa revelaron un cierto porcentaje de variación no suficiente como para promover una pérdida de eficacia vacunal tan elevada (91), por lo que en la actualidad la aparición de este evento sigue siendo un misterio. Posteriormente este mismo efecto se reveló también con modelos murinos (91).

Según los postulados de ED Kilbourne (91), el hecho de que la emergencia de esta cepa no provocara una pandemia pudo deberse a que, pese al porcentaje reducido de homología entre cepas anteriores y la nueva, esta si producía una cierta estimulación del sistema inmune suficiente como para que la población pudiera combatir el virus y moderar el flujo de la epidemia. Esta delgada línea propuesta por este autor consistente en el porcentaje de homología entre una cepa circulante y otra emergente parece ser la clave determinante por la que una nueva cepa puede llegar a provocar una pandemia global.

- **Reaparición de la cepa A/H1N1 en 1977:**

La gripe Rusa o Gripe Roja surgió como la reaparición del subtipo A/H1N1 desaparecida desde la década de 1950 tras la aparición de la variante A/H2N2 en 1957 (77). Este virus fue documentado por primera vez en Noviembre de 1977 en la antigua Unión Soviética, provocándose una rápida dispersión entre la población joven menor de 25 años causando un síndrome respiratorio leve-moderado con síntomas clásicos de gripe (78). Esta mayor afectación de los individuos menores de 25 años se debió a la ausencia en la circulación del subtipo A/H1N1 a partir de 1957, ya que fueron reemplazadas por los subtipos A/H2N2 y A/H3N2 antes descritos, por lo que la población nacida en este intervalo de tiempo nunca había estado expuesta a estos virus comportándose inmunológicamente como personas *naïve*.

Los estudios filogenéticos mostraron que la homología entre los genes de la gripe de 1977 (cepa denominada como A/USSR/90/77) y las gripes observadas en la década de 1950 era muy elevado (93–95), por lo que se postuló que esta cepa debía proceder directamente de estas. Sin embargo en la actualidad no se ha encontrado la causa concreta por la que un virus ha permanecido invariable genéticamente durante más de dos décadas, aunque una de las hipótesis más aceptadas es que esta cepa procedió de un espécimen congelado, que probablemente se propagó por un incidente de laboratorio (96,97).



Este subtipo finalmente se reintegró en la circulación epidémica, provocando epidemias estacionales junto con el subtipo A/H3N2 hasta su completa desaparición en el año 2009 con la aparición de la nueva variante A/H1N1pdm09.

- Brote del subtipo A/H5N1 de 1997:

En 1997 se documentó la transmisión del virus A/H5N1 de las aves al humano en un brote en Hong Kong, en el que se infectaron un total de 18 personas, 6 de las cuales murieron a causa de este virus. Posteriormente a este brote se ha documentado un goteo lento pero continuo de casos de transmisión de aves al ser humano hasta el año 2015, alcanzándose un total aproximado de 850 casos registrados hasta el año 2015 con una mortalidad cercana al 53% (98). Este brote está circunscrito sobre todo a países del sureste asiático y de Oriente Medio, en los cuales el manejo de las aves de corral, sobre todo en mercados, es muy habitual.

Este nuevo virus es eminentemente aviar y su transmisión esporádica al ser humano produce síntomas clásicos además de diarrea, leucopenia, linfopenia y trombocitopenia. Los pacientes suelen morir tras evolucionar a neumonía y fallo multiorgánico. La infección y mortalidad se focaliza sobre todo en pacientes jóvenes y niños, y el mayor riesgo de contagio se da por exposición directa con aves infectadas. El virus actualmente, tanto en aves como en humanos, ha demostrado una cierta estacionalidad, siendo más prevalente durante los periodos invernales (98).

Desde la aparición de este virus, se han descrito 10 subclados que sobreviven en aves acuáticas migratorias de Asia, no siendo un subclado concreto el que mayormente ha infectado al ser humano, sino que se han descrito casos de virus procedentes de los subclados 1, 2 y 3 (99). La aparición de casos asintomáticos es muy infrecuente, y por el momento no se ha demostrado transmisión inter-humana sostenida (100). Sin embargo, con el fin de evitar que esto suceda, la OMS posee un plan de vigilancia para prevenir que el virus pueda provocar una pandemia mundial (101).

- Brote del subtipo A/H9N2 de 1994:

El virus de la gripe aviar A/H9N2 fue aislado por primera vez en 1994 en la provincia China de Guangdong (102), y ha causado brotes de diversa entidad entre la población humana desde el año 1999 hasta la actualidad en el sureste asiático (103). Este virus está ampliamente distribuido en aves asiáticas, mientras que en zonas de Norteamérica no se ha encontrado evidencia de su dispersión (104,105). La transmisión de este virus ha sido documentada entre

las aves por vía aérea, alimentos o incluso por el agua, pero hasta el momento no parece que exista una transmisión sostenida entre humanos, dándose únicamente de forma esporádica entre las aves y estos últimos (55). Sin embargo, algunos estudios sugieren que de un 2 al 4% porcentaje de trabajadores de granjas avícolas poseen altos niveles de Acs frente a esta cepa, por lo que la infección subclínica podría darse de forma frecuente entre población expuesta (106).

De forma diferente al virus A/H5N1, en el subtipo A/H9N2 si se ha demostrado transmisión inter-específica de aves a mamíferos como los cerdos, por lo que casos de co-infección en este tipo de animales entre virus humanos como el A/H3N2 y esta cepa pueden aumentar las posibilidades de generar virus recombinantes capaces de producir pandemias (103). De hecho, se ha demostrado que esta cepa posee receptores muy similares a los presentes en el subtipo A/H3N2 (107), e incluso mutaciones similares a A/H2N2 y a A/H3N2 en las glicoproteínas de superficie, por lo que este subtipo puede potencialmente adaptarse para infectar al ser humano.

- **Brote del subtipo A/H7N9 de 2013:**

El reciente brote de gripe aviar de 2013 fue causado por el subtipo A/H7N9 que emergió en la provincia China del delta del río Yangtze, causando un total de tres infectados y dispersándose posteriormente por 18 provincias de la zona (108,109). La composición genética del virus reveló que el gen HA y NA procedían de virus aviares Euroasiáticos y el resto de los 6 genes procedían de la cepa A/H9N2 (110). En este tipo de casos se observó, al igual que en los brotes aviares anteriores, una conexión directa entre la enfermedad y la exposición a aves en mercados o mataderos.

Los datos de laboratorio analizados en China demostraron que este subtipo mostró una tasa de mortalidad del 30% (109). Sin embargo y pese a este dato, tanto el subtipo A/H9N2 como A/H7N9 han sido categorizados como LPAI (Low Pathogenic Avian Influenza). A diferencia de las anteriores virus aviares descritos que eran frecuentemente encontradas en reservorios aviares estabulados, el subtipo A/H7N9 posee un reservorio aviar más relacionado con las aves vendidas en los mercados, por lo que supone un mayor riesgo de transmisión a la población general en zonas del sureste asiático (111).



Epidemiología de las infecciones por virus de la gripe

La circulación de los virus de la gripe sucede en periodos epidémicos donde uno o más subtipos circulan en una población determinada, causando de forma general un porcentaje de afectación de entre el 10-20% en dicha población, o incluso pudiendo llegar a veces a índices del 40-50% en función de las características específicas del virus (112). Estas epidemias se suelen asociar con un aumento de la morbilidad y de la mortalidad expresada por lo general en un aumento de las neumonías, número de hospitalizaciones y fallecimientos asociados a esta afección durante el período epidémico (99). Estos periodos epidémicos comienzan normalmente con la aparición esporádica de casos de gripe entre la población, lo que precede a la explosión epidémica. Posteriormente, la epidemia comienza de forma brusca, alcanzando el valor máximo de casos en 5-6 semanas desde la aparición del brote inicial (113).

Las epidemias de gripe suceden de forma diferente en función de la latitud, ocurriendo en los meses fríos y húmedos del hemisferio norte y sur, mientras que en las zonas tropicales no existe un periodo de máxima incidencia sino que la gripe circula durante todo el año (99). Por otra parte, los virus de la gripe circulan en ambos hemisferios previamente a la explosión epidémica durante los meses de verano y otoño, determinando lo que se denomina como ondas precursoras, que acontecen a los virus que probablemente circulen la temporada de gripe siguiente.

En España, el patrón epidémico típico de la gripe provoca un aumento de casos y de detecciones de estos virus a partir de la segunda o tercera semana del mes de Enero, llegando normalmente al pico de la onda epidémica a comienzos del mes de Febrero y alcanzándose tasas de incidencia de gripe que varían entre 250-300 casos por 100.000 habitantes/semana en función de cada temporada (114) (Figura 12).

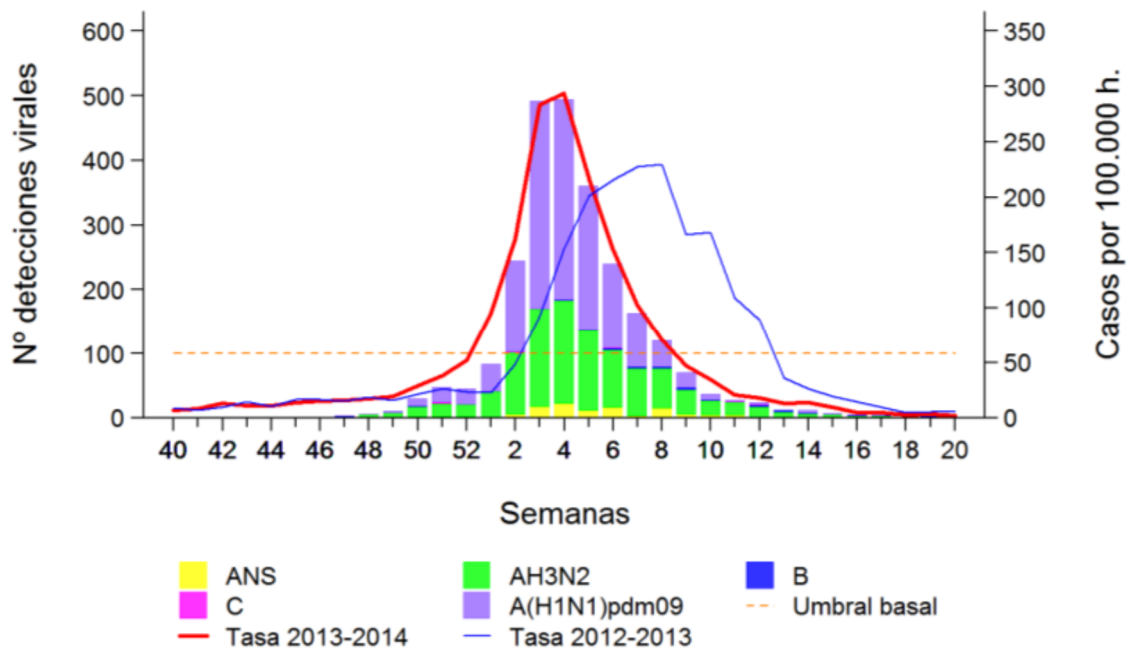


Figura 12. Perfil epidémico del virus de la gripe medido como tasa de incidencia semanal y número de detecciones virales. Temporada 2013-2014. Fuente: *CNE-Sistemas de Vigilancia de la gripe en España* (114).

La transmisibilidad de los virus de la gripe es relativamente baja con una R_0 (número básico de reproducción) por debajo de 2 (80). Su transmisión es por vía aérea, contacto personal con secreciones respiratorias y también por contacto con fómites infectados. Esta transmisión muchas veces está determinada por el hacinamiento en espacios cerrados que sucede en la población durante los meses invernales. El nivel de afectación que la gripe ejerce sobre un grupo poblacional durante una epidemia está determinado por una parte por la inmunidad que dicha población posee con respecto a los virus circulantes, y, por otro lado por la deriva genética sufrida por la nueva cepa de gripe con respecto a las anteriormente circulantes.

La gripe suele presentar una curva de incidencia relacionada con la edad en forma de “U” (Figura 13), siendo los niños y jóvenes la subpoblación con más número de hospitalizaciones y los ancianos la que más mortalidad registra (115).

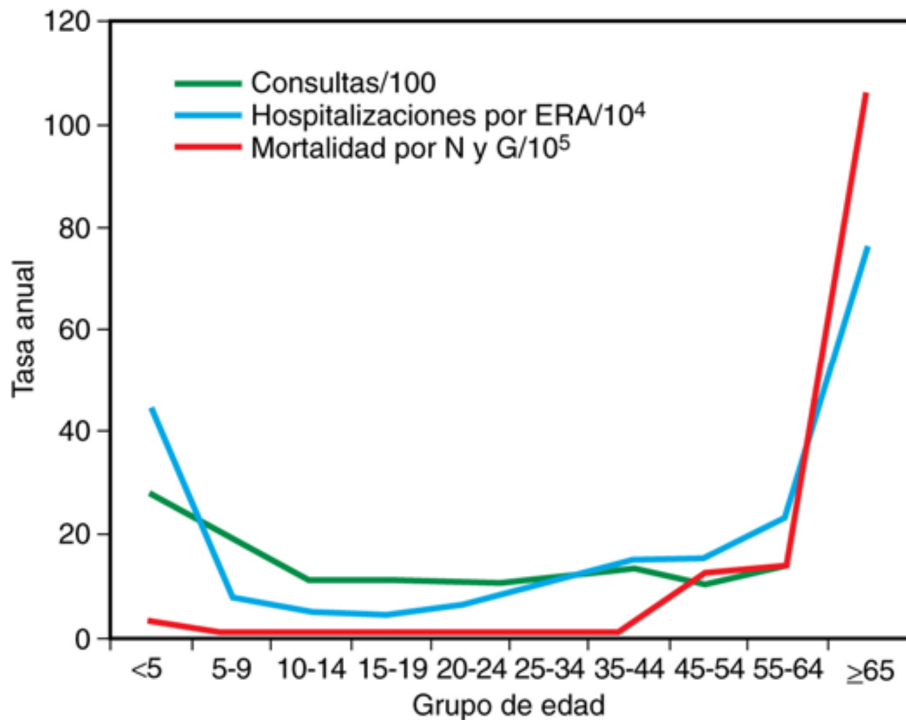


Figura 13. Gráfico de incidencia por grupos etarios en función del número de consultas, hospitalizaciones y mortalidad. Extraído y modificado de: Glezen WP et al. Age distribution of patients with medically-attended illnesses caused by sequential variants of influenza A/H1N1: comparison to age-specific infection rates, 1978-1989. *Am J Epidemiol.* 1991 Feb 1;133(3):296–304 (115).

Este patrón en “U” suele desfigurarse con la aparición de eventos pandémicos como la gripe de 1918, en el cual la curva de afectación etaria adquirió una forma en “W” debido a la mayor incidencia de casos graves entre la población joven-adulta (71). Este tipo de eventos no siguen un patrón epidémico típico, sino que en ellos suelen producirse ondas de mayor o menor incidencia en función de las características del virus emergente y de la inmunidad preexistente en la población susceptible. Estas ondas además no se adaptan a los periodos clásicos de circulación de la gripe durante los meses invernales, y pueden registrarse en cualquiera parte del año, como en el año 2009 en el que el pico de máxima actividad de la pandemia se registró durante los meses de Septiembre y Octubre (36).

Respuesta inmune humoral ante la infección por virus de la gripe

La respuesta inmune humoral forma parte de la respuesta adaptativa del sistema inmune ante la presencia de un patógeno. Esta respuesta humoral se basa en la producción de Acs por parte de las células B de memoria. Ante una re-estimulación por un virus de la gripe, estos Acs son rápidamente producidos a nivel local en el tracto respiratorio pero también a nivel sistémico.

Ante una primo-infección por un subtipo concreto de virus de la gripe, la activación de las células B se da a partir de un estado pro-inflamatorio mediado por la inmunidad celular, en el que se liberan grandes cantidades de citoquinas como la IL-4 e IL-5 (116). Una vez que estas células B reconocen específicamente el antígeno con los receptores de membrana, evolucionarán posteriormente a células plasmáticas productoras de Acs, que comienzan a producir una respuesta inflamatoria primaria liberando IgM de baja afinidad detectable en tan solo 5 días después de la infección (117) (Figura 14).

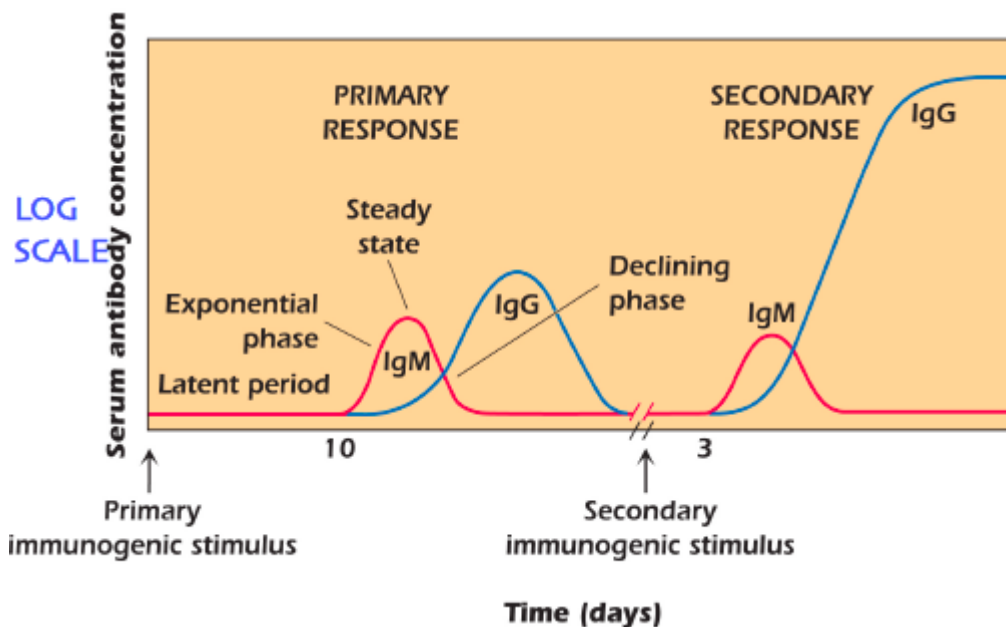


Figura 14. Perfil de la respuesta inmune humoral en términos de concentración de Acs en suero tras una infección y un estímulo secundario por virus de la gripe.

Por otra parte, algunas de las células B que han reconocido antígenos se transformarán en células B de memoria, las cuales producirán Acs de mayor afinidad y de más larga duración, como IgG, IgA e IgE, que se liberarán inmediatamente en caso de sufrir una re-infección



posterior (117). La función de estos Acs es neutralizar el virus, reducir la replicación y la difusión por otras partes del organismo, además de contribuir al aclaramiento del virus por parte de todo el sistema inmune (118), lo que ocurre normalmente en un lapso de tiempo de entre 1 y 2 semanas.

La utilidad de los Acs una vez se ha producido la infección es bastante limitado (36). Sin embargo su uso es realmente relevante para evitar las infecciones futuras, siendo el mecanismo principal de funcionamiento de las vacunas. Pese a la gran protección que este tipo de inmunidad produce, uno de sus talones de Aquiles es la gran presión selectiva que produce en los virus de la gripe, ya que este fenómeno, junto con la alta tasa de mutación de estos (44), son los responsables de la continua deriva antigénica anteriormente descrita (50), especialmente en el gen de la HA que es el más inmunodominante (80). Este fenómeno es el desencadenante de las continuas epidemias que se suceden año tras año en los países de clima templado.

A pesar de esto, actualmente existen estudios que han evidenciado la creación de Acs frente a epitopos muy conservados dentro del virus, incluso en ciertos dominios de la proteína HA (119–125). Se ha postulado que estos Acs son capaces de reconocer diversos subtipos de virus de la gripe, pudiendo ofrecer una protección cruzada que pueda ser la causa de la desaparición de ciertas cepas epidémicas (80), además de que pueda ofrecer la clave para el diseño y fabricación de vacunas universales (126–128). Este fenómeno de inmunidad cruzada ha sido descrito frente al subtipo A/H1N1pdm09 que apareció en el año 2009, sobre todo en población nacida antes de la década de 1970 (129). Actualmente no se conoce que nivel de protección cruzada puede generar la presencia de epitopos compartidos, sin embargo se ha descrito que la simple presencia de zonas parcialmente homólogas puede producir niveles significativos de protección frente a virus heterosubtípicos (130,131).

La eficacia vacunal y el nivel de inmunidad previa a la vacunación se puede medir fácilmente mediante análisis de microneutralización o ensayos de reacción de inhibición de hemaglutinación (RIH). De hecho, el título de Acs puede actuar como predictor del nivel de protección que puede estimarse en un determinado individuo. Así, mediante la RIH, algunos autores han determinado que un título de Acs de 1/40 se corresponde con una reducción del 50% en el riesgo de contraer gripe por parte de un individuo adulto de una población susceptible (132,133).

Por otra parte, la actividad del sistema inmune, y en concreto de la respuesta humoral, está muy influenciada por las características específicas de cada individuo de una población. En la población mayor de 65 años la capacidad del sistema inmune de elaborar una respuesta compleja ante una infección natural o frente a la vacunación está disminuida con respecto a los individuos más jóvenes, debido fundamentalmente a fenómenos de inmunosenescencia (134–136). Esta senescencia del sistema inmune no solo ocurre frente a una primo-infección por un subtipo de virus de la gripe nuevo, sino también para la activación de las células B de memoria ante un subtipo ya conocido ya sea por infección natural o por la vacunación (134–137). De esta misma manera ocurre en otros grupos poblacionales considerados de riesgo en el caso de una infección por virus de la gripe, como por ejemplo los pacientes con enfermedades crónicas, embarazadas, o en pacientes inmunodeprimidos por procesos infecciosos crónicos (SIDA) o por procesos que requieran medicación inmunosupresora (pacientes con enfermedades autoinmunes, trasplantados, etc.) (138–140). Teniendo en consideración estos principios, para grupos poblacionales como las personas mayores de 65 años o los individuos con enfermedades autoinmunes un nivel de Acs con título de 1/40 puede no ser suficiente en algunos casos, llegando a precisar títulos más elevados para alcanzar una protección similar a otros grupos poblacionales.

Vacunación frente a los virus de la gripe

Las vacunas, el mayor avance médico de los siglos XX y XXI

Las vacunas son compuestos biológicos utilizados para promover y obtener una inmunización activa y artificial contra una enfermedad específica (8). Actualmente, son uno de los avances médicos que más ha alargado la esperanza de vida de la población tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (141). En 1931, el descubrimiento por parte de Ernest William Goodpasture de que los virus de la gripe eran capaces de crecer en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados de gallina (142), supuso una revolución que permitiría el posterior desarrollo de las primeras vacunas frente a estos virus (Figura 15).

Las primeras vacunas monovalentes de la gripe fueron puestas a punto en 1938 gracias a trabajos de Thomas Francis, Jonas Salk, Wilson Smith y Macfarlane Burnet (143). No fueron ampliamente utilizadas sin embargo hasta los años 1940, administrándose sobre todo entre los soldados de la Segunda Guerra Mundial y ya incluyendo virus de la gripe A y B en su composición, siendo las primeras vacunas bivalentes utilizadas (143).



Figura 15. El Dr. Eric French con su asistente Joan realizando los primeros experimentos de inoculación de virus de la gripe en huevos embrionados de gallina.

Posteriormente a estos descubrimientos que determinaron el arranque de la vacunación frente a la gripe, el descubrimiento de la deriva antigénica que sufrían estos virus generó la necesidad de una continua mejora de los procesos de fabricación y de adaptación de la formulación vacunal con las cepas circulantes en las epidemias de gripe. No es hasta el año 1978 en el que se diseñó una vacuna que incluyó por primera vez dos cepas de gripe A (H1N1 y H3N2) además de una cepa de gripe B en la composición, creando la vacuna trivalente anual que se utiliza actualmente (144).

En la actualidad y desde los comienzos históricos de propagación de virus de la gripe en los laboratorios, gran parte de las vacunas se realizan mediante tecnología de inoculación en huevo embrionado de gallina (145). Sin embargo, existen otros métodos más modernos que utilizan cultivos celulares mucho más adaptables a virus humanos puestos a punto para uso en desarrollo clínico a partir del año 2005, aunque su desarrollo se lleva realizando desde 1961 (144).

Mecanismos de desarrollo de las vacunas antigripales

La fabricación de las vacunas antigripales conlleva un proceso complejo de vigilancia epidemiológica para concretar las cepas que deben ser incluidas en su formulación. Esto se debe al fenómeno de deriva antigénica anteriormente descrito, el cual provoca que cada año las cepas de gripe circulantes varíen genética y antigénicamente con respecto a las anteriores (49), lo que implica que la inmunización de la población mediante la vacunación requiera de una constante actualización. Esta labor de vigilancia es llevada a cabo por los 142 Centros Nacionales de Gripe adscritos a la OMS en 113 países del mundo (datos del año 2015)(146), los cuales monitorizan la tendencia de circulación de los virus de la gripe y reportan los resultados a los cinco grandes centros colaboradores y de referencia distribuidos por el mundo.

Gracias a esta labor, las nuevas variantes menores descritas por estos centros son caracterizadas molecularmente así como por métodos antigénicos, determinando cual es la evolución natural de los diferentes subtipos circulantes e identificando las mutaciones observadas en estos (8). Estos datos en conjunto con los obtenidos de la evaluación de la eficacia de las vacunas administradas en otras temporadas, los datos epidemiológicos actuales y las características de crecimiento de las cepas analizadas, se someten a valoración por los distintos expertos en gripe en la reunión anual de la OMS (*WHO Vaccine Composition Meeting*) (147). En esta reunión se deciden cuáles van a ser las cepas recomendadas para la formulación



de la vacuna trivalente anual de la temporada gripal siguiente. Estas recomendaciones deben estar preparadas de 6 a 9 meses antes de la distribución del producto final.

Medios de fabricación de las vacunas antigripales

En la actualidad, la industria farmacéutica encargada de la realización de las vacunas antigripales usa fundamentalmente tres metodologías diferentes para su fabricación, las cuales se muestran a continuación:

- *Vacunas generadas a partir de huevos embrionados:*

Es el método más comúnmente utilizado para la fabricación de vacunas para la gripe en la actualidad y a la vez el más antiguo de todos. Actualmente se usa para la fabricación de vacuna inactivada de administración intradérmica y vacuna atenuada para espráis nasales (148). El proceso de creación de la vacuna a partir de huevos embrionados comienza con la cesión por parte de los Centros de Gripe referencia o por parte de los CDC (Center for Disease Control and Prevention), de cepas de gripe cultivadas en huevos embrionados siguiendo las regulaciones de la FDA (American Food and Drug Agency) a las empresas farmacéuticas que realizan los procesos de fabricación. Estos virus son después inoculados por estas compañías en huevos embrionados para obtener suficiente stock del virus. En el caso de vacunas inactivadas, estos virus después de su propagación son inactivados, purificados y testados. Sin embargo, para las vacunas atenuadas, los virus obtenidos de la inoculación en huevos embrionados sufren un proceso ligeramente diferente. El protocolo de fabricación continúa con la valoración y revisión de seguridad por parte de la FDA, quien dará el visto final para su comercialización (148).

- *Vacunas generadas a partir de cultivo celular:*

Las vacunas generadas mediante el uso de cultivos celulares para el uso humano fueron aprobadas por primera vez en 2012 por la FDA (149). La producción comienza de igual modo con la aportación de los virus cultivados a partir de huevos embrionados por parte de los Centros de Gripe Referencia o de la FDA a las empresas farmacéuticas. En este caso, los virus son posteriormente cultivados en distintas líneas celulares de mamífero, de los cuales se recogerá posteriormente el sobrenadante de cultivo y se realizarán los mismos procesos de purificado y de aprobación por parte de la FDA anteriormente expuestos para las vacunas de huevos embrionados. Este proceso es mucho más simple, menos costoso, más rápido y atenta menos contra los derechos de los animales al no usar huevos embrionados para su producción (148). Por otra parte, actualmente se ha postulado que la creación de vacunas a partir de

líneas celulares de mamíferos permite que los virus cultivados puedan ser más parecidos a los humanos que naturalmente circulan (150), debido a que estos no han de sufrir variaciones o mutaciones por adaptarse a un entorno aviar al no cultivarse en huevos embrionados. Por otra parte, al eliminar el huevo del medio de cultivo, estas vacunas pueden ser administradas a aquellos individuos que tengan alergia al huevo o sus derivados.

- *Vacunas recombinantes:*

La tecnología de creación de vacunas recombinantes fue aprobada por la FDA en el año 2013 (151). Esta tecnología no necesita el uso de cultivos celulares ni de huevos embrionados en ninguna parte del proceso, sino que las compañías farmacéuticas aíslan la proteína HA de la cepa salvaje seleccionada siendo después combinada con porciones de otro virus capaz de crecer en células de insecto (generalmente baculovirus) (152). Posteriormente a este virus vacunal recombinante se le permite crecer en esas células, y la proteína HA es recolectada y purificada para ser testada por la FDA. Una de las principales ventajas de este método es que, al no necesitar de huevos embrionados, los tiempos de creación de vacuna son mucho más reducidos al no necesitar una producción mundial de este soporte biológico para su uso (148).

Tipos de vacunas antigripales

Las vacunas que actualmente se utilizan frente a los virus de la gripe se dividen fundamentalmente en los siguientes dos grupos:

- *Vacunas de virus inactivados:*

Este tipo de vacunas se obtienen a partir de cultivo en huevos embrionados. La inactivación de los virus se realiza mediante el uso de formol o beta-propiolactona (BLP). En la actualidad se comercializan con formulaciones trivalentes (subtipos A/H3 y A/H1N1pdm09 y un linaje de gripe B) o tetravalentes (subtipos A/H3 y A/H1N1pdm09 y los dos linajes de gripe B) en las que se incluye un total de 15 mcg de antígeno de cada subtipo y linaje de gripe (153). En la actualidad, la FDA ha aprobado además una vacuna de alta dosis (High Dose FluZone-Sanofi Pasteur) que incluye 60 mcg de antígeno de cada subtipo y linaje incluida, estando especialmente diseñada para individuos mayores de 70 años (154).

Dentro de las vacunas en cuya composición únicamente tienen virus inactivados, se distinguen cinco tipos diferentes en función de las características de las mismas (8):



A. Vacunas de virus enteros:

Son vacunas que contienen, además de las proteínas HA y NA, otras estructura lipídicas y polisacáridicas que facilitan el reconocimiento de antígenos, facilitando una respuesta celular además de la humoral. Es uno de los tipos de vacunas con mayor poder reactógeno.

B. Vacunas de virus fraccionados:

Este tipo de vacunas son suspensiones purificadas de viriones fraccionados debido a detergentes de distinto tipo, donde solo existirán las proteínas HA, NA y partes de las proteínas NP y M. Son capaces de inducir ambos tipos de inmunidad adquirida (celular y humoral).

C. Vacunas de subunidades:

Solo contienen las proteínas HA y NA unidas por los extremos lipofílicos.

D. Vacunas inactivadas de virosomas:

Estas vacunas se obtienen mediante la intercalación de la proteína HA en liposomas, por lo que generan una mayor respuesta inmunógena por la estimulación de diferentes subpoblaciones de células T tras la fusión del virosoma con la membrana plasmática de los macrófagos. Al no ser necesaria la adición de grandes cantidades de proteína en estos virosomas, las reacciones secundarias son mucho menores en los individuos a los que se administra.

E. Vacunas adyuvadas:

Son vacunas que utilizan adyuvantes como el MF59 (emulsión oleo acuosa de escualeno con dos surfactantes) que aumentan y prolongan la inmunogenicidad de la misma potenciando el efecto sobre las células T. Este tipo de vacunas están sobre todo indicadas en personas mayores de 65 años e inmunodeprimidos, aunque tienen mayores efectos secundarios que las no adyuvadas.

- *Vacunas de virus atenuados:*

El uso de vacunas de virus atenuados fue sugerido poco tiempo después del conocimiento de que el virus de la gripe era causante del síndrome respiratorio agudo conocido de forma anglosajona como "influenza". La estrategia más común para la producción

de este tipo de vacunas es la recombinación genética de los genes de las proteínas HA y NA de las cepas seleccionadas con un virus vacunal o un virus donante maestro. Dicho virus donante posee mutaciones en los genes internos que le confieren la incapacidad de llevar a cabo ciclos infectantes a temperaturas fisiológicas humanas (35-37°C). Estos virus recombinantes se multiplican en el laboratorio en cultivos celulares a baja temperatura (25°C), lo que le otorga la capacidad única de crecer en frío y de inhibir su crecimiento con calor. Las cepas comúnmente utilizadas como donantes de los genes internos son la cepa A/Ann Arbor/6/60 (subtipo A/H2N2) y la cepa B/Ann Arbor/1/66 (80).

La administración de este tipo de vacunas se realiza de forma intranasal. Este virus recombinante puede crecer e infectar las células de las vías respiratorias superiores debido a una temperatura más baja que la sistémica. Sin embargo, este virus no es capaz de crecer en el aparato respiratorio inferior debido a que su temperatura ronda los 36-38°C. La administración se realiza en dos dosis separadas por 4-8 semanas, y hasta el momento ha demostrado porcentajes de eficacia muy similares a las vacunas de tipo inactivado. Los efectos secundarios de este tipo de vacunas se observan a nivel local, sobre todo con rinorrea y congestión nasal, o fiebre en un número menor de casos (8). Por otra parte, este tipo de inoculación, como conlleva la replicación de virus vivos, puede permitir la transmisión del mismo desde una persona vacunada hasta otra persona que no lo está, con periodos ventana de excreción viral de hasta 21 días (80).

La terminología de todas las vacunas utilizadas frente a la gripe ha sufrido un cambio de nomenclatura entre los años 2014 y 2015, presentándose los nuevos nombres anglosajones que se muestran a continuación:

- **IIV (Inactivated influenza vaccine):**

Reemplaza a la Antigua TIV (Trivalent inactivated influenza vaccine) y tiene dos subclases producidas en huevos embrionados

i) IIV3: Vacuna trivalente

ii) IIV4: Vacuna tetravalente

- **RIV (Recombinant influenza vaccine):**

Vacuna tetravalente recombinante de proteína HA. También disponible como trivalente (RIV3).



- **LAIV (Live attenuated influenza vaccine):**
Vacuna antigripal viva atenuada, también disponible con formulación tetravalente (LAIV4).

- **Vacunas con prefijo “cc”:**
Vacunas creadas a partir de cultivos celulares.

Grupos de administración preferente y campañas de vacunación

La vacuna antigripal anual se administra de forma diferente en función del país al que hagamos referencia. Así pues, existen países, como EEUU o Canadá, en los que la vacuna se ofrece de forma sistemática a toda la población, independientemente de su edad (a partir de los 6 meses), condición física o el trabajo que desempeñe (155,156). En otros países sin embargo existen los denominados grupos de riesgo, en los que la administración de la vacuna es preferente con respecto a los individuos que no pertenezcan a los mismos. En España, la vacuna se administra preferentemente a los grupos con alto riesgo de sufrir complicaciones en caso de padecer esta enfermedad, y también para las personas en contacto con estos grupos de alto riesgo (157). Estos grupos se detallan a continuación:

- 1- Personas con edad igual o superior a 65 años
- 2- Personas menores de 65 años que presenten alto riesgo de complicaciones derivadas de la gripe:
 - a. Niños/as (mayores de 6 meses) y adultos con enfermedades crónicas cardiovasculares (excluyendo hipertensión arterial aislada) o pulmonares, incluyendo displasia bronco-pulmonar, fibrosis quística y asma.
 - b. Niños/as (mayores de 6 meses) y adultos con:
 - i. Enfermedades metabólicas, incluida diabetes mellitus.
 - ii. Obesidad mórbida (índice de masa corporal ≥ 40 en adultos, ≥ 35 en adolescentes o ≥ 3 DS en la infancia).
 - iii. Insuficiencia renal.
 - iv. Hemoglobinopatías y anemias.
 - v. Asplenia.
 - vi. Enfermedad hepática crónica.
 - vii. Enfermedades neuromusculares graves.

- viii. Inmunosupresión, incluida la originada por la infección de VIH o por fármacos o en los receptores de trasplantes.
 - ix. Implante coclear o en espera del mismo.
 - x. Trastornos y enfermedades que conllevan disfunción cognitiva: síndrome de Down, demencias y otras.
 - c. Residentes en instituciones cerradas, de cualquier edad a partir de 6 meses, que padezcan procesos crónicos.
 - d. Niños/as y adolescentes, de 6 meses a 18 años, que reciben tratamiento prolongado con ácido acetil salicílico, por la posibilidad de desarrollar un síndrome de Reye tras la gripe.
 - e. Mujeres embarazadas en cualquier trimestre de gestación.
- 3- Personas que puedan transmitir la gripe a aquellas que tengan riesgo de sufrir complicaciones:
- a. 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.
 - b. 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.
 - c. Personas que proporcionen cuidados domiciliarios a pacientes de alto riesgo o ancianos.
 - d. Personas que conviven en el hogar, incluidos niños/as, con otras que pertenecen a algunos de los grupos de alto riesgo, por su condición clínica especial (anteriormente citadas).
- 4- Otros grupos:
- a. Personas que trabajan en servicios públicos esenciales, con especial énfasis en los siguientes subgrupos:
 - i. Fuerzas y cuerpos de seguridad del Estado, con dependencia nacional, autonómica o local.
 - ii. Bomberos
 - iii. Servicios de protección civil.
 - iv. Personas que trabajan en los servicios de emergencia sanitarias.
 - v. Trabajadores de instituciones penitenciarias y de otros centros de internamiento por resolución judicial.



- b. Personas que, por su ocupación, pueden estar en contacto con aves con sospecha o confirmación de infección por virus de gripe aviar altamente patogénico, especialmente:
 - i. 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 las áreas infectadas).
 - ii. las personas que viven y/o trabajan en granjas de aves donde se han notificado brotes, o se sospecha su existencia.

Las campañas de vacunación en España dependen de las Comunidades Autónomas y comienzan en su mayoría en la segunda quincena de Octubre, lo que permite disponer del tiempo necesario para realizar la correcta inmunización de la población de riesgo antes del comienzo de circulación de los virus de la gripe. En la campaña de vacunación frente a la gripe de la temporada 2015-2016 en Castilla y León se dispusieron de 640.000 dosis, de las que 340.000 fueron vacunas de alta dosis específicas para personas mayores de 70 años, 275.000 fueron unidades procedentes de cultivo celular destinada a la población entre 18 y 69 años, y 25.000 dosis específicas para menores de 18 años (Figura 16).



Figura 16. Cartel informativo del comienzo de la campaña de vacunación frente a la gripe de la temporada 2015-2016 en Castilla y León.

Evaluación de la eficacia y efectividad de la vacuna antigripal

La capacidad de las vacunas de la gripe en prevenir la aparición de la enfermedad ha sido evaluada en numerosos ensayos clínicos con diseños y poblaciones muy diferentes. Este tipo de ensayos se realizan atendiendo a dos parámetros, eficacia y efectividad.

La eficacia de la vacuna se estima en ensayos clínicos aleatorizados donde se evalúan los efectos sanitarios de la misma en situaciones controladas en condiciones óptimas e ideales, basándose en las ventajas que esta ofrece a los individuos que las reciben (158). En este tipo de estudios se suele administrar la vacuna antigripal a un grupo y un placebo u otra vacuna de actividad conocida a otro, comparándose el número de casos que suceden de la enfermedad dentro de un tiempo determinado. Sin embargo, una forma de realizar una somera aproximación epidemiológica a estos valores se realiza mediante la medición de los títulos de Acs inhibidores de la hemaglutinación (8). Como se ha comentado anteriormente, por lo general se acepta que un título de Acs hemaglutinantes igual a 1/40 proporciona una eficacia protectora del 50-70% en adultos sanos, por lo que dicho correlato serológico se utiliza en la evaluación del efecto de las vacunas (132,133). Este tipo de ensayos serológicos son además precisados por la EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) para la evaluación inicial de la actividad de la vacuna (159).

Por su parte, la efectividad puede estimarse mediante diversos tipos de estudios epidemiológicos: ensayos comunitarios aleatorizados, en los que se asigna aleatoriamente la vacuna objeto de estudio a un grupo como unidad de aleatorización y se compara la incidencia de la enfermedad en dicho grupo con la del otro grupo que no se ha vacunado; estudios de cohortes, tipo de estudio epidemiológico observacional en que se parte del antecedente de la vacunación en sujetos sanos vacunados (cohorte vacunada) y no vacunados (cohorte no vacunada), y se investiga la aparición de la enfermedad en ambos grupos; y estudios de casos y controles, también observacionales, en los cuales se seleccionan dos grupos, uno con presencia (casos) y otro con ausencia (controles) de la enfermedad que se desea prevenir, y se retrocede al pasado en busca de los antecedentes de vacunación en ambos grupos (158).

Lo habitual es que para cualquier intervención de salud pública la eficacia siempre sea mayor que la efectividad, por lo que el objetivo de cualquier política de salud pública es que esta pueda ser tan alta como la eficacia (158). Sin embargo, de forma general se acepta que los estudios que utilizan una definición serológica de protección frente a la gripe pueden



sobreestimar la eficacia de las vacunas (160), por lo que los valores de efectividad pueden resultar ciertamente similares a los de eficacia.

La eficacia de una formulación vacunal depende íntegramente de factores como el grado de similitud entre las cepas de gripe administradas y las circulantes (161), el tipo de vacuna administrada (viva atenuada, inactivada con o sin adyuvantes, etc.), y las características propias de cada grupo poblacional al que se administre (pertenencia a grupo de riesgo). Así pues, la vacuna inactivada en la prevención de la gripe A presenta niveles de protección de entre el 80 y el 100% en individuos adultos cuando existe una buena relación antigénica entre las cepas implicadas (162). Una buena eficacia vacunal en el grupo etario de adultos-jóvenes puede verse traducida en un menor absentismo laboral y escolar, además de la consiguiente reducción del coste derivado de la enfermedad. Por otra parte, no existen demasiados estudios que tengan como objetivo la evaluación de la eficacia vacunal en distintas poblaciones de riesgo, como por ejemplo la población mayor de 65 años o los pacientes con enfermedades autoinmunes, aunque en este primero existen trabajos que documentan solo un 58% de eficacia con algunas vacunas inactivadas (8).

Nuevas perspectivas en la vacunación antigripal

En la actualidad se está asistiendo a la aparición de nuevos tipos de vacunas de nueva generación frente a la gripe que utilizan tecnologías actuales en los campos de la biotecnología. Debido a los problemas que surgen de la utilización de huevos embrionados para la generación de las vacunas que actualmente se usan, estas nuevas tecnologías, junto con las anteriormente mencionadas de cultivo celular y recombinantes, se antojan imprescindibles para la futura protección de la población frente a la gripe.

Los principales problemas de la utilización de huevos embrionados derivan de la logística necesaria para el proceso. Debido al *timing* de creación de vacuna antes mencionado, la producción requiere que en escasamente siete meses la vacuna antigripal tenga que estar completamente manufacturada, analizada y distribuida desde la reunión en Febrero del *WHO Annual Influenza Meeting* (147). Debido a esto, el abastecimiento de huevos embrionados debe seguir la dinámica de trabajo de las empresas farmacéuticas encargadas la fabricación. Muchas veces en este proceso surgen desabastecimientos de lotes de huevos embrionados por varios motivos, como por ejemplo mortalidad elevada de los mismos o de las gallinas ponedoras por diversos motivos (como por ejemplo la aparición de un brote de virus de gripe aviar HPAI), mala calidad de los huevos (presencia de gran número de huevos sin fecundar),

etc., lo que puede suponer una debacle para la industria productora de vacunas (163). Por otro lado, los componentes de la vacuna manufacturados en huevos embrionados pueden conservar trazas de huevo en su composición, por lo que pueden generar reacciones alérgicas adversas en aquellos individuos afectados por este tipo de reacciones anafilácticas.

Los nuevos procesos en desarrollo mediante los cuales se puede fabricar vacuna frente a los virus de la gripe en un tiempo mucho menor, y de una forma mucho menos dependiente de factores externos como los anteriormente mencionados, se detallan a continuación (152):

1- Vacunas basadas en DNA:

Este tipo de vacunas no requieren la replicación de todo el virión en un soporte como los anteriormente mencionados, sino que utiliza solo determinadas partes del material genético del virus para provocar que las células humanas creen proteínas inmunógenas que puedan generar una respuesta inmune adaptativa compleja en el ser humano. La creación de este tipo de vacunas se realiza mediante la integración de un fragmento del gen requerido en un plásmido, el cual es directamente utilizado como vacuna que será administrada por inyección. Este tipo de vacunas se están ensayando para otros muchos patógenos además de para la gripe.

2- Vacunas con vectores microbianos:

Este tipo de vacunas usan genes de los virus de la gripe (como el gen HA) para ser insertados en otros virus diferentes denominados “vectores microbianos” (generalmente Alphavirus), por lo que expresan estas proteínas en su superficie siendo usados posteriormente como componentes de la vacuna. Este tipo de virus son capaces de infectar las células humanas pero sin causar enfermedad, generando una respuesta inmune completa sin ningún tipo de sintomatología y actuando de forma similar a una vacuna viva atenuada.

3- Vacunas de péptidos sintéticos:

Las vacunas de péptidos sintéticos se realizan químicamente sin necesitar soportes de cultivo en huevos o células. En este caso se sintetizan en el laboratorio porciones de proteínas inmunógenas de los virus capaces de generar una respuesta inmune completa. Debido a que el uso de péptidos de este tipo por sí mismo no genera una respuesta inmune muy elevada, es necesario el uso de adyuvantes u otros métodos de transporte de los péptidos a las células del sistema inmune para que estas puedan generar una respuesta.



4- Vacuna universal:

La vacuna universal frente a la gripe puede generar en teoría una protección completa frente a todos los subtipos y linajes de gripe que existen combinando los 16 tipos de hemaglutinina y los 9 tipos de neuraminidasa. Esta vacuna además no necesitaría la continua actualización que se realiza año tras año debido al continuo *drift* antigénico que sufren los virus epidémicos. Este tipo de vacunas utilizan como objetivos fragmentos muy conservados de ciertas proteínas del virus, como la HA, la proteína M2 o la proteína NP. En el año 2010 el centro de investigación de vacunas del NIAID creó una vacuna universal que fue capaz de crear Acs universales en modelos de ratón, hurón y mono. En concreto, esta vacuna estimuló una respuesta inmune frente al tallo de la proteína HA, una de las zonas más conservadas entre todos los subtipos de virus de la gripe, lo que supondría tener la capacidad de luchar y neutralizar todos estos tipos diferentes de cepas.

Sistema de redes centinela de vigilancia epidemiológica de la gripe

La vigilancia epidemiológica de la gripe se lleva realizando desde el año 1904 (80), cuando esta dolencia fue incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria. Posteriormente en España esta vigilancia es realizada por los tres Centros Nacionales de Gripe reconocidos por la OMS, Valladolid, Madrid y Barcelona, comenzando el primero de ellos su actividad en el año 1975. Este sistema está a su vez formado por redes centinela sanitarias dispuestas por Comunidades Autónomas, cuyo cometido es el conocimiento de la incidencia de la gripe en un tiempo breve, así como proporcionar datos sobre la edad, sexo y estado de vacunación de los pacientes afectados, así como la tipificación de los virus circulantes. Las Comunidades Autónomas con sistemas de redes centinela de vigilancia que aportan datos de vigilancia se describen en la Figura 17.

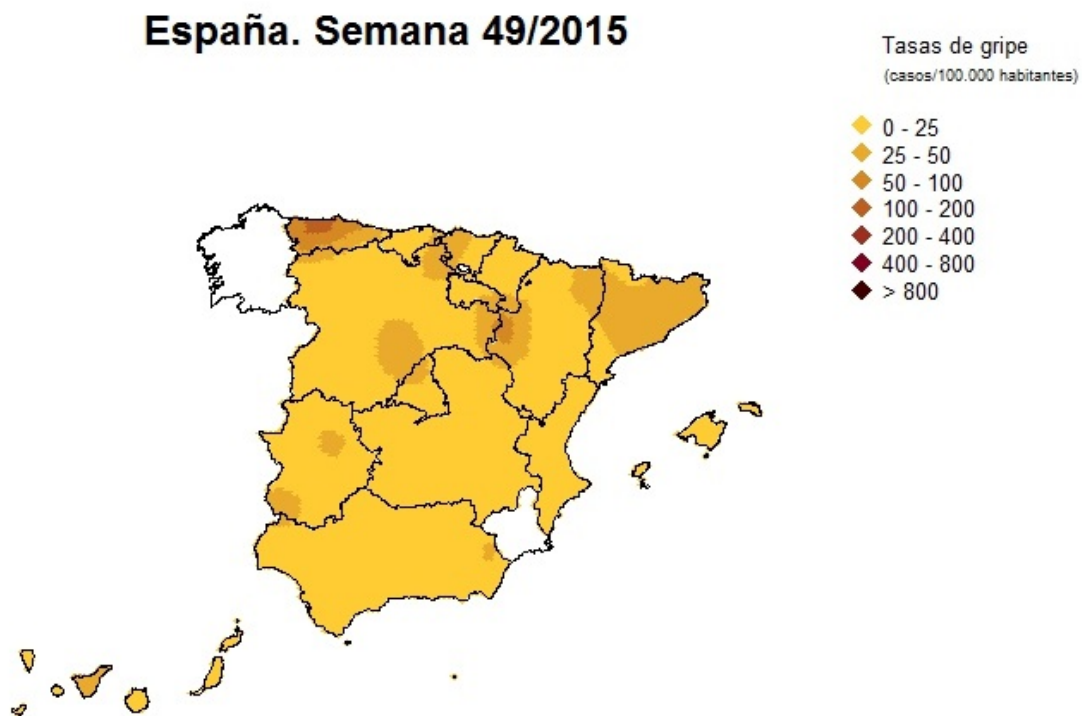


Figura 17. Gráfico de intensidad de la gripe durante la semana 49 del año 2015. Las comunidades autónomas no incluidas en el sistema de vigilancia están coloreadas en blanco.
Fuente: Centro Nacional de Epidemiología.

Esta vigilancia activa permite realizar una descripción fiable y representativa de la gripe con el objetivo de plantear la realización de actividades de prevención y control (8). De forma concreta, los objetivos de la vigilancia de la gripe son los siguientes (164):



1. Describir la evolución de la actividad gripal estacional o pandémica en España y sus CCAA por grupos de edad y tipos/subtipos/linajes de virus de la gripe.
2. Detectar el comienzo de la epidemia gripal.
3. Detectar y caracterizar los virus gripales que circulan en España cada temporada así como la aparición de nuevos subtipos de gripe A.
4. Determinar la susceptibilidad de las cepas circulantes a los fármacos antivirales.
5. Aislar virus de la gripe que puedan ser seleccionados por la OMS para la composición de la vacuna antigripal de la siguiente temporada gripal.
6. Determinar el grado de semejanza entre las cepas de gripe que están en circulación y las cepas que forman parte de la vacuna.
7. Caracterizar la gravedad de las epidemias/pandemias, e identificar los grupos de riesgo para la presentación de formas clínicamente graves de la enfermedad.
8. Proporcionar datos para conocer la carga de enfermedad de la gripe y su impacto en la población.
9. Contribuir al conocimiento de los factores relacionados con las epidemias de gripe y la historia natural de la enfermedad.
10. Participar en el intercambio de la información de vigilancia de gripe a nivel nacional y europeo.
11. Guiar a las autoridades locales y nacionales sanitarias en la formulación de las medidas orientadas a la prevención y el control de la gripe, incluidas las recomendaciones de vacunación antigripal.
12. Proporcionar información sobre la eficacia de la vacuna antigripal en las epidemias estacionales o pandémicas de gripe.
13. Contribuir a los planes nacionales de preparación y respuesta frente a una pandemia de gripe, a través de la vigilancia y la información proporcionada por otros estudios.

En el caso de Castilla y León, la vigilancia de la gripe se realiza a través del mencionado Centro Nacional de Gripe ubicado en Valladolid y la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León (RCSCyL). Este sistema tiene como objetivo la vigilancia e investigación epidemiológica de los casos producidos por los virus de la gripe utilizando para ellos una red activa de profesionales sanitarios del Sistema de Salud Castellano-leonés (165). Dicho sistema tiene su origen en la Red de Médicos Centinela que comenzó a funcionar en el año 1989 junto con el NIC de Valladolid en el contexto de un proyecto plurianual promovido por la Gerencia Regional de Salud de la Junta de Castilla y León denominado “Vigilancia epidemiológica de la gripe en la población Castellana y Leonesa” (8). Para la integración de la Red de Médicos Centinela se

seleccionan profesionales mediante un muestreo aleatorio simple que permita asegurar la representatividad de todos los perfiles de población. En esta Red se integran no solo médicos, pediatras y facultativos de atención primaria, sino que también participan en su control y gestión profesionales sanitarios y técnicos dependientes de la Dirección General de Salud Pública y Consumo, de los Servicios Territoriales de Sanidad y Bienestar Social y de la Gerencia Regional de Salud, así como también colaboradores externos que participen activamente de alguna u otra forma en la misma (8).

En la vigilancia epidemiológica de la gripe se han dispuesto tradicionalmente dos periodos claramente diferenciados en función de las características de circulación de estos virus:

1. Periodo de vigilancia epidemiológica de la gripe:

Se realiza desde la semana 40 de un año hasta la semana 20 del siguiente.

2. Periodo de No Vigilancia epidemiológica de la gripe:

Se realiza entre las semanas 21 y 39 de un mismo año, entre las cuales no se suelen diagnosticar casos de gripe o son muy esporádicos. Este periodo se suele denominar también como periodo inter-epidémico.

La información generada por el NIC de Valladolid y la RCSCyL cada semana es remitida a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Instituto de Salud Carlos III con el objetivo de elaborar los informes epidemiológicos semanales sobre la gripe. En estos informes se exponen los siguientes puntos (166):

1. Información general acerca de los sistemas centinela
2. Datos de vigilancia virológica
3. Información sobre brotes de gripe
4. Vigilancia de casos graves diagnosticados
5. Mortalidad relacionada con la gripe
6. Vigilancia internacional de la gripe

Al finalizar cada temporada de gripe, la Red Nacional de Vigilancia elabora un informe anual con toda la información disponible siguiendo los puntos anteriormente expuestos (167). A su vez, la RCSCyL elabora sus propios informes epidemiológicos que pueden ser consultados a través del sistema PVIG (Programa de Vigilancia de la Gripe), aportando información específica sobre número de casos, tasas de incidencia, información y datos virológicos, tasa de



aislamientos, número de casos y tasa de incidencia acumulada segregada por edad (168). Tanto en los informes nacionales como a nivel de comunidad autónoma, la remisión de información se realiza semanalmente en periodo de vigilancia epidemiológica de la gripe y de forma bi-mensual en periodo inter-epidémico.

A nivel global, toda la información epidemiológica de la gripe de todo el mundo es cargada semanalmente en la plataforma *FluNet*. Esta plataforma recoge información acerca del número de virus detectados indicando los tipos y subtipos circulantes mayoritarios, el niveles de dispersión de los mismos, etc., de manera que la información pueda ser leída en tiempo real con una cadencia semanal. La información referida en esta página web de libre acceso es suministrada por los NICs, englobados dentro del GISRS (Global Influenza Surveillance and Response System).

The WHO Global Influenza Surveillance Network

La Red Global de la OMS para la vigilancia de la gripe (The WHO Global Influenza Surveillance Network) fue creada en 1952. Esta red está formada por 4 centros colaboradores de la OMS (WHO CCs) y 142 centros o instituciones en 113 países reconocidos como Centros Nacionales de Gripe (NICs) (146) (Figura 18).

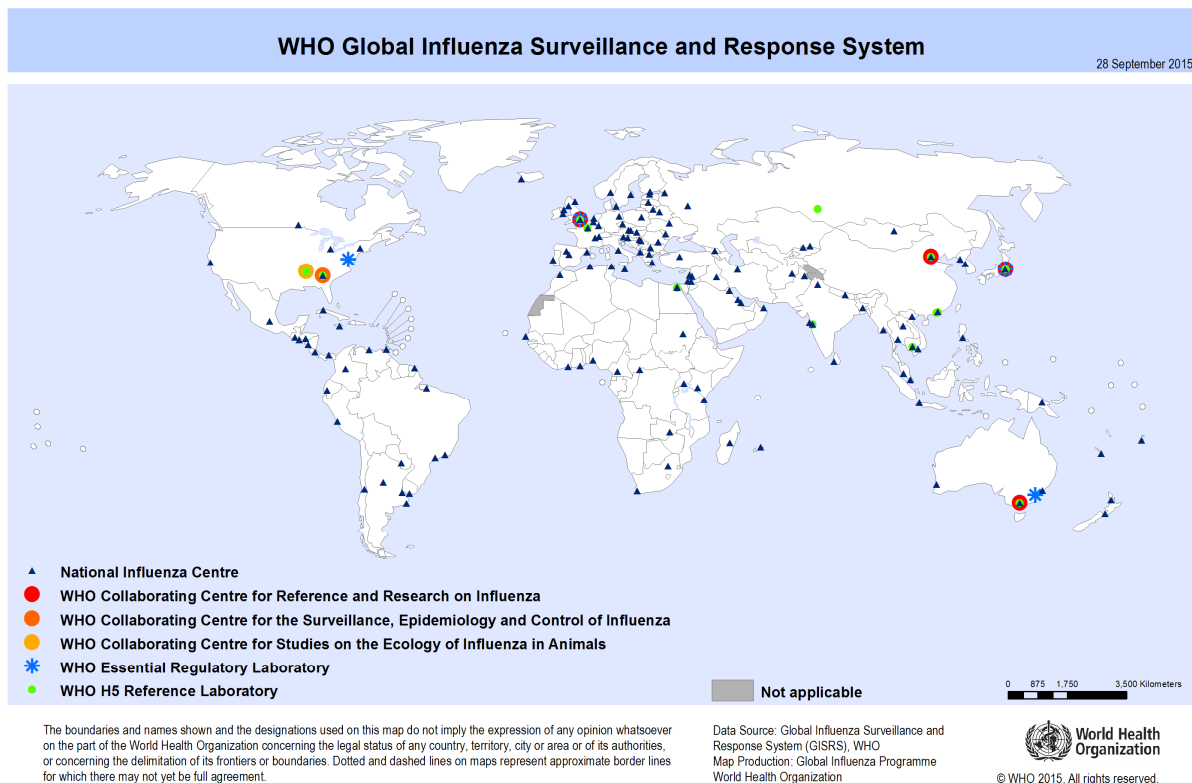


Figura 18. Red de laboratorios pertenecientes a la Red Global de la OMS para la vigilancia de la gripe. Fuente: OMS.

El objetivo de esta red de laboratorios es la vigilancia epidemiológica de los virus de la gripe con el fin de reducir la morbilidad y las muertes producidas por las epidemias, así como estar preparados frente a una eventual pandemia con programas específicos de la OMS como el *PIP Framework* (Pandemic Influenza Preparedness Framework)(169,170). Las labores u objetivos de los NICs se describen a continuación (171):

1. Detección directa de virus de la gripe A y B usando técnicas moleculares.
2. Cultivo de virus de la gripe.



3. Determinación de tipos y subtipos de virus de la gripe epidémicos, así como de los subtipos A/H5 y otras variantes zoonóticas, usando técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.
4. Caracterización antigénica.
5. Caracterización genética.
6. Almacenamiento de especímenes y aislamientos virales.
7. Remisión de aislamiento virales y/o muestras clínicas a los centro referencia colaboradores de la OMS.
8. Monitorización de susceptibilidad a antivirales.
9. Participación en ejercicios de calidad externos.
10. Reporte electrónico de datos epidemiológicos y virológicos nacionales e internacionales.

Además del claro objetivo en la vigilancia epidemiológica de la gripe, el resultado de todas estas actividades forma la base para las recomendaciones de la OMS sobre la composición de la vacuna antigripal en los hemisferios Norte y Sur cada año.

Flujo de trabajo en los Centros Nacionales de Gripe

El flujo de trabajo de los NICs comienza con la recepción de muestras respiratorias procedentes de casos con sospecha clínica de infección por virus de la gripe, ya sean de procedencia ambulatoria o muestras de origen hospitalario. Estas muestras, independientemente de su origen, son analizadas mediante diversos sistemas de identificación de ácidos nucleicos con el objetivo de tipar y subtipar molecularmente los virus de la gripe presentes en ellas. El flujo de trabajo interno del Centro Nacional de Gripe de Valladolid registrado en el PNT 1.1 de este centro se describe en la Figura 19.

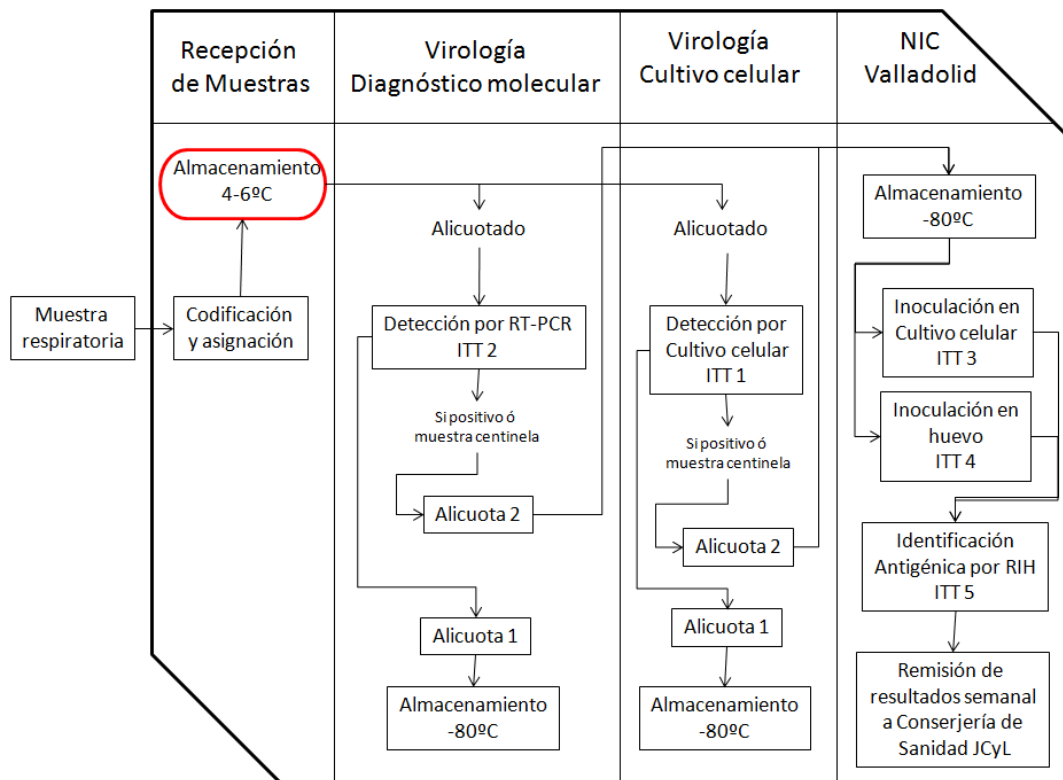


Figura 19. Flujo de trabajo del NIC de Valladolid ante la llegada de muestras respiratorias con sospecha clínica de infección por virus de la gripe. Fuente: PNT 1.1 Recepción, transporte y derivación de muestras respiratorias, NIC Valladolid.

Posteriormente a la identificación molecular se realiza un cultivo de estos virus en distintos soportes, como células MDCK y MDCK-Siat1 y huevos embrionados de gallina con el fin de comprobar la viabilidad de los mismos. Este proceso además permite propagar el virus para aumentar la carga viral con el fin de realizar una posterior caracterización antigénica, mediante la cual utilizando antisueros fabricados en hurón u oveja frente a las diferentes cepas existentes se puede identificar a nivel de cepa o incluso de subclado a través de ensayos de inhibición de hemaglutinación.

En algunos NICs se realiza además caracterización genética mediante diversas técnicas de secuenciación tipo Sanger y secuenciación masiva. Habitualmente en la actualidad aún se siguen utilizando sistemas que utilizan tecnología de secuenciación tipo Sanger, por lo que los genes de las proteínas HA y NA son los más frecuentemente secuenciados. Sin embargo, debido a la reducción constante del coste de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva los laboratorios frecuentemente secuencian el genoma completo del virus, lo que ofrece una información mucho más completa sobre mutaciones relacionadas con factores de virulencia o con resistencia a fármacos antivirales. Por otra parte, la monitorización de susceptibilidad

fenotípica a fármacos antivirales se realiza también de forma común en ciertos NICs mediante inmunoensayos.

Toda la información generada a través de este flujo de trabajo durante los periodos epidémicos e inter-epidémicos es remitida a cuatro grandes centros colaboradores de la OMS, los cuales integraran la misma para ofrecer semanal y anualmente reportes sobre la situación epidémica local y global. Por otra parte, los NICs remiten anualmente al menos dos envíos a estos Centros colaboradores (*Francis Crick Institute, Mill Hill, Londres*, en el caso del NIC de Valladolid) con muestras respiratorias positivas para gripe obtenidas entre los meses de Octubre a Diciembre (ondas precursoras) y en los meses de Enero y Febrero (pico epidémico), entre las que se incluye una muestra representativa de los aislamiento virales obtenidos, así como de las muestras con características especiales por su gravedad o por la imposibilidad de ser subtipadas. Este algoritmo de trabajo está expuesto en la Figura 20 (172). Los Centros Colaboradores de la OMS elaboran posteriormente un informe con información sobre dichas cepas, donde se evalúa la capacidad de crecimiento en cultivo, la susceptibilidad a fármacos antivirales y el análisis filogenético donde se integra la información con la procedente de otros países del entorno.

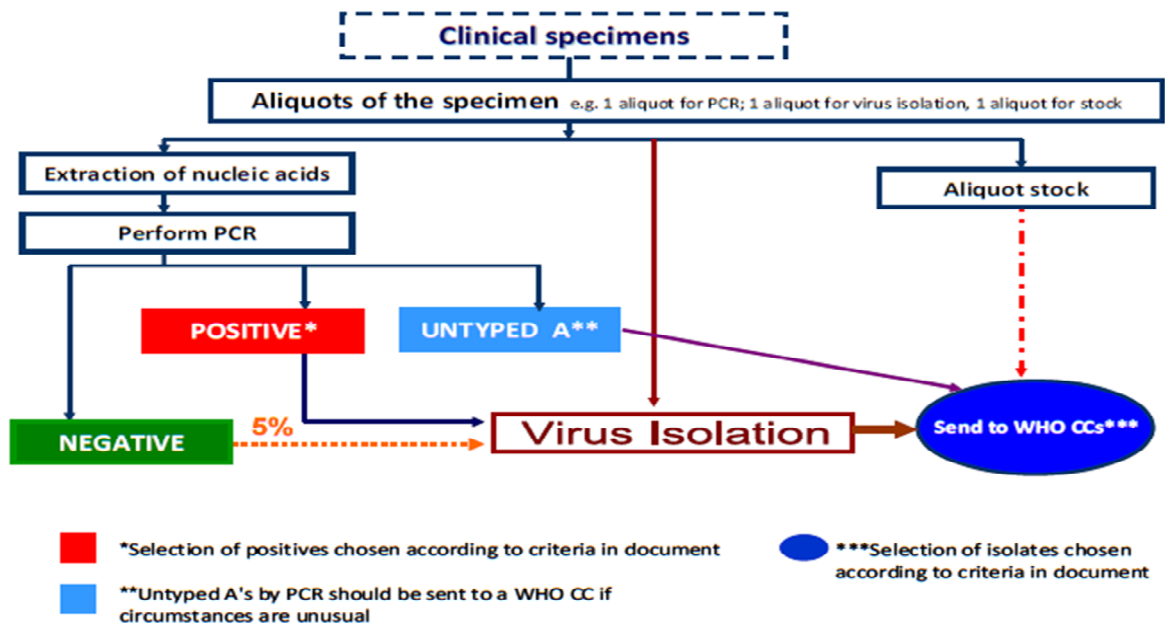


Figura 20. Algoritmo de trabajo para la selección y envío de muestras respiratorias por parte de los NICs a los Centros colaboradores de la OMS. Fuente: OMS.

La información obtenida a través del estudio de estas cepas, además de la recopilada del trabajo propio de cada NIC, es utilizada por la OMS para elaborar las recomendaciones de cepas que deben ser incluidas en la formulación de la vacuna estacional antigripal que se realiza cada año. Posteriormente a este flujo de trabajo, en cada NIC se almacena un número representativo de muestras para su utilización en futuras investigaciones científicas o para continuar con la vigilancia epidemiológica.

Monitorización de la eficacia vacunal

Una de las labores que no están contempladas dentro de las actividades a realizar como NIC previamente descritas (171), pero que si está integrada dentro de algunos de estos laboratorios, es la monitorización de la eficacia vacunal a través del estudio de la presencia de Acs inhibidores de la hemaglutinación. Como se ha comentado anteriormente, las espículas de HA presentes en la superficie de los virus de la gripe tienen como propiedad la capacidad de aglutinar los eritrocitos de diversas especies animales (9,10). Este efecto puede permitir la realización de ensayos serológicos en los que se pueda observar y contabilizar la presencia de Acs capaces de neutralizar la HA de distintos virus de la gripe antes y después de la vacunación. Gracias a esto, este tipo de estudios permite estudiar los siguientes parámetros:

1. Nivel de Acs hemaglutinantes pre-vacunales:

El nivel de Acs previos a una vacunación permite conocer si una cepa de gripe ha circulado o estado en contacto de forma natural con un individuo, ya sea por infección o por haber sido vacunado este individuo con un subtipo de gripe concreto anteriormente. Este valor es muy relevante en estudios serológicos que determinan el la inmunización y el contacto de una población frente a una cepa zoonótica de la que no se tiene constancia haya circulado entre la población humana, como por ejemplo los virus aviares. Por otra parte, también ofrece mucha información acerca de los fenómenos de inmunidad cruzada o heterotípica entre cepas filogenéticamente próximas, o simplemente como indicador de la protección de una población frente a un determinado subtipo de gripe.

2. Nivel de Acs hemaglutinantes post-vacunales:

Comparando el título de estos Acs post-vacunales con el de los Acs pre-vacunales se puede conocer si la vacuna ha inducido algún tipo de respuesta humoral en un individuo, si la vacuna ha protegido a esta persona (obtención de títulos protectores en individuos previamente no protegidos) y cuál es el nivel de protección obtenido tras

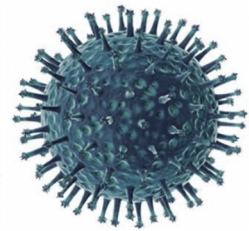


la vacunación (aumento de la Media geométrica de los títulos). Este parámetro permite comparar el efecto de una misma vacuna entre distintos grupos poblacionales con características diferentes o entre los diferentes virus dentro de un mismo grupo.

Estos parámetros sirven a la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para evaluar si una vacuna ha sido eficaz o no frente a un subtipo de gripe en una población concreta (159), lo que ofrece una información muy relevante para conocer si la elección de cepas para la formulación vacunal en cada año ha sido la correcta, así como para comprender ciertos parámetros de la inmunidad en distintas poblaciones.

El NIC de Valladolid realiza anualmente el análisis de la presencia de Acs hemaglutinantes en sueros pre y post-vacunales de población de distintas edades de Castilla y León, mediante un muestreo aleatorio idéntico al anteriormente descrito de obtención de muestras respiratorias de la RCSCyL. Este estudio plurianual, incluido en el anteriormente mencionado proyecto denominado “Vigilancia epidemiológica de la gripe en la población Castellano-Leonesa”, se lleva realizando en este centro desde el año 1986.

OBJETIVOS



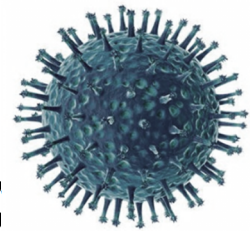
Objetivo principal

Describir la respuesta inmune humoral a la vacunación de gripe frente a las cepas anticipadas por la OMS y su efecto sobre la respuesta heterotípica

Objetivos secundarios

- 1- Describir la presencia de Acs hemaglutinantes previos a la vacunación frente a virus de gripe A y B estacionales, cepas de gripe A/H1N1 antiguas y virus de gripe aviar en la población mayor de 65 años.
- 2- Evaluar la respuesta humoral de la población mayor de 65 años tras la administración de la vacuna trivalente anual de las temporadas incluidas en el estudio frente a los virus de gripe A y B estacionales, cepas A/H1N1 antiguas y virus de gripe aviar.
- 3- Evaluar la eficacia de la respuesta humoral homóloga y heteróloga tras la administración de la vacuna trivalente anual frente a los virus de gripe A y B estacionales, cepas A/H1N1 antiguas y virus de gripe aviar en la población mayor de 65 años siguiendo los criterios establecidos por la EMA.
- 4- Analizar las diferencias en la respuesta inmune humoral frente a los virus de gripe A y B estacionales, cepas A/H1N1 antiguas y virus de gripe aviar en la población de individuos mayores de 65 años tras la administración de la vacuna trivalente anual en función de la edad, sexo y tipo de vacuna.
- 5- Describir la presencia de Acs hemaglutinantes previos a la vacunación frente a virus de gripe A y B estacionales en la población de individuos con enfermedades autoinmunes.
- 6- Evaluar la respuesta humoral frente a los virus de gripe A y B estacionales de la población de individuos con enfermedades autoinmunes tras la administración de la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09.
- 7- Evaluar la eficacia en la respuesta humoral homóloga y heteróloga de la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 frente a los virus de gripe A y B estacionales en la población de individuos con enfermedades autoinmunes siguiendo los criterios establecidos por la EMA.
- 8- Analizar las diferencias en la respuesta inmune humoral frente a virus de la gripe A y B de la población con enfermedades autoinmunes tras la administración de la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 en función de la edad y el sexo.

MATERIAL Y MÉTODOS





Material y métodos

Diseño del estudio

Se diseñó un estudio retrospectivo observacional y descriptivo en el que se realizó una encuesta seroepidemiológica en dos grupos diferentes de individuos, una población mayor de 65 años y otra de individuos con enfermedades autoinmunes, frente a distintos virus de la gripe A y B.

La encuesta seroepidemiológica realizada consistió en la evaluación de la presencia de Acs hemaglutinantes (HAs) capaces de reconocer distintos subtipos y linajes de gripe A y B estacionales que circulan o han circulado en España en los grupos de población seleccionados. Se evaluó también la respuesta a la vacuna trivalente anual sobre la producción de Acs HAs en la población ≥ 65 años, y de la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 en los enfermos autoinmunes. Esta encuesta seroepidemiológica fue realizada también frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas en la población de individuos ≥ 65 años, así como frente a subtipos de gripe aviar con potencial pandémico que no circulan de forma continua en la población humana (subtipos de transmisión zoonóticas), y que nunca han sido detectados en población humana en nuestro país. Para realizar este estudio, se obtuvieron muestras de suero previas y posteriores a la vacunación. El objetivo fue por un lado comprobar la inmunidad de estas poblaciones analizadas frente a los virus de gripe seleccionados, y por otro lado comprobar el efecto de la vacunación sobre la generación de Acs HAs frente a estos virus atendiendo a las características demográficas de cada grupo poblacional estudiado.

El estudio se centró en conocer la presencia de Acs HAs frente a distintos virus de la gripe y las diferencias en la respuesta inmune humoral en el contexto de dos condiciones muy relevantes para el sistema inmunitario, la inmunosenescencia del individuo (población mayor de 65 años), y la presencia de enfermedades que afecten el correcto funcionamiento del mismo, como las enfermedades autoinmunes. Los resultados fueron analizados en función de las características demográficas de los individuos.



Material

Grupo de individuos mayores de 65 años

- **Procedencia:**

Las muestras serológicas del grupo de población mayor de 65 años fueron obtenidas gracias a la labor que desempeña el Centro Nacional de Gripe de Valladolid como centro internacional colaborador de la OMS, el cual trabaja activamente en la vigilancia epidemiológica y en el apoyo para el desarrollo de la vacuna trivalente anual antigripal de cada temporada. Esta recogida de muestras se encuentra dentro del proyecto plurianual de la Gerencia Regional de Salud de la Junta de Castilla y León denominado "Vigilancia seroepidemiológica de la gripe en la población Castellana y Leonesa". Gracias a este proyecto, la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León (RCSCyL) recoge muestras de suero previas y posteriores a la vacunación frente a la gripe de individuos que acuden a los centros de salud de la comunidad autónoma de Castilla y León. Esta red es un sistema específico de información orientado a la vigilancia epidemiológica y de la salud que requiere la colaboración voluntaria y activa de distintos profesionales (173). Este sistema consta de 30 médicos centinela distribuidos por toda Castilla y León siguiendo criterios de representatividad poblacional, que realizan un muestreo simple aleatorio que asegura la representatividad de toda la población de la comunidad autónoma, tanto en la remisión de frotis faríngeos para la vigilancia de las epidemias de gripe, como en la remisión de los sueros para la vigilancia de la eficacia vacunal. Las muestras son enviadas anualmente al Centro Nacional de Gripe de Valladolid donde son analizadas.

- **Ámbito de estudio:**

Se eligieron cuatro cohortes de individuos de diferentes campañas vacunales, dos de ellas previas a la aparición del subtipo de gripe pandémica A/H1N1pdm09 en 2009 (temporadas 2006-2007 y 2008-2009), y dos posteriores a este evento (temporadas 2009-2010 y 2010-2011). La elección del periodo de estudio se realizó atendiendo a la aparición de este nuevo subtipo de gripe, ofreciendo una buena oportunidad de conocer el nivel de Acs HAs y la respuesta a la vacunación previa y posteriormente a la aparición de este nuevo virus. Además permitió conocer cómo afecta a la inmunidad de la población la aparición de un nuevo virus de la gripe de estas características y la presencia de Acs previos a su circulación entre la población mayor de 65 años. Se desestimó incluir las muestras de suero de la temporada 2007-



2008 debido a deficiencias en su conservación, que podrían haber repercutido negativamente en la valoración e interpretación de los datos obtenidos.

- ***Criterios de inclusión:***

Se incluyeron aquellos individuos mayores de 65 años de las campañas vacunales de las temporadas anteriormente mencionadas que tuvieran una muestra de suero pre y post vacunal extraídas con al menos 28 días de diferencia entre ambas tomas, tomando como día del suero pre-vacunal el día de inoculación de la vacuna. Se estimó que un periodo de 28 días entre la inoculación y la extracción del suero post-vacunal aseguró una respuesta inmune humoral completa frente a los antígenos presentes en las vacunas administradas.

- ***Criterios de exclusión:***

Se excluyeron aquellos individuos con muestras de suero no pareadas, que no cumplieran el criterio de edad, de tiempo de exposición a la vacuna, y aquellos en los que la recogida de datos hubiera sido deficiente en alguno de los campos relevantes para el estudio como el sexo, edad, fechas de extracción de suero y/o tipo de vacuna utilizada (adyuvada o fraccionada).

Finalmente se incluyeron un total de 174 individuos, 45 en la cohorte de la temporada 2006-2007 y 43 en cada una de las cohortes de las temporadas 2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011.

- ***Recogida y almacenamiento de muestras:***

Las muestras de sueros pre y post-vacunales de cada cohorte fueron extraídas en las campañas vacunales anteriormente mencionadas por el grupo de médicos centinelas de la RCSCyL. Las muestras sanguíneas fueron extraídas en un tubo para separación de sueros Vacutainer de 8,5 ml, y posteriormente remitidas al NIC de Valladolid. En este centro se realizó una centrifugación de cada tubo a 3.500 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante (suero) en un tubo con su correspondiente etiquetado, donde se incluyó la información referente a la campaña vacunal en la que se recogió y un número correlativo según el orden de llegada. Las muestras de suero fueron almacenadas en el NIC en cajas para tubos de 96 posiciones dentro de congeladores de -20°C hasta su uso. A la llegada de estas muestras al centro, la información clínica y demográfica remitida por el médico centinela fue incluida en una base de datos para la identificación de los sueros.



- **Recogida de datos clínicos:**

La recogida de los datos clínicos de los individuos incluidos en el estudio la realizaron los médicos centinelas de la RCSCyL, utilizando el formulario dispuesto para tal fin distribuido por la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León (Figura 21). En estos formularios se recogió el nombre y apellidos del paciente, edad, sexo, fecha de extracción de los sueros pre y post-vacunales, fecha de inoculación de la vacuna y el tipo de vacuna utilizada.

Logo: Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad, Dirección General de Salud Pública

ANEXO III

PROGRAMA DE VIGILANCIA INTEGRADA DE LA GRIPE
RED CENTINELA SANITARIA DE CASTILLA Y LEÓN

FICHA DE REMISIÓN DE SUEROS PREVACUNALES Y POSTVACUNABLES
2013-2014

ETIQUETA

Qué se debe recoger:
*5 prevacunales
*5 postvacunales, 4 semanas después de la vacunación.

IDENTIFICACIÓN:
Apellidos: _____ Nombre: _____
Edad: ____ Sexo: ____

EXTRACCIÓN:

| | | |
|--|-----------------|--------------------------------------|
| 1. <input type="checkbox"/> <u>Prevacunal</u> | Fecha: __/__/__ | Número código de barras (o etiqueta) |
| 2. <input type="checkbox"/> <u>Postvacunal</u> | Fecha: __/__/__ | Número código de barras (o etiqueta) |

POBLACIÓN DE RIESGO:

- 1. Sano
- 2. Embarazada
- 2. Patología de riesgo
- 3. Otros: especificar _____

VACUNACIÓN:
Fecha: ____/____/____
Vacuna: _____ Lote: _____

Figura 21. Formulario de recogida de los sueros pre y post-vacunales del programa de vigilancia epidemiológica de la RCSCyL.

- **Vacunas administradas a la población mayor de 65 años:**

Los tipos de vacunas, medio de inoculación y el número de individuos de la población ≥ 65 años vacunados cada tipo de vacuna se describen en la Tabla 3:



| Tipo de vacuna | Nombre comercial | Casa Comercial | Tipo de inoculación | Sujetos vacunados |
|----------------|------------------|----------------|---------------------|-------------------|
| Adyuvadas | Chiromas | Novartis | IM* | 71 |
| Fraccionadas | Fluarix | GSK | IM | 86 |
| | Focetria | Novartis | IM | 16 |
| | Gripavac | Sanofi Pasteur | IM/SP** | 1 |

*IM-Intramuscular

**SP-Subcutanea profunda

Tabla 3. Tipos de vacuna trivalente anual utilizadas, tipo de inoculación y número de sujetos vacunados con cada tipo devacuna en la población ≥ 65 años.

Debido a la actualización en cada temporada de gripe de las cepas que se incluyen en las vacunas trivalentes anuales administradas a la población, la formulación de las vacunas administradas a los individuos mayores de 65 años fue diferente en cada temporada incluida en el estudio. En la Tabla 4 se recogen las cepas utilizadas en la formulación de las vacunas trivalentes anuales administradas a la población ≥ 65 años en las cohortes de las temporadas incluidas en el estudio.

| Tipo | Subtipo | Camapaña vacunal | | | |
|------|-----------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| | | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| A | H1N1 | A/New Caledonia/20/99 | A/Brisbane/59/2007 | A/Brisbane/59/2007 | No incluido |
| | H3N2 | A/Wisconsin/67/2005 | A/Brisbane/10/2007 | A/Brisbane/10/2007 | A/Victoria/201/2009 |
| | H1N1pdm09 | No incluido | No incluido | No incluido | A/California/07/2009 |
| B | Yamagata | No incluido | B/Florida/4/2006 | No incluido | No incluido |
| | Victoria | B/Malaysia/2506/2004 | No incluido | B/Brisbane/60/2008 | B/Brisbane/60/2008 |

Tabla 4. Cepas de gripe A y B incluidas en las vacunas trivalentes anuales administradas a cada cohorte de población ≥ 65 años en las temporadas 2006-07, 2008-09, 2009-10 y 2010-11.

Grupo de individuos con enfermedades autoinmunes

- *Procedencia:*

Las muestras de suero pre y post-vacunales de los individuos con enfermedades autoinmunes fueron obtenidas en el Hospital Universitari Mútua Terrassa (Terrassa – Barcelona) y remitidas al NIC de Valladolid para su uso en este estudio.

- *Ámbito de estudio:*

El estudio fue realizado en pacientes con enfermedades autoinmunes que fueron vacunados con vacuna monovalente *Pandemrix* frente a la cepa A/California/7/2009 (subtipo A/H1N1pdm09). Los pacientes incluidos en este estudio fueron reclutados durante la segunda



onda pandémica del año 2009 (desde la semana 47 del 2009 hasta la semana 4 de 2010) en plena circulación pandémica del subtipo A/H1N1pdm09.

- ***Criterios de inclusión:***

En este estudio se incluyeron aquellos individuos varones y mujeres de más de 18 años de edad, vacunados con vacuna antigripal monovalente frente al subtipo de gripe A/H1N1pdm09, y afectados por alguna de las siguientes enfermedades autoinmunes:

- LES (Lupus eritematoso sistémico)
- SAF (Síndrome antifosfolípídico)
- Síndrome de Sjögren
- AR (Artritis reumatoide)
- Vasculitis sistémica
- Síndrome Overlap
- Dermatomiositis
- Enfermedad mixta del tejido conectivo
- Síndrome de Behçet
- Polimiositis
- Esclerodermia

- ***Criterios de exclusión:***

Se excluyeron aquellos pacientes en los que no se obtuvo una muestra de suero pre y post vacunal (muestra pareada) y aquellos en los que no se obtuvo la información completa referente al sexo, edad, fechas de inoculación de la vacuna o de la extracción de ambos sueros.

Atendiendo a estos criterios, se seleccionaron para el estudio un total de 48 individuos.

- ***Grupo de controles sanos:***

Se incluyeron un total de 47 individuos sanos vacunados con vacuna antigripal monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09, de los que se extrajo de igual modo que en los enfermos un suero pre vacunal y otro post vacunal. Las muestras de suero de la población control fueron también extraídas en el Hospital Universitari Mútua Terrassa. En ninguno de los integrantes del grupo control se identificaron signos clínicos relevantes relacionados con algún tipo de enfermedad autoinmune.



- **Recogida y almacenamiento de muestras:**

Las muestras de suero de los individuos enfermos autoinmunes y de los controles sanos fueron obtenidas por el personal médico del Hospital Universitari Mútua Terrassa mediante punción intravenosa en tubo para separación de sueros Vacutainer de 8,5 ml. Estos tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 3.500 r.p.m., y el sobrenadante fue almacenado y etiquetado en un nuevo tubo. Las muestras de suero fueron enviadas al NIC de Valladolid donde fueron almacenadas a -20°C hasta la realización del estudio.

- **Recogida de datos clínicos:**

Los datos clínicos y demográficos de los individuos con enfermedades autoinmunes y de los individuos sanos fueron recogidos en el Hospital Universitari Mútua Terrassa e integrados en una base de datos que fue posteriormente remitida al NIC de Valladolid para su utilización en este trabajo. La información obtenida de los individuos se detalla a continuación:

- Edad
- Sexo
- Fecha de extracción del suero pre-vacunal
- Fecha de extracción del suero post-vacunal
- Tipo de enfermedad autoinmune en la población de enfermos

- **Vacunas utilizadas:**

En los pacientes con enfermedades autoinmunes y en los controles sanos se administró vacuna monovalente antigripal (*Pandemrix-GSK*) en cuya formulación únicamente se encontraba la cepa A/California/07/2009 del subtipo A/H1N1pdm09.

Comité de ética – Consentimiento informado

En el aspecto científico y ético, los protocolos del estudio y de recogida de las muestras de este trabajo obtuvieron aprobación del Comité de Ética de la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León (individuos mayores de 65 años) y del Hospital Universitari Mútua Terrassa (individuos con enfermedades autoinmunes y controles sanos). Los formularios de consentimiento informado están dispuestos como Anexo I y Anexo II en el apartado de Anexos.



Métodos

Análisis serológicos

El análisis serológico de los individuos mayores de 65 años y de los enfermos autoinmunes y controles sanos realizó mediante reacción de inhibición de hemaglutinación (RIH). Esta técnica se basa en la capacidad que posee la proteína hemaglutinina (HA) de los virus de la gripe en unirse específicamente a los receptores de superficie de los eritrocitos de diferentes especies animales. La RIH es la prueba recomendada por la OMS para la determinación de las características antigénicas de los virus de la gripe en el Programa Mundial de Vigilancia de Gripe (174).

- Cepas de gripe y antisueros utilizados en el estudio:

En este estudio se han utilizado 14 cepas de 8 subtipos diferentes de virus de la gripe, de las cuales 9 fueron de virus de gripe A y B estacionales, 2 cepas de virus de la gripe A/H1N1 que circularon en la década de 1940, y 3 cepas de subtipos de gripe aviar aisladas de hospedadores humanos.

Las cepas de gripe A y B estacionales utilizadas en el estudio procedieron de los reactivos de identificación distribuidos por la OMS a sus NICs (*WHO Influenza Reagent Kit for Identification of Influenza Isolates*) en las campañas vacunales de las temporadas 2006-2007, 2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011 (Figura 22). Estas cepas proceden de cultivos celulares o cultivo en embrión de pollo, y son inactivadas mediante el uso de β -propiolactona (BPL) para su utilización en laboratorios con instalaciones de bioseguridad de tipo II (BSL-II). Los antígenos de las cepas de los subtipos A/H1N1, y A/H3N2 fueron utilizados en su formato crudo, mientras que en el caso de las cepas de los linajes B/Yamagata y B/Victoria fueron utilizados en su formulación extraída mediante éter para optimizar los resultados obtenidos. En el caso de la cepa A/California/7/2009 del subtipo A/H1N1pdm09 se utilizó antígeno procedente de Bulk de vacuna cedido por la empresa GSK.

Las cepas A/Weiss/43 y A/FM/1/47 que circularon en la década de 1940 procedentes del subtipo pandémico A/H1N1 de 1918 fueron cedidas por el Centro Europeo de gripe colaborador de la OMS *Francis Crick Institute*, ubicado en *Mill Hill*, Londres. Estas cepas fueron cultivadas en embrión de pollo en el NIC de Valladolid para la obtención de carga viral



suficiente para los experimentos, y posteriormente almacenadas a -80°C en alícuotas hasta su uso. Estas cepas no fueron inactivadas por ningún método previamente a su utilización.



Figura 22. Equipo de reactivos de la OMS (*WHO Influenza Reagent Kit for Identification of Influenza Isolates*) para la caracterización antigénica de virus de la gripe y estudio de presencia de Acs.

Las cepas de virus de la gripe aviar A/Vietnam/1194/2004 (subtipo A/H5N1), A/Mallard/Netherlands/12/2000 (subtipo A/H7N3), y A/HongKong/1074/1997 (subtipo A/H9N2), fueron adquiridas a través del NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*). Dichas cepas procedieron de virus cuyo hospedador es el ser humano, que fueron cultivados en embrión de pollo, inactivados y parcialmente purificados. Debido a que estas cepas fueron inactivadas por la casa comercial, fueron utilizadas en condiciones de seguridad BSL-II.

- ***Propagación de virus en cultivo en embrión de pollo:***

Con el fin de obtener suficiente carga viral de las cepas de gripe A/Weiss/43 y A/FM/1/47 para su uso en las pruebas serológicas, se realizó un cultivo de ambas cepas utilizando huevos embrionados de gallina de 7-9 días de incubación. A su llegada, se eliminaron aquellos huevos en los que no se detectó presencia de embrión y aquellos en los que el embrión no presentaba movimiento, o aquellos en las que no se observaron ramificaciones artero-venosas como indicadoras de la viabilidad del embrión. Los huevos vivos fueron posteriormente lavados con solución yodada diluida al 10% para evitar contaminaciones derivadas del proceso de inoculación. Se realizaron sendos agujeros en la cavidad alantoidea y en la cámara de aire de cada huevo embrionado con el fin de igualar presiones, inyectándose posteriormente 0,2 ml del virus en la cavidad alantoidea por punción



directa con aguja hipodérmica, sellando posteriormente los orificios de inoculación con parafina para mantener las condiciones asépticas del cultivo (Figura 23). Los huevos inoculados fueron incubados en rotación continua a 35°C y 70% de humedad durante 3 días hasta realizar la recogida o *harvesting* de los líquidos amnióticos (LAM) y alantoideos (LAL).

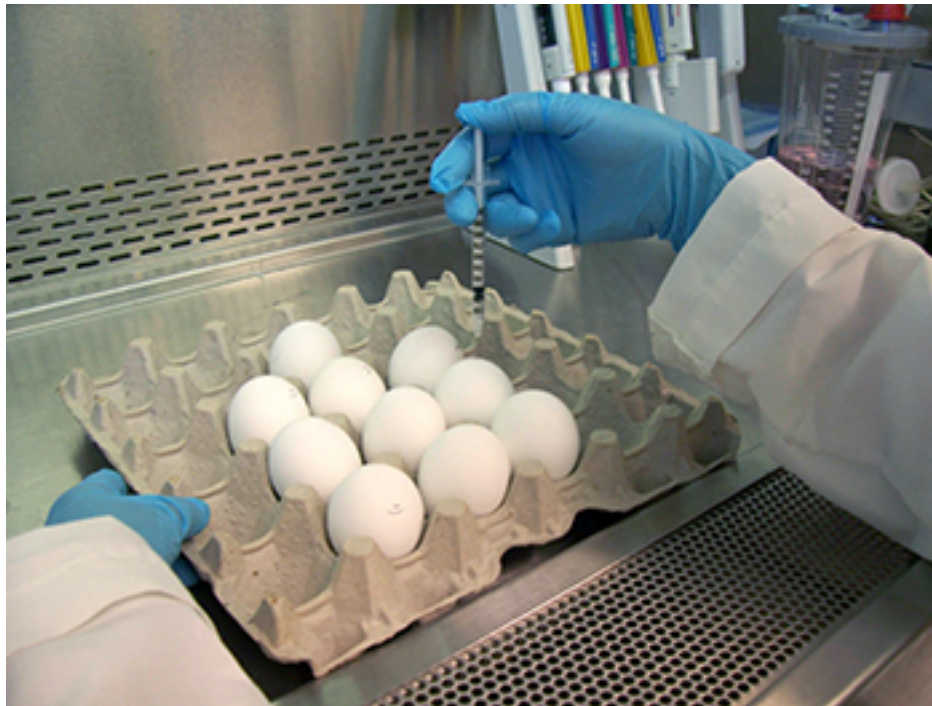


Figura 23. Proceso de inoculación manual de virus de la gripe en huevos embrionados de gallina. Fuente: *Consumer Updates-FDA*.

Para la recogida del LAM y LAL (Figura 24), los huevos inoculados con el virus se almacenaron a -20°C durante 45 minutos con el fin de eutanasiar al embrión siguiendo los principios de Bioética y Bienestar Animal. Este procedimiento además permite una recogida más limpia del líquido alantoideo debido a la retracción capilar que ocurre debido a las bajas temperaturas. Una vez practicada la eutanasia, el LAL fue recogido mediante la apertura del huevo embrionado a través de la cámara de aire, recogiendo dicho líquido mediante pipetas Pasteur estériles y almacenándolo en tubos estériles de 20 ml. Estos viales fueron almacenados durante 24 horas a 4°C para permitir la estabilización del título viral, y posteriormente se repitió el proceso de cultivo para realizar un segundo pase de en huevo embrionado de gallina para obtener mayor carga viral. El líquido alantoideo obtenido del segundo pase fue alicuotado en tubos eppendorf de 1,5 ml y almacenado a -80°C hasta su uso.



Figura 24. Proceso de *harvesting* manual para la recogida del LAM y LAL.

- ***Extracción de sangre de gallina y su procesado:***

Extracción de sangre de gallina

Para la realización de los ensayos serológicos se precisó del uso de hematíes de gallina. La sangre fue obtenida por el personal del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid por punción intracardiaca con aguja hipodérmica de 18G, siguiendo los principios de Bioética y Bienestar Animal. Para evitar la coagulación de la sangre, la extracción sanguínea se realizó en una base de solución *Alsever* incluida dentro de la jeringa en una proporción 50%-50%. Con el fin de evitar errores debido a la variabilidad individual de cada animal, la sangre fue extraída de cuatro animales diferentes en cada extracción. La sangre extraída fue almacenada a 4°C hasta su uso.

Procesado y limpieza de la sangre

Debido a que la fracción de sangre que interesa para la realización de los estudios de RIH son las células rojas (hematíes), la sangre requirió de una serie de lavados y centrifugaciones previas a su uso para lograr eliminar las células blancas y el plasma. Para el proceso de lavado, la sangre fue centrifugada en tubos tipo *Falcon* de 20 ml a 2.500 rpm



durante 10 minutos. Tras esta centrifugación, se eliminó el líquido sobrenadante (mezcla de suero y solución anticoagulante *Alsever*) y se retiró la capa de leucocitos (*buffy coat*) depositada en la superficie del sedimento de hematíes con ayuda de una pipeta Pasteur de punta fina. Posteriormente se añadió un volumen de cloruro sólido en suspensión al 0,9% y se repitió la centrifugación, eliminando posteriormente el sobrenadante y los restos de *buffy coat* que aun quedara en los tubos. El último lavado se realizó incluyendo un volumen de PBS a la suspensión sanguínea repitiendo nuevamente la centrifugación. Por último, se eliminó de nuevo el sobrenadante y los restos de la capa de *buffy coat*, y los hematíes se diluyeron de nuevo en un volumen de PBS arbitrario (aproximadamente diez veces el volumen del sedimento) para su almacenaje a 4°C hasta su uso (durante un máximo de 4 días). A esta solución de hematíes se le llamó concentrado lavado de hematíes (CLH).

Preparación de las diluciones de hematíes

Una vez lavados los hematíes, estos han de ser diluidos a la concentración requerida para su uso. Para el tratamiento de los sueros, la concentración requerida de hematíes fue del 50%, mientras que para el uso en titulación y RIH la concentración utilizada fue del 0,75%. Para obtener estas diluciones, se realizó una determinación del hematocrito mediante una centrifugación con un tubo graduado destinado a tal efecto para conocer la concentración de la solución del CLH. Una vez conocido este valor, se realizó una dilución de la cantidad de hematíes necesaria en el volumen de PBS requerido para su utilización en la reacción, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

donde:

V_1 = volumen de hematíes inicial necesario

C_1 = concentración de hematíes en el tubo original

V_2 = volumen de hematíes requerido en la dilución final

C_2 = concentración necesaria para la dilución final

Y donde V_2 fue hallado de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} V_2 &= \text{Volumen de hematíes requerido para cada reacción} = \\ &= N^\circ \text{ Sueros} \times N^\circ \text{ pocillos por suero} \times \text{volumen de hematíes en cada pocillo} \end{aligned}$$



Para el cálculo del volumen final de la dilución CLH necesaria, se añadió un volumen de 5 ml más para evitar errores derivados del pipeteo y de la lisis posterior de algunos hematíes. Las diluciones realizadas fueron almacenadas a 4°C durante un máximo de 3 días hasta su uso.

- **Tratamiento de los sueros:**

La presencia de inhibidores inespecíficos de tipo α (termoestables), β (termolábiles) y gamma (termoestables) en los sueros humanos pueden provocar resultados anómalos en la RIH, por lo que es necesaria su eliminación previamente a la realización de los experimentos (175). Para la inactivación de estos inhibidores se utilizó RDE (*Receptor Destroying Enzyme* – Denka Seiken) que es una enzima de tipo neuraminidasa procedente de cultivo de *Vibrio cholerae* Ogawa 558 que destruye este tipo de moléculas. Para el tratamiento de los sueros se mezclaron 300 μ l de RDE y 100 μ l de suero en un tubo eppendorf y se mantuvieron en un baño de calor a 37°C durante 16-18 horas. Posteriormente se inactivó el RDE aumentando la temperatura a 56°C durante 30 minutos. Para adsorber las hemaglutininas inespecíficas, la solución tratada de suero y RDE se mezcló con 100 μ l de hematíes de gallina al 50% y se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue recogido en un nuevo tubo eppendorf rotulado con los datos de cada paciente, y se añadió en cada tubo un volumen de 600 μ l de PBS para obtener una disolución de stock de suero diluido al 1/10. Los sueros tratados fueron almacenados en gradillas de 96 pocillos a -20°C hasta su uso. Previamente al uso de estos sueros, se realizó una deplementación de los mismos incubándolos durante 30 minutos a 56°C.

- **Reacción de Inhibición de Hemaglutinación - Principio científico-técnico**

La RIH es la técnica recomendada por la OMS para la caracterización antigénica de los virus de la gripe en el Programa Mundial de Vigilancia de estos virus. Esta técnica está basada en la capacidad de los virus de la gripe en aglutinar hematíes de diferentes especies animales. Las espículas de la proteína HA presentes en la superficie del virión se unen específicamente a los receptores ácido siálico presentes en las células sanguíneas de la serie roja. Cuando se da este fenómeno, se forma una malla o retículo entre los virus y los hematíes que es observable de forma macroscópica (Figura 25).

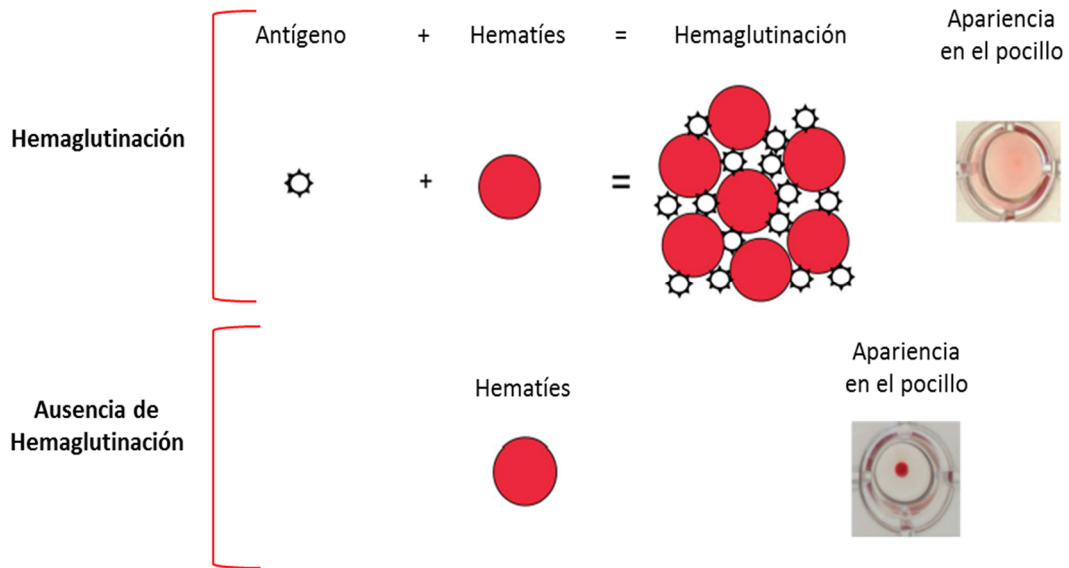


Figura 25. Esquema de la visualización macroscópica y microscópica de la hemaglutinación en placas de microtitulación en fondo "V" en presencia de virus de la gripe y de la no hemaglutinación en presencia únicamente de hematíes. Extraído y modificado de protocolos del Centro Europeo de gripe colaborador de la OMS *Francis Crick Institute, Mill Hill, Londres.*

En presencia de Acs capaces de reconocer específicamente determinados virus de la gripe, estos se unirán a la proteína HA y bloquearán el receptor de ácido siálico, por lo que los hematíes no podrán unirse específicamente al virus. Esto provocará que los hematíes precipiten observándose su sedimentación en el fondo del pocillo y su caída en forma de lágrima si se inclina la placa utilizada (Figura 26). A este proceso se le denomina inhibición de la hemaglutinación. Este fenómeno también se observa si el virus no tiene receptor afin a determinados eritrocitos, denominándose en este caso ausencia de hemaglutinación o virus no hemaglutinante.

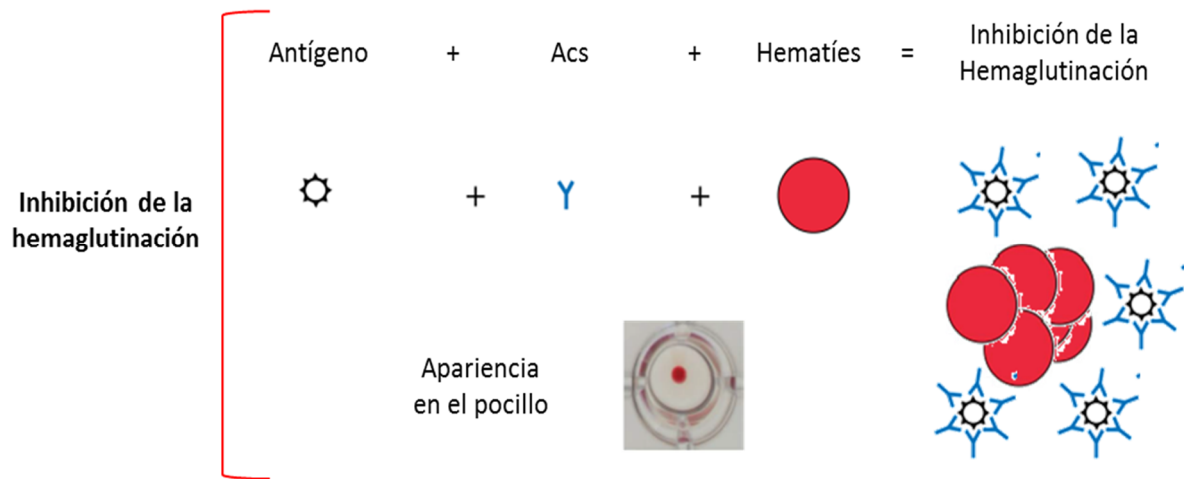


Figura 26. Esquema de la visualización macroscópica y microscópica de la inhibición de hemaglutinación en placa de microtitulación en fondo “V” en presencia de virus de la gripe y de suero con Acs específicos. Extraído y modificado de protocolos del Centro Europeo de gripe colaborador de la OMS *Francis Crick Institute, Mill Hill, Londres.*

Titulación de los virus de la gripe:

El objetivo de la titulación de los virus de la gripe es conocer la concentración del virus en stock que se va a utilizar para poder adecuar la dilución posteriormente a los ensayos serológicos que se realicen. Para que esta titulación fuera exacta, cada prueba se realizó partiendo de 3 diluciones diferentes del virus en PBS (1/10, 1/50 y 1/100), además de titular por duplicado cada una de estas diluciones. La titulación de estos antígenos gripales se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo “V”. Se dispensaron 50 µl de PBS a cada pocillo en toda la placa exceptuando en la primera columna, y posteriormente se dispensaron 50 µl de antígeno diluido en los pocillos primero y segundo de cada fila según las diluciones previamente descritas.

De esta manera, en la primera columna se encontraba el antígeno a la dilución previamente realizada (1/10, 1/50 ó 1/100) y en la segunda columna el antígeno diluido a la mitad. Se realizaron después diluciones dobles seriadas desde el segundo pocillo hasta el final, traspasando un volumen de 50 µl del contenido de cada pocillo hasta el siguiente. Se descartó el último volumen de la pipeta después de realizar la última dilución doble. Se incluyó un control negativo en el que solo se dispensó 50 µl de PBS en cada pocillo. Posteriormente se añadieron 50 µl de hematíes de gallina diluidos al 0.75% en todos los pocillos de la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos hasta su lectura.



Lectura e interpretación de las placas de titulación

La lectura de las titulaciones de los virus se realizó con la placa de microtitulación inclinada a 60-70° sobre una superficie blanca. La apariencia de los pocillos se determinó como se muestra a continuación (Figura 27):

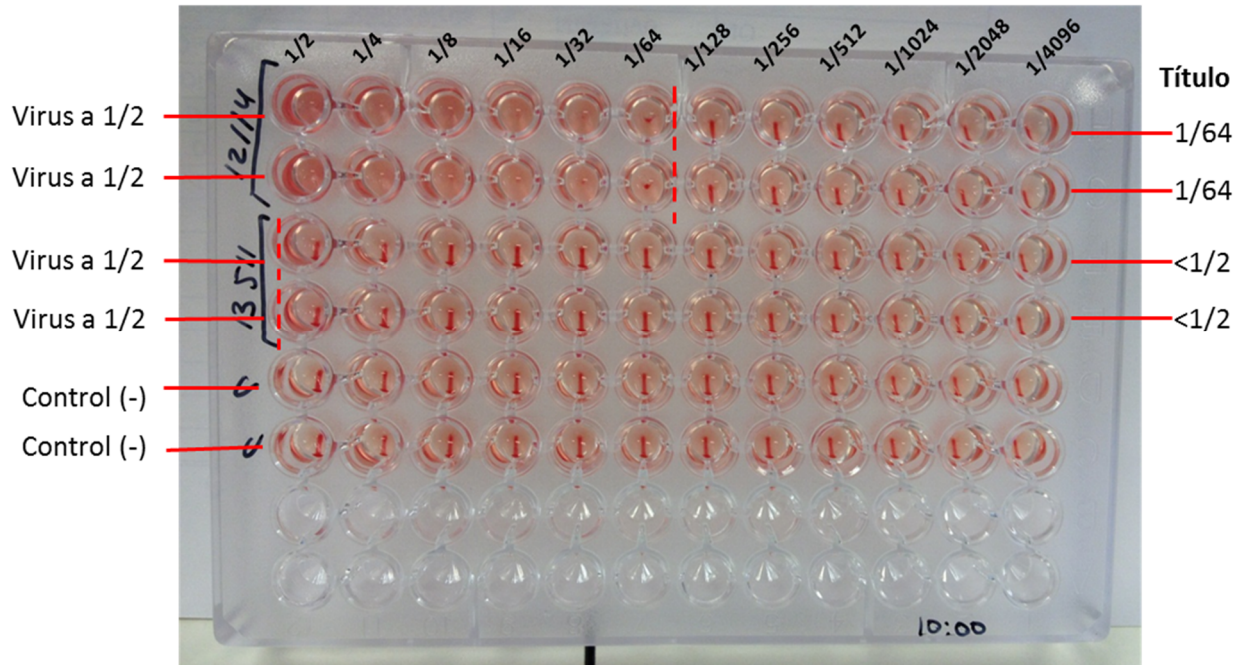


Figura 27. Lectura del ensayo de titulación de virus de la gripe con hemátres de gallina al 0,75%. La lectura se realiza con la placa inclinada a 60-70°. La dilución más alta con hemaglutinación completa se corresponde con el título hemaglutinante del virus analizado.

Se determinó como título hemaglutinante la dilución más alta (pocillo) en la que se observara hemaglutinación completa, determinada como ausencia de lágrima de sangre en la posición inclinada. Una vez obtenido el título de las diferentes diluciones iniciales ensayadas se halló la media aritmética del título, dividiéndose posteriormente entre 4 para obtener la dilución de 4 unidades hemaglutinantes (UH) necesaria para los ensayos de RIH.

Control de unidades hemaglutinantes

Previamente a la realización de los ensayos serológicos es necesario comprobar que la dilución del virus contiene un valor estandarizado para estos ensayos de 4 unidades hemaglutinantes. Para ello se volvió a titular la dilución calculada de 4 unidades en una nueva placa de microtitulación. Se tomó como dilución correcta aquella en la que se observó hemaglutinación completa hasta el tercer pocillo de dilución, ya que es el que contiene 4 unidades hemaglutinantes. En el caso de no alcanzar o sobrepasar esta dilución en esta



prueba, la dilución original de 4UH fue ajustada mediante la adición o disolución de antígeno realizándose un nuevo ensayo de control hasta su completo ajuste.

Reacción de Inhibición de Hemaglutinación (RIH)

El objetivo de la RIH es conocer el título de Acs HAs presentes en los sueros de la población estudiada. Para su realización se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo "V" en las que se dispensaron 50 µl de PBS en todos los pocillos exceptuando en la segunda columna (columna de primera dilución el suero). Posteriormente se dispensaron 50 µl del suero de cada paciente en el primer pocillo (control de suero), segundo y tercero. Se realizaron diluciones seriadas dobles del suero desde el tercer pocillo utilizando de volumen de dilución 50 µl. Se descartó el volumen final. Posteriormente se dispensaron 50 µl del antígeno con una concentración de 4UH en cada pocillo a excepción de la primera columna (control de suero). Se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente para permitir la unión de la HA del virus y los Acs, y seguidamente se dispensó 50 µl de hematíes diluidos al 0,75%, incubándose de nuevo durante 45 minutos a temperatura ambiente. En el test se incluyeron controles positivos (PBS+virus+hematíes) y controles negativos (PBS+hematíes) además de los anteriormente mencionados controles de suero en la primera columna de cada placa.

Interpretación de la RIH

La interpretación de los resultados obtenidos en la RIH se realizó inclinando la placa de microtitulación a 60-70°. Se tomó como título de Acs HAs la última dilución de suero en la que se observó inhibición de hemaglutinación completa como se muestra a continuación (Figura 28):

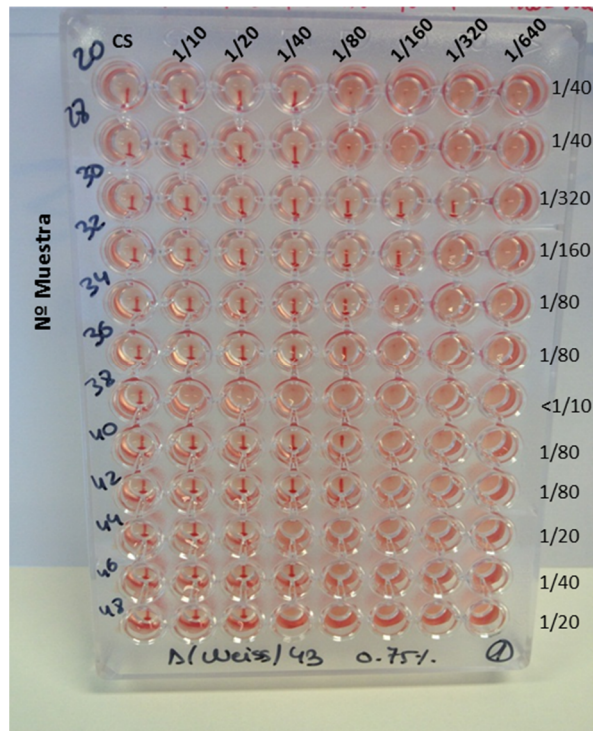


Figura 28. Lectura del ensayo de RIH con hemáties de gallina al 0,75% en placa de fondo "V". La lectura se realiza con la placa inclinada a 60-70°. El título de Acs de cada suero se determina por la dilución más alta en la que se observa inhibición completa de la hemaglutinación. La primera columna fue utilizada como control de suero (CS), en la que no se inoculó el virus.

Análisis de las secuencias genéticas de virus de la gripe A

Con el fin de conocer la distancia genética y la relación filogenética de las cepas de gripe A utilizadas en los estudios serológicos, se realizó un análisis de las secuencias del gen de la HA de las cepas antes mencionadas. En dicho análisis se incluyeron además cepas de gripe relacionadas con las incluidas en el estudio para poder observar las relaciones filogenéticas en un contexto más amplio, como por ejemplo las cepas de gripe A/H1N1 antiguas A/FortWarren/1/1950 y A/Bellamy/JY2/1942, que circularon también en la década de 1940, la cepa de Gripe Española de 1918 (A/SouthCarolina/1/1918), la cepa de gripe A/H1N1 que re-emergió en 1977 (A/USSR/90/1977), la cepa de gripe A/H2N2 que apareció en 1957 (A/Albany/22/1957), la primera cepa de gripe A/H5N1 aislada en uno de los primeros brotes de este virus en seres humanos (A/HongKong/378.1/2001), así como la cepa A/H3N2 que apareció en el año 1968 (A/HongKong/1-1-MA21-1/1968). Las secuencias de las cepas de gripe

utilizadas en este estudio filogenético fueron extraídas de las bases de datos *GISAID*, *Influenza Research Database* (IRD) y *GenBank*. En la Tabla 5 se detalla el número de acceso de cada una:

| Subtipo | Año | Cepa | Código Acceso |
|---------|------|----------------------------|---------------|
| A/H1N1 | 1918 | A/SouthCarolina/1/1918 | AF117241 |
| | 1942 | A/Bellamy/JY2/1942 | CY146769 |
| | 1943 | A/Weiss/43 | AF494247 |
| | 1947 | A/FM/1/47 | U02085 |
| | 1950 | A/FortWarren/1/1950 | CY009332 |
| | 1976 | A/Wisconsin/263/1976 | CY177464 |
| | 1999 | A/NewCaledonia/20/1999 | AY289929 |
| | 2007 | A/Brisbane/59/2007 | CY163776 |
| | 2009 | A/California/7/2009 | CY121680 |
| A/H3N2 | 1968 | A/HongKong/1-1-MA21-1/1968 | CY033097 |
| | 2005 | A/Wisconsin/67/2005 | CY163912 |
| | 2007 | A/Brisbane/10/2007 | EU199366 |
| | 2009 | A/Perth/16/2009 | KM821346 |
| A/H2N2 | 1957 | A/Albany/22/1957 | CY022013 |
| A/H5N1 | 2001 | A/HongKong/378.1/2001 | GU052089 |
| | 2004 | A/Vietnam/1194/2004 | EF541402 |
| A/H7N3 | 2004 | A/Canada/rv504/2004 | CY015006 |
| A/H9N2 | 1997 | A/HongKong/1074/1997 | GU053179 |

Tabla 5. Año de aislamiento y código de acceso de las secuencias del gen HA de las cepas de gripe A utilizadas en el estudio y relacionadas con estas.

Para el análisis de las estas secuencias del gen de la HA se utilizó el programa bioinformático *BioEdit* 7.2.3. Mediante la herramienta "*ClustalW Multiple Aligment*" se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias para su posterior análisis. Posteriormente, mediante el programa bioinformático *MEGA* 5.2 se construyó una matriz de distancias genéticas utilizando el modelo "*Maximum Composite Likelihood*" y un árbol filogenético utilizando el modelo de "*Tamura-Nei*" usando las secuencias anteriormente alineadas.



Análisis estadístico

Para analizar la inmunización de la población, la respuesta humoral y la eficacia de las vacunas de gripe utilizadas en las poblaciones estudiadas, se han seguido las guías consenso del *European Committee for Proprietary Medicinal Products* (CPMP) descritas por la EMA (1997) (159).

Las guías de la *EMA* son de uso común en la evaluación de la eficacia vacunal, y establecen una serie de criterios para evaluar si el efecto de la vacuna ha sido satisfactorio. En ellos se establece que en población mayor o igual a 60 años la seroconversión debe documentarse en al menos el 30% de los casos, el incremento de la media geométrica entre los títulos de los sueros pre-vacunales y post-vacunales tiene que ser al menos 2,0 puntos, y que al menos un 60% de los casos posean títulos post-vacunales mayores o iguales a 1/40 (título hemaglutinante considerado como protector). En el caso de los pacientes con edad inferior a 60 años se establece que la eficacia vacunal está probada si la tasa de Seroprotección es mayor o igual al 70%, si la tasa de seroconversión es mayor o igual al 40% y si el incremento de la media geométrica entre los títulos de los sueros pre y post-vacunales es mayor 2,5 (159). Estos parámetros analíticos se detallan a continuación:

1. Tasa de Seroprotección:

Porcentaje de la población que tras la vacunación posee un título de Acs HAS post-vacunales mayor o igual a 1/40 (Acs protectores).

2. Tasa de Seroconversión:

Porcentaje de la población que la vacunación le produce un aumento de al menos cuatro veces el título entre el suero pre-vacunal y post-vacunal (por ejemplo, de 1/10 a 1/40).

3. Media geométricas de los títulos (MGTs):

Debido a que los títulos de Acs son valores que siguen una progresión geométrica y una distribución no Normal con cierta asimetría derecha, la media aritmética no es un método adecuado para el cálculo de los valores de tendencia central, provocando en la mayoría de los casos una sobreestimación de estos valores. Para hallar la MGTs se ha de realizar una transformación logarítmica (Logaritmo neperiano) de los datos, con el fin de conseguir una distribución



Normal de tipo Gaussiano. El valor de tendencia central será por tanto la media aritmética de esta transformación. Ya que en este estudio se han valorado títulos $<1/10$, este título de Acs se ha considerado como 1 para el cálculo del logaritmo neperiano con el fin de obtener un valor neutro.

4. Razón de Incremento o Factor de Seroconversión:

La Razón de Incremento (RIC) o factor de Seroconversión permite estudiar el incremento de títulos que ha experimentado una población como respuesta a la vacunación antigripal, y se define como la división entre la MGTs post-vacunales y pre-vacunales.

Además de estos cuatro parámetros, en este estudio se analizó también el análisis de la Tasa de Protección Vacunal (TPV), calculándose como el porcentaje de individuos que adquirieron un título $\geq 1/40$ frente a un determinado virus tras la vacunación. En el caso del análisis de los virus aviares se analizó también el serorrefuerzo, contemplado como aquellos sueros pre-vacunales con títulos $\leq 1/10$ que tras la vacunación anual trivalente obtienen un título de $1/20$ (aumento de 4 títulos sin llegar a valores de títulos protectores de $1/40$).

Además de los parámetros utilizados para evaluar la eficacia de las vacunas administradas frente a los diferentes virus analizados, se ha considerado importante analizar los siguientes parámetros utilizando diferentes análisis estadísticos. Para estos cálculos se utilizó el programa informático SPSS V20.0:

1. Test de McNemar para muestras apareadas:

Este test no paramétrico fue utilizado para estudiar el efecto de la vacuna en términos seroconversión frente a todos los subtipos y cepas de gripe utilizados en los diferentes grupos poblacionales analizados. Se fijó un nivel de significación de $\alpha=0,05$.

2. Test T de Student para muestras apareadas:

El test T de Student para muestras apareadas se utilizó para comprobar la existencia de diferencias entre los valores MGTs pre-vacunales entre los distintos virus (comparación de los Acs HAs pre-vacunales) y los valores MGTs post-vacunales entre los distintos virus (comparación de los Acs HAs post-vacunales). Se fijó un nivel de significación de $\alpha=0,05$.



3. Test T de Student para muestras independientes:

El test T de Student para muestras independientes se utilizó para comprobar la existencia de diferencias en la Razón de Incremento entre la aplicación de vacunas adyuvadas o fraccionadas en la cohorte de individuos ≥ 65 años en función del virus analizado. Este test estadístico fue además utilizado para comprobar la existencia de diferencias en la RIC en función de la edad y el sexo de los individuos. Se fijó un nivel de significación de $\alpha=0,05$.

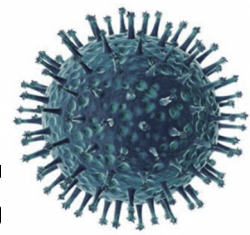
4. Análisis ANOVA de un factor – Test de Bonferroni:

El análisis ANOVA de un factor mediante el test de Bonferroni se utilizó para comprobar la existencia de diferencias en la MGTs pre-vacunales entre los diferentes grupos de individuos analizados frente a cada virus. Este test estadístico se utilizó también para comprobar diferencias entre la media de edad y en el número de días de exposición a la vacuna trivalente anual de las distintas cohortes en la población ≥ 65 años. Se fijó un nivel de significación de $\alpha=0,05$.

5. Test Chi-cuadrado:

El test Chi-cuadrado (χ^2) se utilizó para comprobar las diferencias existentes en el efecto de la vacunación en función del tipo de vacuna (Adyuvada o Fraccionada) en términos de tasa de seroprotección. Se fijó un nivel de significación de $\alpha=0,05$.

RESULTADOS



Resultados

La exposición de los resultados se ha realizado atendiendo a los dos grupos de población estudiados en este trabajo, por un lado la población mayor de 65 años y por otro la población con enfermedades autoinmunes. En el primer grupo (población mayor de 65 años) se evaluó la presencia en sangre periférica de Acs hemaglutinantes (HAs) frente a cepas de gripe estacionales, cepas A/H1N1 antiguas y cepas de gripe aviar. Se analizó posteriormente la respuesta inmune tras la vacunación anual trivalente en las cuatro cohortes incluidas en el estudio. En el segundo grupo poblacional (población con enfermedades autoinmunes) se evaluó la presencia de Acs HAs frente a los subtipos de gripe estacionales previamente a la vacunación, así como la respuesta inmune humoral tras la vacunación con vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09.

Análisis de Acs previos a la vacunación y de la respuesta inmune humoral tras la vacunación en poblacional mayor de 65 años frente a distintos virus de la gripe

Los resultados obtenidos de los individuos mayores de 65 años se han expuesto en función de sus características clínicas y demográficas. Se estudiaron los Acs HAs previos a la vacunación y la respuesta inmune humoral frente a cada virus analizado.

Características demográficas y clínicas de los individuos ≥ 65 años

Las características demográficas y clínicas de los individuos ≥ 65 años del estudio se analizaron de forma global y en cada cohorte poblacional de cada temporada incluida en el estudio.

1. Análisis demográfico y clínico global

El grupo poblacional de individuos ≥ 65 años se constituyó con 174 individuos distribuidos en cuatro cohortes procedentes de las temporadas de gripe 2006-07 ($n_1=45$), 2008-09 ($n_2=43$), 2009-10 ($n_3=43$) y 2010-11 ($n_4=43$). La media de edad de todo el grupo fue de 75,9 años con una Desviación Estándar (DE) de 7,6 años y una mediana de 76,5 años.

El 57,5% de los individuos incluidos fueron varones ($n_1=100$) y el 45,5% mujeres ($n_2=74$) (Figura 29). El número medio de días entre la administración de la vacuna y la extracción del suero post-vacunal (NDEV) fue de 33,8 días con una DS de 7,9 y una mediana de 32,0 días.

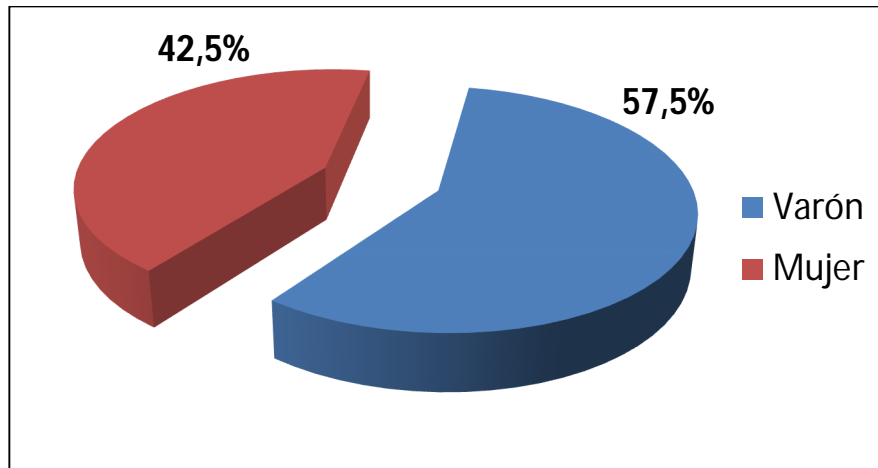


Figura 29. Distribución porcentual de sexos en el grupo de individuos ≥ 65 años.

2. Análisis demográfico y clínico por cohorte

Los valores de la media de edad, DE, mediana de la edad y el NDEV de las cohortes de cada temporada, así como la distribución por sexos de los individuos se exponen en la Tabla 6.

| Cohortes | Edad | | | Sexo | | | | Días de exposición a la vacuna | | | Total |
|----------------|-------|-----|---------|-------|------|-------|------|--------------------------------|------|---------|-------|
| | Media | DE | Mediana | Varón | % | Mujer | % | Media | DE | Mediana | |
| 2006-07 | 74,7 | 6,6 | 74,0 | 29 | 64,4 | 16 | 35,6 | 31,4 | 2,6 | 31,0 | 45 |
| 2008-09 | 79,2 | 8,1 | 80,0 | 20 | 46,5 | 23 | 53,5 | 33,4 | 3,2 | 35,0 | 43 |
| 2009-10 | 74,8 | 6,8 | 76,0 | 27 | 62,8 | 16 | 37,2 | 39,1 | 14,0 | 33,0 | 43 |
| 2010-11 | 75,3 | 7,9 | 75,0 | 24 | 55,8 | 19 | 44,2 | 31,7 | 2,0 | 32,0 | 43 |

Tabla 6. Valores de la media, DE y mediana de las variables Edad y NDEV de cada cohorte. Valores porcentuales y absolutos de la variable Sexo de los individuos ≥ 65 años.

La media de edad de los individuos ≥ 65 años osciló entre los 74,7 años (cohorte de la temporada 2006-07) hasta los 79,2 años (cohorte de la temporada 2008-09). Mediante el análisis ANOVA de un factor (test de Bonferroni; $\alpha=0,05$) se observaron diferencias significativas en la media de edad de los individuos de la temporada 2008-09 frente al resto de cohortes ($p<0,05$), siguiendo la distribución que se muestra en la Figura 30.

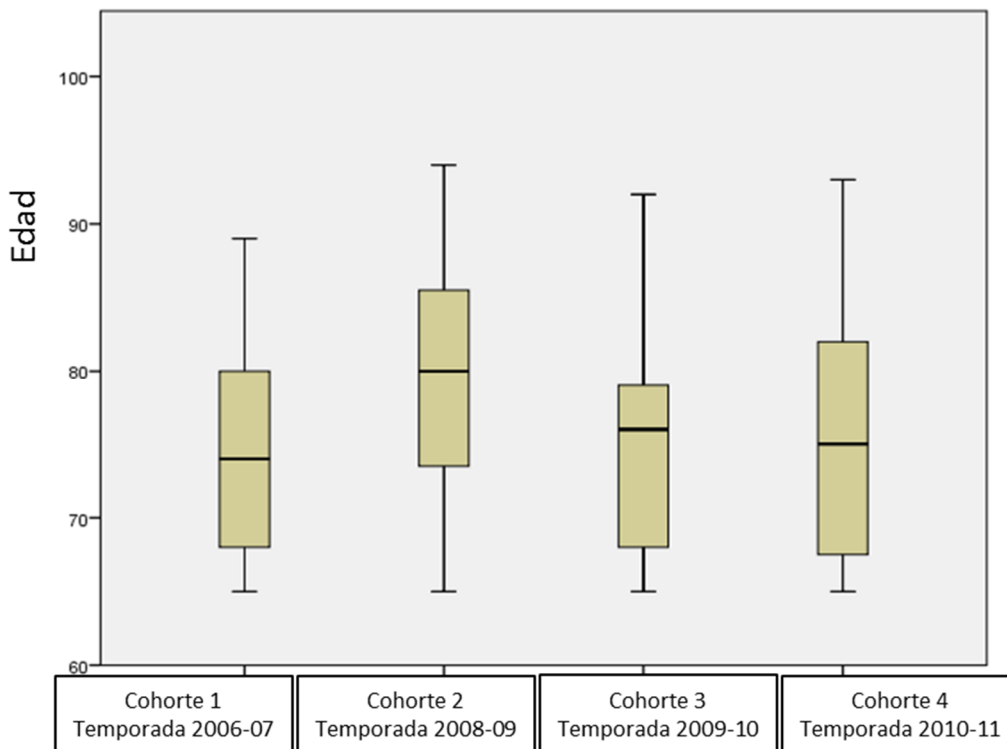


Figura 30. Media de edad e intervalo de confianza al 95% de los individuos ≥ 65 años de las cohortes incluidas en el estudio.

El porcentaje de varones osciló entre el 55,8% (cohorte de la temporada 2010-11) y el 64,4% (cohorte de la temporada 2006-07), a excepción de la cohorte de la temporada 2008-09 en la que los varones representaron el 46,5% del total (Figura 31).

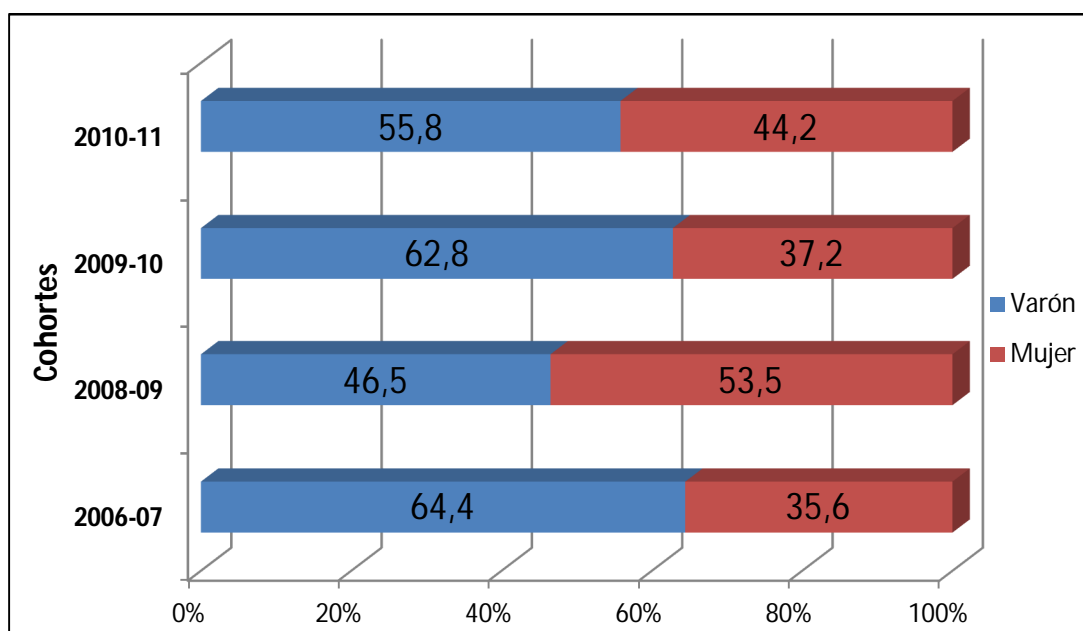


Figura 31. Distribución por sexo de los individuos ≥ 65 años incluidos en cada cohorte.

El NDEV medio de los individuos de cada cohorte osciló entre 31,4 días (cohorte de la temporada 2006-07) y 39,1 días (cohorte de la temporada 2009-10). El análisis ANOVA de un factor (test de Bonferroni; $\alpha=0,05$) mostró diferencias significativas en la media del NDEV de la cohorte de la temporada 2009-10 frente al resto de cohortes ($p<0,05$), siguiendo la distribución que se muestra en la Figura 32.

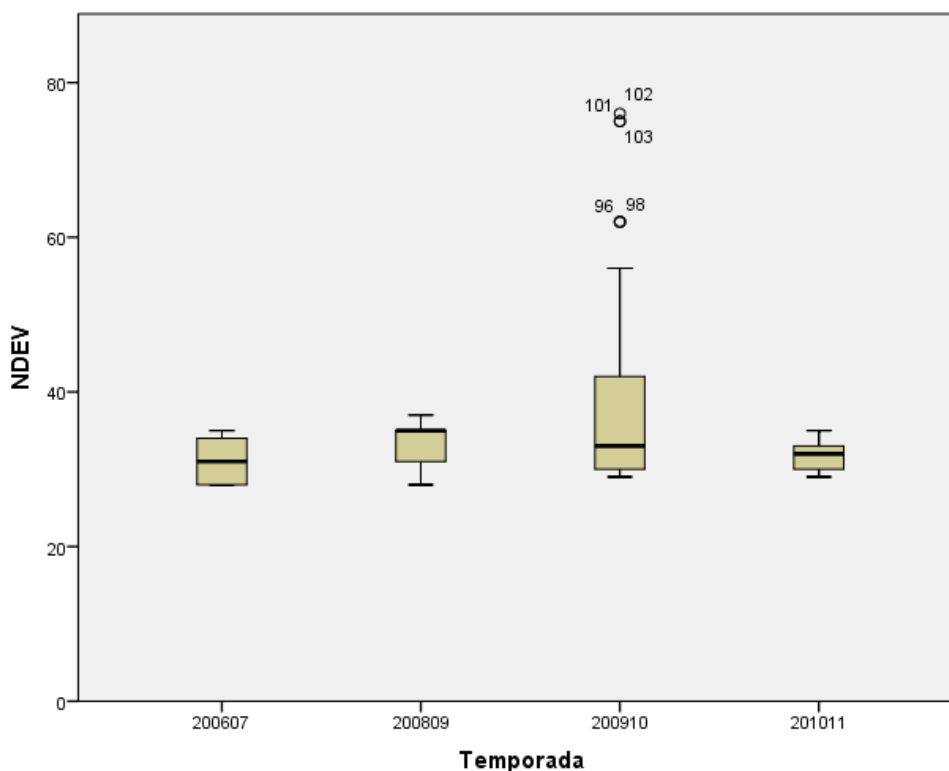


Figura 32. Distribución en box-plot de la media y del intervalo de confianza al 95% de la variable NDEV en los individuos ≥ 65 años de cada cohorte. \circ^{101} , valores del NDEV por encima del intervalo de confianza para la cohorte de la temporada 2009-10.

De los dos tipos de vacunas antigripales que recibió esta población, las de tipo Adyuvado (VAD) fueron administradas a un total de 71 personas (40,8%) y las de tipo Fraccionado (VFR) a un total de 103 personas (59,2%).

Estudio de los Acs HAs pre-vacunales y la respuesta inmune humoral tras la vacunación con vacuna trivalente anual frente a virus de gripe A y B estacionales

En este epígrafe se analizaron los Acs HAs previos a la vacunación frente a virus de la gripe A y B estacionales en el grupo de población ≥65 años. Se estudió además la respuesta inmune humoral tras la vacunación con vacuna trivalente anual frente a estos virus en términos de Seroprotección, protección vacunal y Seroconversión en función de cada cohorte, de la edad y sexo de los individuos y del tipo de vacuna administrada.

1. Análisis de los Acs HAs pre-vacunales totales y por cohorte frente a virus de la gripe A y B estacionales

Análisis global de los Acs HAs pre-vacunales frente a los virus de la gripe A y B estacionales:

Al analizar los títulos pre-vacunales del grupo poblacional de individuos ≥65 años se observaron títulos considerados como protectores (≥1/40) frente a virus de la gripe A estacionales en el 55,2% de los individuos frente al subtipo A/H3N2, en el 39,1% frente al subtipo A/H1N1 anterior al año 2009 y solo en el 3,4% frente al subtipo A/H1N1pdm09 (Tabla 7) (Figura 33). Frente a los virus de gripe B se observaron títulos protectores de Acs HAs en el 41,4% de los individuos frente al linaje B/Victoria y en el 33,9% frente al linaje B/Yamagata.

Valores absolutos y % de títulos frente a cada subtipo o linaje

| Título | A/H1N1pdm09 | | A/H1N1 | | A/H3N2 | | B(Yam) | | B(Vict) | |
|----------------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 138 | 79,3 | 20 | 11,5 | 17 | 9,8 | 42 | 24,1 | 35 | 20,1 |
| 10 | 20 | 11,5 | 37 | 21,3 | 26 | 14,9 | 36 | 20,7 | 32 | 18,4 |
| 20 | 10 | 5,7 | 49 | 28,2 | 35 | 20,1 | 37 | 21,3 | 35 | 20,1 |
| 40 | 4 | 2,3 | 29 | 16,7 | 29 | 16,7 | 32 | 18,4 | 28 | 16,1 |
| 80 | 0 | 0,0 | 19 | 10,9 | 38 | 21,8 | 21 | 12,1 | 29 | 16,7 |
| 160 | 2 | 1,1 | 15 | 8,6 | 8 | 4,6 | 4 | 2,3 | 7 | 4,0 |
| 320 | 0 | 0,0 | 4 | 2,3 | 10 | 5,7 | 1 | 0,6 | 4 | 2,3 |
| 640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 6 | 3,4 | 0 | 0,0 | 4 | 2,3 |
| >640 | 0 | 0,0 | 1 | 0,6 | 5 | 2,9 | 1 | 0,6 | 0 | 0,0 |
| Títulos ≥1/40 | 6 | 3,4 | 68 | 39,1 | 96 | 55,2 | 59 | 33,9 | 72 | 41,4 |

Tabla 7. Distribución global de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a virus de gripe A y B.

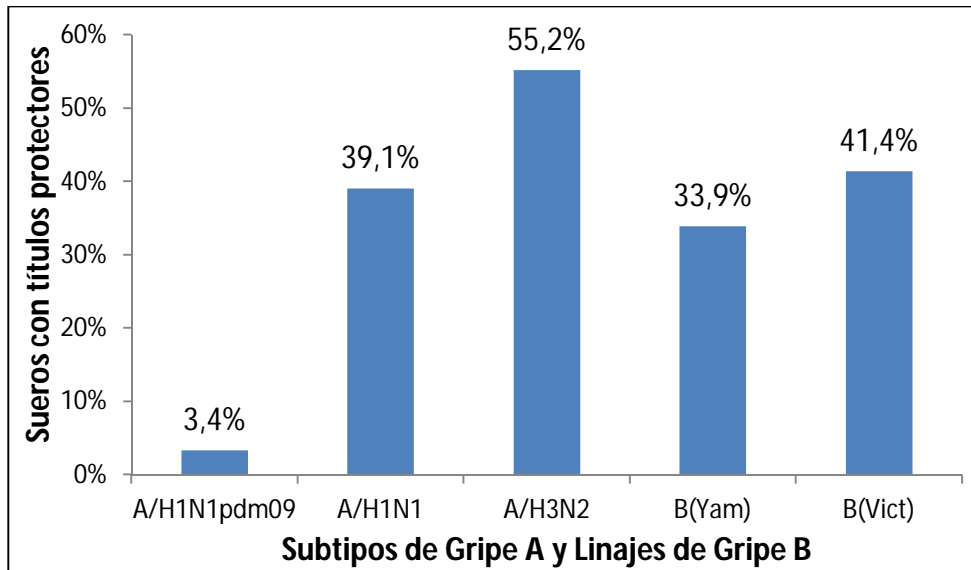


Figura 33. Distribución porcentual global de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs HAs frente a subtipos de gripe A y B.

Análisis por cohorte de los Acs HAs pre-vacunales frente a los virus de la gripe estacionales:

- **Cohorte de la temporada 2006-07:**

En la cohorte de la temporada 2006-07 el subtipo de gripe A frente al que se observó un mayor número de sueros pre-vacunales con títulos protectores ($\geq 1/40$) fue A/H3N2 (55,6%) seguido del subtipo A/H1N1 (51,1%). El menor porcentaje de títulos protectores pre-vacunales se observó frente al subtipo A/H1N1pdm09 (0,0%) (Tabla 8) (Figura 34). Ambos linajes de gripe B mostraron títulos protectores en un porcentaje en torno al 30% de los individuos.

Valores absolutos y % de títulos frente a cada subtipo o linaje

| Título | A/H1N1pdm09 | | A/H1N1 | | A/H3N2 | | B(Yam) | | B(Vict) | |
|---------------------------------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 38 | 84,4 | 2 | 4,4 | 4 | 8,9 | 10 | 22,2 | 12 | 26,7 |
| 10 | 6 | 13,3 | 8 | 17,8 | 8 | 17,8 | 7 | 15,6 | 11 | 24,4 |
| 20 | 1 | 2,2 | 12 | 26,7 | 8 | 17,8 | 15 | 33,3 | 8 | 17,8 |
| 40 | 0 | 0,0 | 7 | 15,6 | 3 | 6,7 | 9 | 20,0 | 4 | 8,9 |
| 80 | 0 | 0,0 | 8 | 17,8 | 10 | 22,2 | 4 | 8,9 | 6 | 13,3 |
| 160 | 0 | 0,0 | 5 | 11,1 | 5 | 11,1 | 0 | 0,0 | 2 | 4,4 |
| 320 | 0 | 0,0 | 2 | 4,4 | 3 | 6,7 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 |
| 640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 |
| >640 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 | 3 | 6,7 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Títulos $\geq 1/40$ | 0 | 0,0 | 23 | 51,1 | 25 | 55,6 | 13 | 28,9 | 14 | 31,1 |

Tabla 8. Cohorte 2006-07: Distribución de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a virus de gripe A y B.

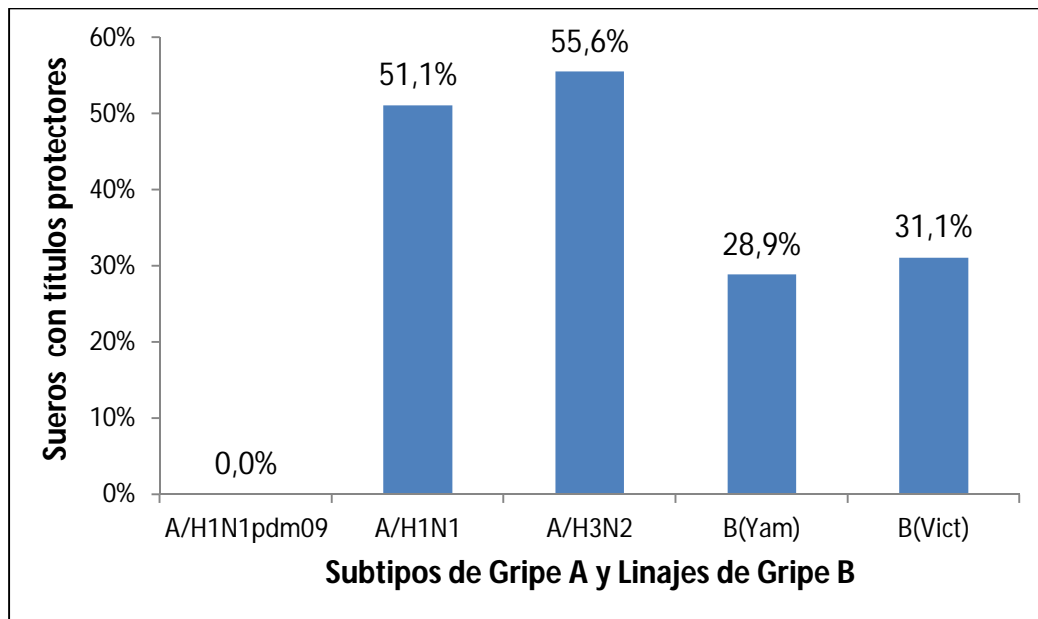


Figura 34. Cohorte 2006-07: Distribución porcentual de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs HAs frente a subtipos de gripe A y B.

- **Cohorte de la temporada 2008-09:**

En la cohorte de la temporada 2008-09 el virus de gripe frente al que se observó mayor número de sueros pre-vacunales con títulos protectores fue el linaje B/Victoria (48,8%), seguido por el subtipo A/H3N2 (39,5%) (Tabla 9) (Figura 35). El porcentaje de sueros con títulos pre-vacunales protectores frente al subtipo A/H1N1 y el linaje B/Yamagata fue similar en torno al 26%, mientras que frente al subtipo A/H1N1pdm09 el porcentaje fue muy bajo (2,3%).

Valores absolutos y % de títulos frente a cada subtipo o linaje

| Título | A/H1N1pdm09 | | A/H1N1 | | A/H3N2 | | B(Yam) | | B(Vict) | |
|----------------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 37 | 86,0 | 9 | 20,9 | 9 | 20,9 | 14 | 32,6 | 4 | 9,3 |
| 10 | 1 | 2,3 | 12 | 27,9 | 8 | 18,6 | 14 | 32,6 | 4 | 9,3 |
| 20 | 4 | 9,3 | 10 | 23,3 | 9 | 20,9 | 4 | 9,3 | 14 | 32,6 |
| 40 | 0 | 0,0 | 4 | 9,3 | 4 | 9,3 | 5 | 11,6 | 4 | 9,3 |
| 80 | 0 | 0,0 | 3 | 7,0 | 7 | 16,3 | 4 | 9,3 | 11 | 25,6 |
| 160 | 1 | 2,3 | 3 | 7,0 | 3 | 7,0 | 0 | 0,0 | 3 | 7,0 |
| 320 | 0 | 0,0 | 2 | 4,7 | 1 | 2,3 | 1 | 2,3 | 1 | 2,3 |
| 640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 | 0 | 0,0 | 2 | 4,7 |
| >640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 | 1 | 2,3 | 0 | 0,0 |
| Titulos ≥1/40 | 1 | 2,3 | 12 | 27,9 | 17 | 39,5 | 11 | 25,6 | 21 | 48,8 |

Tabla 9. Cohorte 2008-09: Distribución de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a virus de gripe A y B.

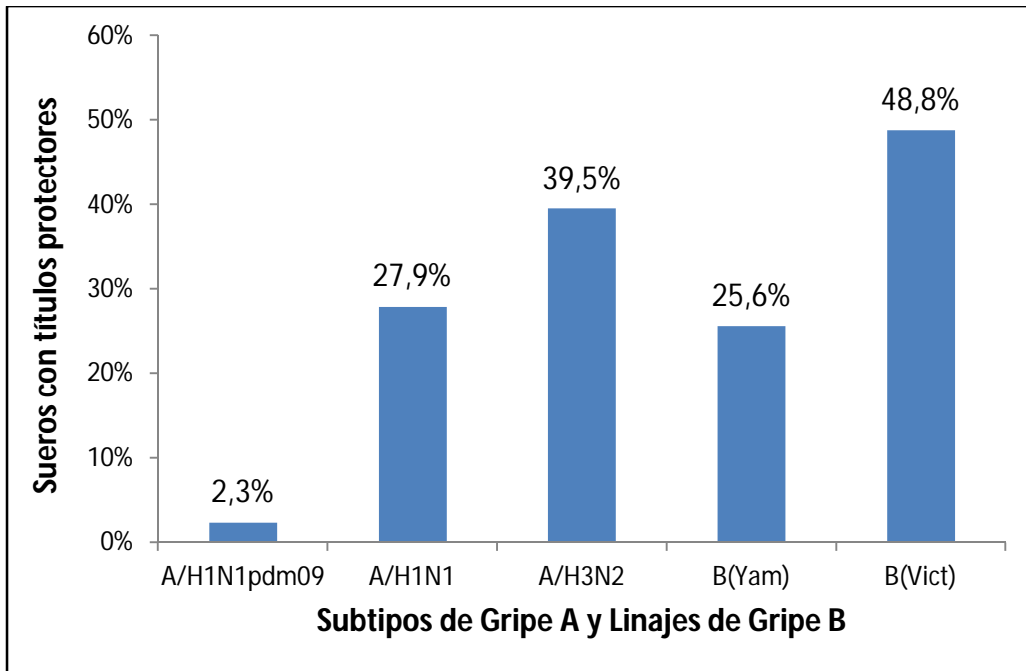


Figura 35. Cohorte 2008-09: Distribución porcentual de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs HAs frente a subtipos de gripe A y B.

- **Cohorte de la temporada 2009-10:**

En la cohorte de la temporada 2009-10 el mayor porcentaje de sueros pre-vacunales con títulos protectores se observó frente al subtipo de gripe A/H3N2 (51,2%) seguido del linaje B/Yamagata (37,2%) (Tabla 10) (Figura 36), mientras que en el caso del linaje B/Victoria el porcentaje fue del 30,2%, en el caso del subtipo A/H1N1 del 23,3% y en el caso del subtipo A/H1N1pdm09 del 2,3%.

Valores absolutos y % de títulos frente a cada subtipo o linaje

| Título | A/H1N1pdm09 | | A/H1N1 | | A/H3N2 | | B(Yam) | | B(Vict) | |
|----------------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 33 | 76,7 | 8 | 18,6 | 4 | 9,3 | 13 | 30,2 | 15 | 34,9 |
| 10 | 6 | 14,0 | 7 | 16,3 | 6 | 14,0 | 4 | 9,3 | 10 | 23,3 |
| 20 | 3 | 7,0 | 18 | 41,9 | 11 | 25,6 | 10 | 23,3 | 5 | 11,6 |
| 40 | 1 | 2,3 | 6 | 14,0 | 6 | 14,0 | 10 | 23,3 | 8 | 18,6 |
| 80 | 0 | 0,0 | 2 | 4,7 | 8 | 18,6 | 5 | 11,6 | 4 | 9,3 |
| 160 | 0 | 0,0 | 2 | 4,7 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 | 1 | 2,3 |
| 320 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 5 | 11,6 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| 640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 4,7 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| >640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Titulos ≥1/40 | 1 | 2,3 | 10 | 23,3 | 22 | 51,2 | 16 | 37,2 | 13 | 30,2 |

Tabla 10. Cohorte 2009-10: Distribución de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a virus de gripe A y B.

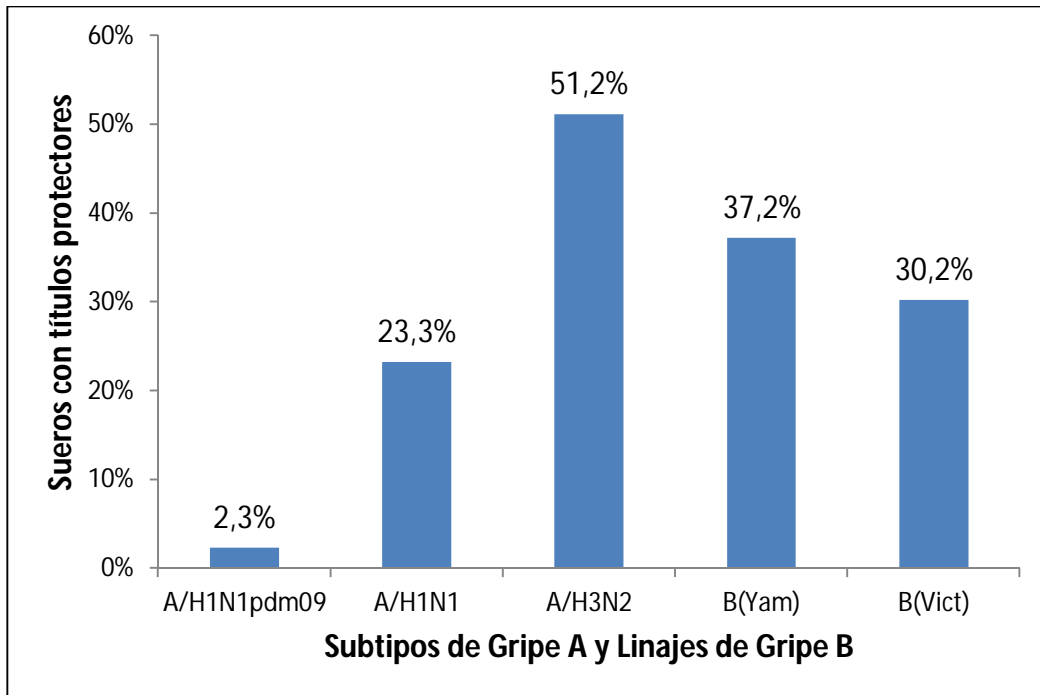


Figura 36. Cohorte 2009-10: Distribución porcentual de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs HAs frente a subtipos de gripe A y B.

- **Cohorte de la temporada 2010-11:**

En la cohorte de la temporada 2010-11 el subtipo de gripe A/H3N2 fue el que mostró mayor porcentaje de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs (74,4%), seguido del linaje B/Victoria (55,8%), del subtipo A/H1N1 (53,5%), linaje B/Yamagata (44,2%) y del subtipo A/H1N1pdm09 (9,3%) (Tabla 11) (Figura 37).

| Título | A/H1N1pdm09 | | A/H1N1 | | A/H3N2 | | B(Yam) | | B(Vict) | |
|----------------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 30 | 69,8 | 1 | 2,3 | 4 | 9,3 | 5 | 11,6 | 4 | 9,3 |
| 10 | 7 | 16,3 | 10 | 23,3 | 0 | 0,0 | 11 | 25,6 | 7 | 16,3 |
| 20 | 2 | 4,7 | 9 | 20,9 | 7 | 16,3 | 8 | 18,6 | 8 | 18,6 |
| 40 | 2 | 4,7 | 12 | 27,9 | 16 | 37,2 | 8 | 18,6 | 12 | 27,9 |
| 80 | 1 | 2,3 | 6 | 14,0 | 13 | 30,2 | 8 | 18,6 | 8 | 18,6 |
| 160 | 1 | 2,3 | 5 | 11,6 | 0 | 0,0 | 3 | 7,0 | 1 | 2,3 |
| 320 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 | 0 | 0,0 | 2 | 4,7 |
| 640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 4,7 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 |
| >640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Títulos ≥1/40 | 4 | 9,3 | 23 | 53,5 | 32 | 74,4 | 19 | 44,2 | 24 | 55,8 |

Tabla 11. Cohorte 2010-11: Distribución de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a virus de gripe A y B.

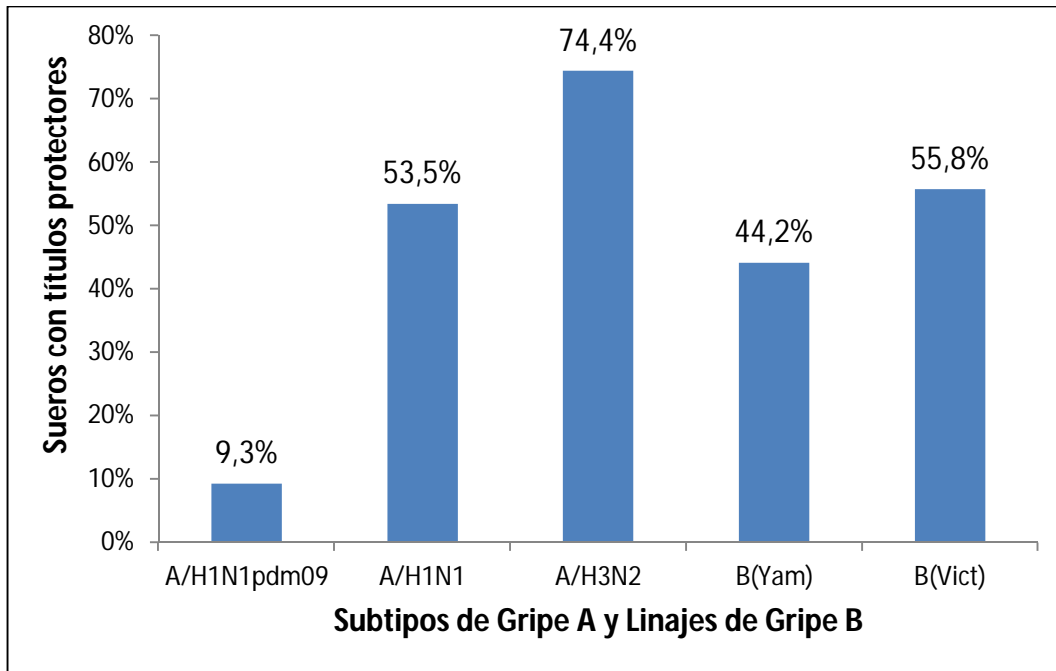


Figura 37. Cohorte 2010-11: Distribución porcentual de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs HAs frente a subtipos de gripe A y B.

Análisis por cohortes de la distribución porcentual de los Acs pre-vacunales protectores frente a virus de gripe A y B epidémicos:

Al analizar la distribución por temporadas del porcentaje de individuos con títulos de Acs HAs pre-vacunales protectores frente a los subtipos y linajes de gripe A y B, se observó un porcentaje muy bajo de individuos con Acs frente al subtipo A/H1N1pdm09 en todas las cohortes a excepción de la cohorte de la temporada 2010-11, en la que este virus pandémico ya había circulado anteriormente entre la población durante la pandemia del año 2009) (Figura 38). Frente al subtipo A/H1N1 y el linaje B/Victoria el porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores se mantuvo estable entre el 20-50% y el 30- 55% respectivamente en todas las cohortes. En el caso del subtipo A/H3N2 y el linaje B/Yamagata, el porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores se mantuvo estable en las tres primeras cohortes del estudio y ascendió hasta el 74,4% y el 44,3% respectivamente en la última cohorte analizada.

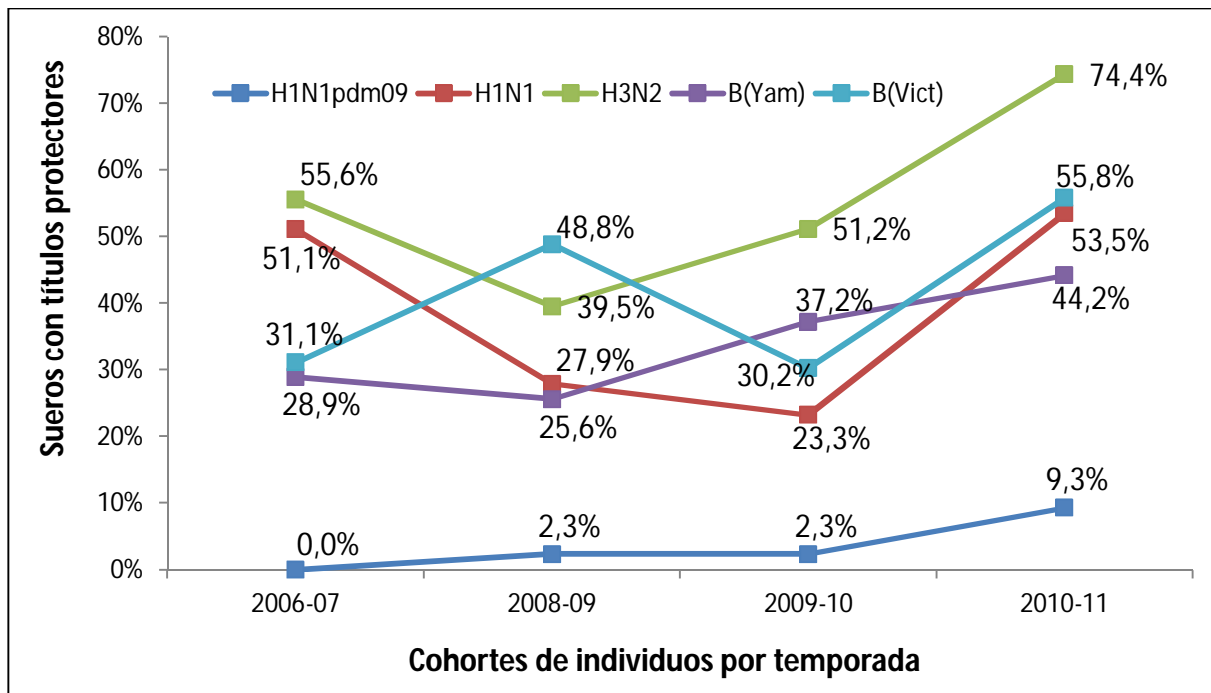


Figura 38. Distribución porcentual por cohorte de los individuos con títulos protectores pre-vacunales frente a los subtipos de gripe A y B.

2. **Análisis global del efecto de la vacuna trivalente anual sobre la generación de Acs HAs frente a los virus de gripe A y B estacionales**

Analizando globalmente los títulos obtenidos mediante RIH en los sueros pre y post-vacunales se halló la Tasa de Seroprotección (TS), Tasa de Protección Vacunal (TPV) y la Tasa de Seroconversión (TSC) frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B estacional (Tabla 12). En el grupo de individuos ≥ 65 años analizados la TPV fue del 32,2% frente al subtipo A/H1N1pdm09, 33,9% frente al subtipo A/H1N1, 35,6% frente al subtipo A/H3N2, del 16,7% frente al linaje B/Yamagata y del 21,8% frente al linaje B/Victoria.

| | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| Nº Total de Sueros | 174 | 174 | 174 | 174 | 174 |
| Nº de Pre-Protegidos | 6 | 68 | 96 | 59 | 72 |
| Tasa protección previa | 3,4 | 39,1 | 55,2 | 33,9 | 41,4 |
| Nº de Post-Protegidos | 62 | 127 | 158 | 88 | 110 |
| Tasa Seroprotección | 35,6 | 73,0 | 90,8 | 50,6 | 63,2 |
| Nº Protegidos por vacuna | 56 | 59 | 62 | 29 | 38 |
| Tasa Protección Vacunal | 32,2 | 33,9 | 35,6 | 16,7 | 21,8 |
| Seroconversiones | 55 | 59 | 95 | 26 | 37 |
| Tasa Seroconversión | 31,6 | 33,9 | 54,6 | 14,9 | 21,3 |

Tabla 12. Resultados globales de la TPP, TS, TPV y TSC frente a subtipos de gripe A y B.

La TSC fue similar a la TPV en todos los subtipos y linajes a excepción del subtipo A/H3N2, en la que esta TSC fue superior a la TPV (54,6%) (Figura 39). La TS frente a los subtipos de gripe A fue del 90,8% frente al subtipo A/H3N2, 73,0% frente al subtipo A/H1N1 y 35,6% frente al subtipo A/H1N1pdm09. La TS estuvo entre el 50-65% para ambos linajes de gripe B.

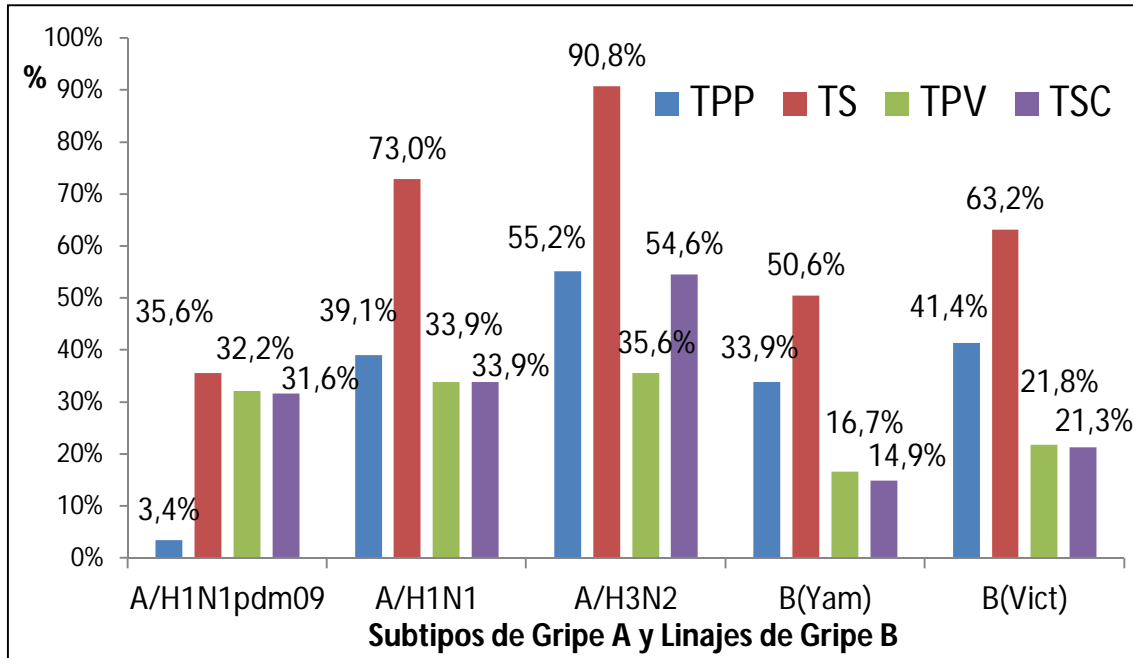


Figura 39. Valores globales de TPP, TS, TPV y TSC frente a los subtipos y linajes de gripe A y B.

La presencia de Acs HAs previos y posteriores a la vacunación fue analizada mediante el cálculo de la Media Geométrica de los títulos (MGTs). Por otra parte, la razón de incremento (RIC) entre la MGTs pre y post-vacunal se calculó dividiendo la MGT pre-vacunal entre la MGTs post-vacunal, obteniéndose una RIC de 7,1 frente al subtipo A/H1N1pdm09, 5,3 frente al subtipo A/H3N2, 3,1 frente al subtipo A/H1N1, 2,4 frente al linaje B/Victoria y 2,0 frente al linaje B/Yamagata (Tabla 13).

| | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|
| | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| | MGT (IC95%) | MGT (IC95%) | MGT (IC95%) | MGT (IC95%) | MGT (IC95%) |
| MGTs PreVacunales | 1,8 (1,5-2,1) | 20,9 (16,6-25,1) | 33,5 (25,6-43,0) | 12,3 (9,7-15,5) | 17,0 (13,2-22,2) |
| MGTs PostVacunales | 12,7 (9,5-17,2) | 63,8 (53,1-77,6) | 178,2 (143,7-220,3) | 24,4 (19,4-30,0) | 40,9 (32,5-50,6) |
| RIC | 7,1 | 3,1 | 5,3 | 2,0 | 2,4 |

Tabla 13. MGTs y RIC globales de los títulos de los sueros pre y post-vacunales frente a virus de la gripe A y B. Intervalo de Confianza al 95% (IC95%).

Mediante el Test de McNemar ($\alpha=0,05$) se observó que tras la vacunación la seroconversión (aumento en al menos 4 veces el título pre-vacunal con respecto al post-vacunal) fue significativa frente a todos los subtipos y linajes de gripe A y B estacionales incluidos en el estudio. Se observaron diferencias significativas entre las MGTs pre y post-vacunales frente a todos los virus de gripe A y B estacionales analizados (Test T-Student; $p<0,05$).

Al analizar los datos de la TS, TSC y RIC siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal para individuos mayores de 60 años, la TS fue superior al 60% frente a todos los virus de gripe A y B a excepción del subtipo A/H1N1pdm09 y del linaje B/Yamagata. La TSC fue solo superior al 30% frente a los subtipos de gripe A, mientras que la RIC superó o fue igual a 2,0 en todos los subtipos y linajes de gripe A y B analizados (Tabla 14).

| Criterio EMA | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|---------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| Tasa Seroprotección | 35,6 | 73,0 | 90,8 | 50,6 | 63,2 |
| Tasa Seroconversión | 31,6 | 33,9 | 54,6 | 14,9 | 21,3 |
| Razón de Incremento | 7,1 | 3,1 | 5,3 | 2,0 | 2,4 |

*Color verde: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA

**Color rojo: Valor inferior al *cut-off* del criterio EMA

Tabla 14. Valores globales de la TS, TSC y RIC de los sueros analizados siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal frente a los subtipos y linajes de gripe A y B.

3. **Análisis por cohortes del efecto de la vacuna trivalente anual sobre la generación de Acs HAs frente a los virus epidémicos de gripe A y B**

- Subtipo A/H1N1pdm09:

Los valores de los títulos obtenidos mediante RIH de los sueros pre y post-vacunales de la población ≥ 65 años permitieron hallar la TPP, TS, TPV y la TSC en todas las cohortes del estudio frente al subtipo A/H1N1pdm09 (Tabla 15).

| Subtipo A/H1N1pdm09 | Cohortes | | | |
|---------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| N° Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| N° de Pre-Protegidos | 0 | 1 | 1 | 4 |
| Tasa protección previa | 0,0 | 2,3 | 2,3 | 9,3 |
| N° de Post-Protegidos | 6 | 9 | 10 | 37 |
| Tasa Seroprotección | 13,3 | 20,9 | 23,3 | 86,0 |
| N° Protegidos por vacuna | 6 | 8 | 9 | 33 |
| Tasa Protección Vacunal | 13,3 | 18,6 | 20,9 | 76,7 |
| Seroconversiones | 6 | 6 | 9 | 34 |
| Tasa Seroconversión | 13,3 | 14,0 | 20,9 | 79,1 |

Tabla 15. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente al subtipo A/H1N1pdm09.

Frente al subtipo pandémico, los valores de TS, TPV y TSC analizados se mantuvieron estables en las tres primeras cohortes, mientras que sufrieron un gran aumento en la cohorte de la temporada 2010-2011, alcanzando la TPV valores del 76,7% y la TSC valores del 86,0% (Figura 40).

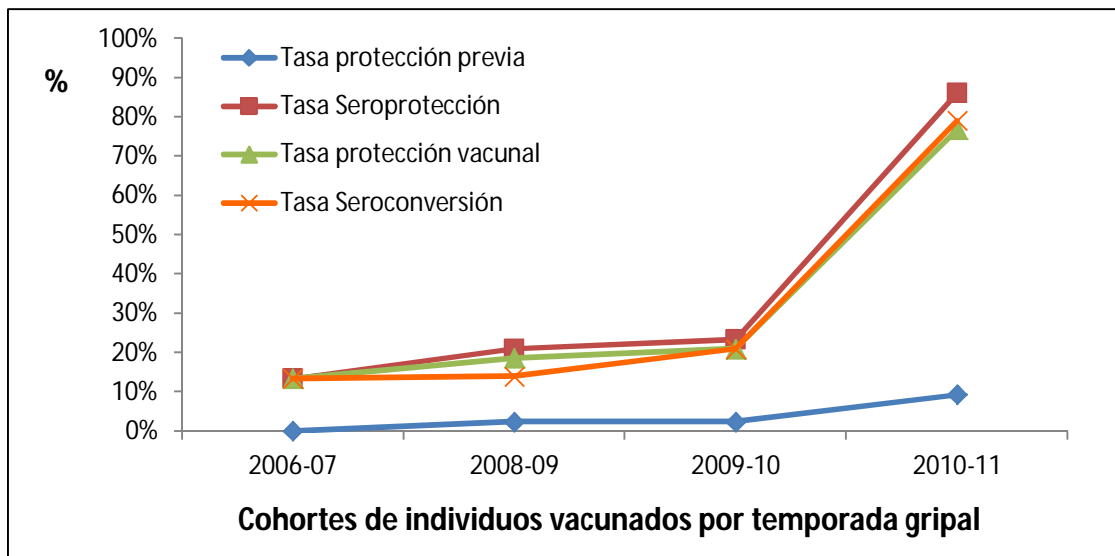


Figura 40. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente al subtipo A/H1N1pdm09.

- Subtipo A/H1N1:

Los valores de la TPV, TS, TPV y TSC en las cohortes analizadas en el estudio frente al subtipo A/H1N1 se describen en la Tabla 16.

| Subtipo A/H1N1 | Cohortes | | | |
|--------------------------|----------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| N° Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| N° de Pre-Protegidos | 23 | 12 | 10 | 23 |
| Tasa protección previa | 51,1 | 27,9 | 23,3 | 53,5 |
| N° de Post-Protegidos | 37 | 36 | 25 | 29 |
| Tasa Seroprotección | 82,2 | 83,7 | 58,1 | 67,4 |
| N° Protegidos por vacuna | 14 | 24 | 15 | 6 |
| Tasa Protección Vacunal | 31,1 | 55,8 | 34,9 | 14,0 |
| Seroconversiones | 19 | 26 | 7 | 7 |
| Tasa Seroconversión | 42,2 | 60,5 | 16,3 | 16,3 |

Tabla 16. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente al subtipo A/H1N1.

Frente al subtipo A/H1N1, la TS disminuyó desde el 83,7% en la cohorte de la temporada 2008-09 hasta la cohorte de la temporada 2010-11 (67,4%) (Figura 41). La TPV y la TSC aumentaron en la cohorte de la temporada 2008-2009, y después disminuyó en las dos cohortes de las últimas dos temporadas del estudio (2010-11; 14,0% y 16,3% respectivamente).

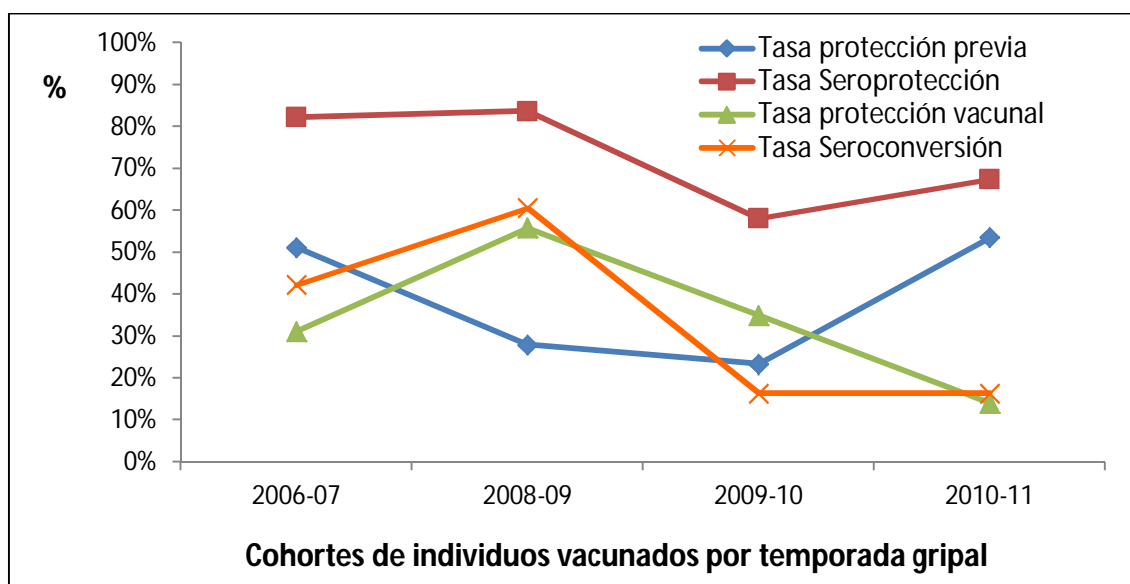


Figura 41. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente al subtipo A/H1N1.

- Subtipo A/H3N2:

Los valores de la TPP, TS, TPV y TSC en todas las cohortes del estudio frente al subtipo A/H3N2 están expuestos en la Tabla 17.

| Subtipo A/H3N2 | Cohortes | | | |
|---------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| N° Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| N° de Pre-Protegidos | 25 | 17 | 22 | 32 |
| Tasa protección previa | 55,6 | 39,5 | 51,2 | 74,4 |
| N° de Post-Protegidos | 42 | 39 | 36 | 41 |
| Tasa Seroprotección | 93,3 | 90,7 | 83,7 | 95,3 |
| N° Protegidos por vacuna | 17 | 22 | 14 | 9 |
| Tasa Protección Vacunal | 37,8 | 51,2 | 32,6 | 20,9 |
| Seroconversiones | 28 | 32 | 13 | 22 |
| Tasa Seroconversión | 62,2 | 74,4 | 30,2 | 51,2 |

Tabla 17. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente al subtipo A/H3N2.

La TS fue muy elevada frente al subtipo A/H3N2 en todas las cohortes analizadas, con valores entre el 83,7% (2009-10) y el 95,3% (2010-11) (Figura 42). La TPV y TSC mostraron los valores más elevados del estudio en la cohorte de la temporada 2008-09 (51,2% y 74,4% respectivamente), disminuyendo la TPV y mostrando oscilaciones la TSC en las dos últimas cohortes analizadas.

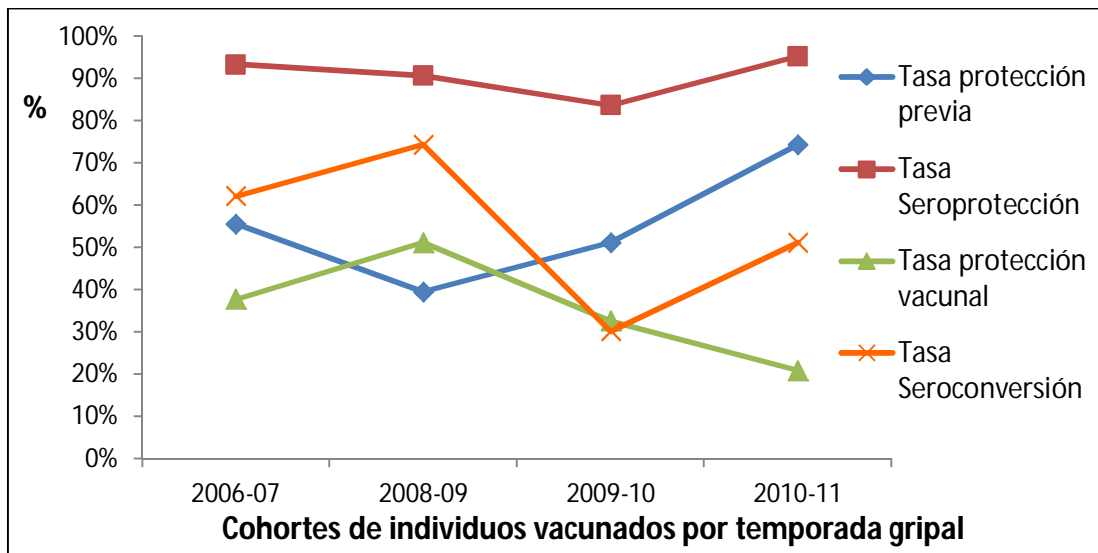


Figura 42. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente al subtipo A/H3N2.

- Linaje B/Yamagata:

Los valores de la TPP, TS, TPV y TSC de todas las cohortes del estudio frente al linaje B/Yamagata están expuestos en la Tabla 18.

| Linaje B(Yam) | Cohortes | | | |
|---------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| N° Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| N° de Pre-Protegidos | 13 | 11 | 16 | 19 |
| Tasa protección previa | 28,9 | 25,6 | 37,2 | 44,2 |
| N° de Post-Protegidos | 19 | 26 | 20 | 23 |
| Tasa Seroprotección | 42,2 | 60,5 | 46,5 | 53,5 |
| N° Protegidos por vacuna | 6 | 15 | 4 | 4 |
| Tasa Protección Vacunal | 13,3 | 34,9 | 9,3 | 9,3 |
| Seroconversiones | 5 | 15 | 2 | 2 |
| Tasa Seroconversión | 11,1 | 34,9 | 4,7 | 4,7 |

Tabla 18. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente al linaje B/Yamagata.

La TS frente al linaje B/Yamagata osciló entre el 42-53% en todas cohortes a excepción de la cohorte de la temporada 2008-2009 (60,5%) (Figura 43). La TPV y la TSC fueron más elevadas en la cohorte de la temporada 2008-09 (34,9% ambas), teniendo valores similares aunque inferiores en las otras tres cohortes restantes (por debajo del 14%).

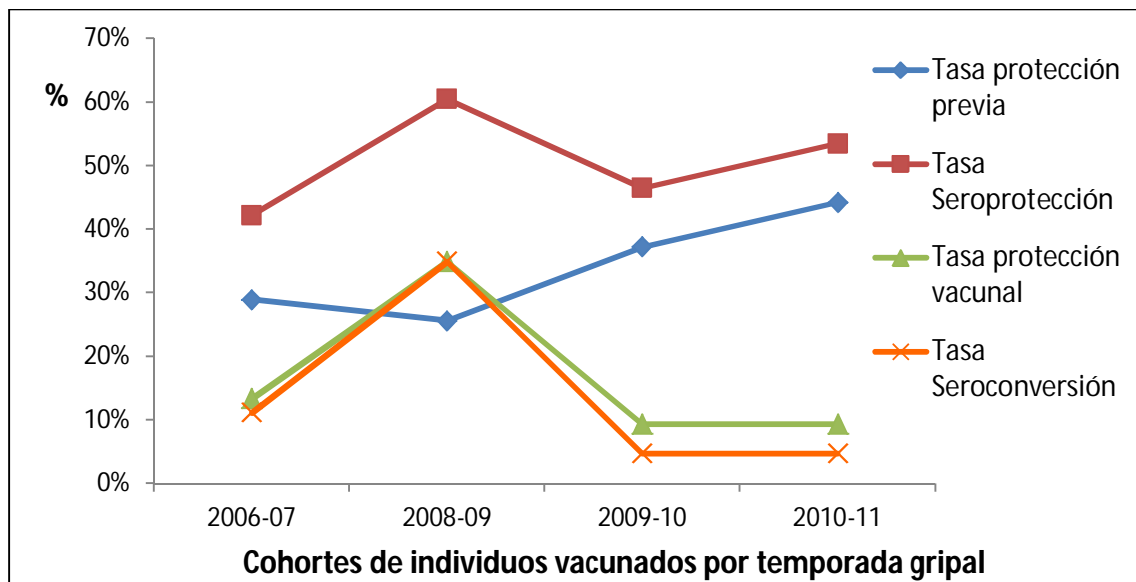


Figura 43. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente al linaje B/Yamagata.

- Linaje B/Victoria:

Los valores de la TS, TPV y TSC en todas las cohortes del estudio frente al linaje B/Victoria se describen en la Tabla 19.

| Linaje B(Vict) | Cohortes | | | |
|---------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| N° Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| N° de Pre-Protegidos | 14 | 21 | 13 | 24 |
| Tasa protección previa | 31,1 | 48,8 | 30,2 | 55,8 |
| N° de Post-Protegidos | 29 | 27 | 19 | 35 |
| Tasa Seroprotección | 64,4 | 62,8 | 44,2 | 81,4 |
| N° Protegidos por vacuna | 15 | 6 | 6 | 11 |
| Tasa Protección Vacunal | 33,3 | 14,0 | 14,0 | 25,6 |
| Seroconversiones | 16 | 4 | 6 | 11 |
| Tasa Seroconversión | 35,6 | 9,3 | 14,0 | 25,6 |

Tabla 19. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente al linaje B/Victoria.

Los valores de la TS estuvieron en torno al 40-60% en todas las cohortes, a excepción de la cohorte de la temporada 2010-11 que mostró un valor del 81,4% (Figura 44). Se registraron los valores de la TPV y TSC más elevados en la cohorte de la temporada 2006-07 (33,3% y 35,6% respectivamente), mientras que en las cohortes de las temporadas 2008-09 y 2009-10 el porcentaje se situó en torno al 10-14%. El valor de la TPV y de la TSC fue del 25,6% para ambos parámetros en la cohorte de la temporada 2010-11.

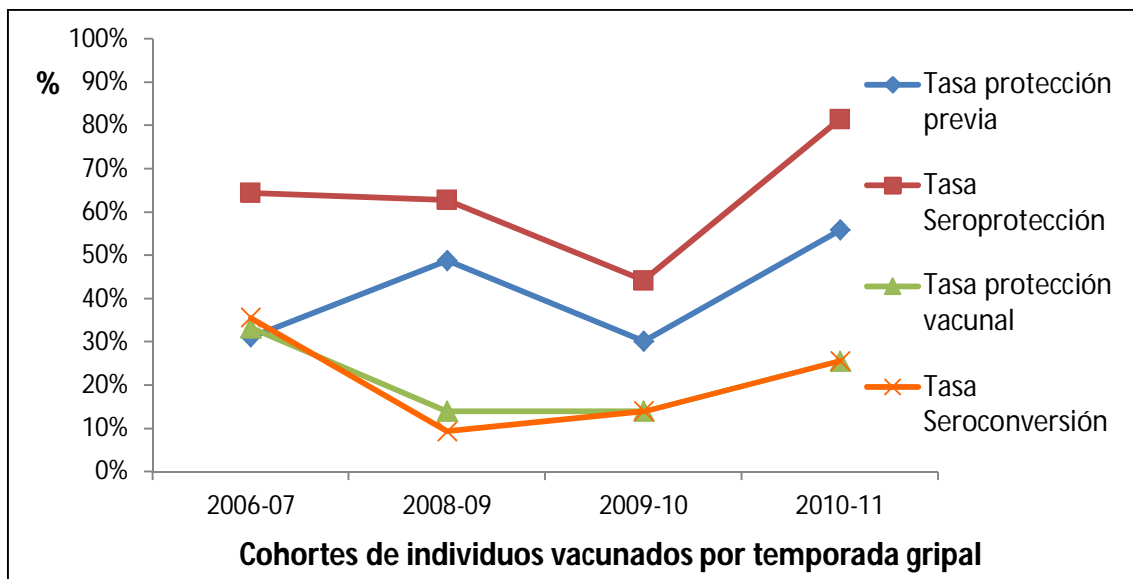


Figura 44. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente al linaje B/Victoria.

4. Análisis estadístico de la respuesta inmune humoral a la vacunación trivalente anual sobre la generación de Acs HAs frente a los virus de gripe A y B estacionales

Para comprobar si la vacuna trivalente anual indujo un efecto significativo en cuanto al número de individuos que seroconvirtieron en función de las cohortes analizadas, se realizó un test de McNemar ($\alpha=0,05$) cuyos valores p-valor se describen en la Tabla 20. La seroconversión fue significativa frente a todos los subtipos de virus de la gripe A en todas las cohortes analizadas (Test de McNemar; $p<0,05$). El número de individuos que seroconvirtieron fue significativo frente al linaje B/Yamagata en las cohortes de las temporadas 2006-07 y 2008-09, mientras que frente al linaje B/Victoria fue significativo en todas las cohortes a excepción de la seroconversión en la cohorte de la temporada 2008-09.

| Subtipo o linaje | Niveles de significación- Test de McNemar | | | |
|--------------------|---|---------|---------|---------|
| | Cohortes | | | |
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| <i>A/H1N1pdm09</i> | 0,031 | 0,031 | 0,004 | 0,000 |
| <i>A/H1N1</i> | 0,000 | 0,000 | 0,016 | 0,016 |
| <i>A/H3N2</i> | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <i>B(Yam)</i> | 0,008 | 0,000 | 0,500 | 0,500 |
| <i>B(Vict)</i> | 0,000 | 0,125 | 0,031 | 0,001 |

Tabla 20. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de seroconversión frente a los subtipos y linajes de gripe A y B estacionales.

Los valores de las MGTs pre y post-vacunales y de la RIC en cada cohorte e individuos frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B se encuentran representados en las Tabla 21. Los valores del intervalo de confianza al 95% de las MGTs pre y post-vacunales también han sido incluidos en la misma tabla.

| Subtipo o linaje | MGTs pre y post-vacunales y RIC | | | |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Cohortes | | | |
| | 2006-2007 MGT (IC95%) | 2008-2009 MGT (IC95%) | 2009-2010 MGT (IC95%) | 2010-2011 MGT (IC95%) |
| MGTs PreA/H1N1pdm09 | 1,5 (1,2-1,9) | 1,6 (1,1-2,3) | 1,9 (1,3-2,6) | 2,4 (1,7-3,7) |
| MGTs PostA/H1N1pdm09 | 5,4 (3,4-8,7) | 7,5 (4,8-11,2) | 7,2 (4,2-11,9) | 93,0 (54,3-150,0) |
| RIC-A/H1N1pdm09 | 3,6 | 4,7 | 3,8 | 38,8 |
| MGTs PreA/H1N1 | 34,5 (27,6-51,2) | 13,6 (8,3-21,1) | 13,2 (8,6-19,8) | 29,8 (21,7-39,8) |
| MGTs PostA/H1N1 | 112,3 (69,7-145,8) | 103,5 (72,3-147,4) | 27,8 (19,5-37,4) | 50,1 (37,9-66,7) |
| RIC-A/H1N1 | 3,3 | 7,6 | 2,1 | 1,7 |
| MGTs PreA/H3N2 | 41,7 (32,7-72,7) | 18,5 (10,6-32,8) | 35,0 (21,1-59,5) | 46,2 (35,6-61,6) |
| MGTs PostA/H3N2 | 242,5 (148-1-289,0) | 239,4 (152,5-359,4) | 94,0 (65,8-136,0) | 182,0 (119,4-224,9) |
| RIC-A/H3N2 | 5,8 | 12,9 | 2,7 | 3,9 |
| MGTs PreB(Yam) | 12 (8,0-17,6) | 8,7 (5,2-15,1) | 11,0 (6,4-18,1) | 20,1 (13,1-29,2) |
| MGTs PostB(Yam) | 20,6 (35,8-74,1) | 40,2 (26,3-60,6) | 15,6 (9,0-25,0) | 27,5 (17,6-40,6) |
| RIC-B(Yam) | 1,7 | 4,6 | 1,4 | 1,4 |
| MGTs PreB(Vict) | 12,2 (7,4-20,1) | 31,3 (20,2-48,6) | 8,1 (4,9-12,9) | 27,5 (17,6-41,6) |
| MGTs PostB(Vict) | 52 (35,8-74,1) | 48,3 (34,7-70,7) | 15,5 (9,4-24,5) | 71,5 (50,7-110,1) |
| RIC-B(Vict) | 4,3 | 1,5 | 1,9 | 2,6 |

Tabla 21. MGTs de los sueros pre y post-vacunales y RIC de cada cohorte frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B. Intervalo de Confianza al 95% (IC95%).

Se realizó un ANOVA de un factor (test de Bonferroni; $\alpha=0,05$) utilizando los valores de los títulos geométricos pre y post-vacunales para conocer si el efecto de la vacunación medido como RIC para cada subtipo y linaje fue diferente entre las distintas cohortes estudiadas (Tabla 22). Se observaron diferencias significativas en la RIC entre la cohorte de la temporada 2010-11 y el resto de cohortes frente al subtipo A/H1N1pdm09 ($p<0,05$). Del mismo modo, se observaron también diferencias significativas entre la cohorte de la temporada 2008-09 y el resto de cohortes frente al subtipo A/H1N1 ($p<0,05$). En el caso del subtipo A/H3N2 se observaron diferencias significativas entre las cohortes de la temporada 2008-09 con las cohortes de las temporadas 2009-10 y 2010-11, y también entre las cohortes de las temporadas 2006-07 y 2009-10. En el caso de los linajes de gripe B se observaron diferencias significativas entre la cohorte de la temporada 2008-09 y el resto de cohortes frente al linaje B/Yamagata, y frente al linaje B/Victoria entre la cohorte de la temporada 2006-07 frente a las cohortes 2008-09 y 2009-10.

p-valor - Bonferroni $\alpha=0,05$

| Cohorte modelo | Cohorte comparada | Subtipo o linaje | | | | |
|----------------|-------------------|------------------|--------|--------|------------|------------|
| | | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B/Yamagata | B/Victoria |
| 2006-07 | 2008-09 | 1,000 | 0,007 | 0,113 | 0,000 | 0,002 |
| | 2009-10 | 1,000 | 0,062 | 0,046 | 1,000 | 0,012 |
| | 2010-11 | 0,000 | 0,086 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| 2008-09 | 2006-07 | 1,000 | 0,007 | 0,113 | 0,000 | 0,002 |
| | 2009-10 | 1,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,000 |
| | 2010-11 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,000 | 0,102 |
| 2009-10 | 2006-07 | 1,000 | 0,062 | 0,046 | 1,000 | 0,012 |
| | 2008-09 | 1,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,000 |
| | 2010-11 | 0,000 | 1,000 | 0,685 | 1,000 | 0,325 |
| 2010-11 | 2006-07 | 0,000 | 0,086 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | 2008-09 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,000 | 0,102 |
| | 2009-10 | 0,000 | 1,000 | 0,685 | 1,000 | 0,325 |

Tabla 22. Valores de significación estadística (p-valor) de la comparación de la RIC entre las distintas cohortes frente a los subtipos y linajes de gripe A y B.

El análisis de los valores TS, TSC y RIC siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal para individuos ≥ 60 años se exponen en la Tabla 23.

| Subtipo o linaje | Criterio EMA | Cohortes | | | |
|------------------|---------------------|----------|---------|---------|---------|
| | | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| A/H1N1pdm09 | Tasa Seroprotección | 13,3 | 20,9 | 23,3 | 86,0 |
| | Tasa Seroconversión | 13,3 | 14,0 | 20,9 | 79,1 |
| | Razón de Incremento | 3,6 | 4,7 | 3,8 | 38,8 |
| A/H1N1 | Tasa Seroprotección | 82,2 | 83,7 | 58,1 | 67,4 |
| | Tasa Seroconversión | 42,2 | 60,5 | 16,3 | 16,3 |
| | Razón de Incremento | 3,3 | 7,6 | 2,1 | 1,7 |
| A/H3N2 | Tasa Seroprotección | 93,3 | 90,7 | 83,7 | 95,3 |
| | Tasa Seroconversión | 62,2 | 74,4 | 30,2 | 51,2 |
| | Razón de Incremento | 5,8 | 12,9 | 2,7 | 3,9 |
| B/Yamagata | Tasa Seroprotección | 42,2 | 60,5 | 46,5 | 53,5 |
| | Tasa Seroconversión | 11,1 | 34,9 | 4,7 | 4,7 |
| | Razón de Incremento | 1,7 | 4,6 | 1,4 | 1,4 |
| B/Victoria | Tasa Seroprotección | 64,4 | 62,8 | 44,2 | 81,4 |
| | Tasa Seroconversión | 35,6 | 9,3 | 14,0 | 25,6 |
| | Razón de Incremento | 4,3 | 1,5 | 1,9 | 2,6 |

*Color verde: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA

**Color rojo: Valor inferior al *cut-off* del criterio EMA

Tabla 23. Valores por cohorte de la TS, TSC y RIC de los sueros analizados siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal frente a los subtipos y linajes de gripe A y B.

El análisis de los parámetros EMA para cada subtipo mostró que se alcanzaron todos los valores *cut-off* en la cohorte de la temporada 2010-11 frente al subtipo A/H1N1pdm09, en las cohortes de las temporadas 2006-07 y 2008-09 frente al subtipo A/H1N1, en todas las cohortes frente al subtipo A/H3N2, en la cohorte de la temporada 2008-09 frente al linaje B/Yamagata y en la cohorte de la temporada 2006-07 frente al linaje B/Victoria.

5. Análisis de los Acs HAs pre-vacunales y de la respuesta inmune humoral a la vacuna trivalente anual frente a los virus de la gripe A y B en función de la edad y el sexo

Para el análisis de las diferencias en la presencia de Acs HAs pre-vacunales y en la RIC tras la vacunación en función de la edad y el sexo, se estratificó la población en seis grupos etarios, 65-74 años (Grupo G1), 75-84 años (Grupo G2), ≥ 85 años (Grupo G3), 65-84 años (Grupo G4), 65-70 años (Grupo G5) y ≥ 71 años (Grupo G6). Las MGTs pre-vacunales y la RIC para los diferentes grupos etarios y sexos se encuentran descritos en las Tablas 24 y 25.

| | Grupo etario | Edad | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|--------------------|--------------------------|-----------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | | | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| MGTs pre-vacunales | G1 (n ₁ =74) | 65-74 | 1,6 | 23,8 | 32,6 | 19,1 | 22,7 |
| | G2 (n ₂ =77) | 75-84 | 1,7 | 19,1 | 33,0 | 21,8 | 24,0 |
| | G3 (n ₃ =23) | ≥ 85 | 3,2 | 18,3 | 38,8 | 28,6 | 68,7 |
| | G4 (n ₄ =151) | 65-84 | 1,6 | 21,3 | 32,7 | 20,5 | 23,4 |
| | G5 (n ₅ =51) | 65-70 | 1,7 | 26,9 | 33,5 | 11,0 | 10,6 |
| | G6 (n ₆ =123) | ≥ 71 | 1,8 | 18,8 | 33,5 | 13,0 | 20,7 |
| RIC | G1 (n ₁ =74) | 65-74 | 7,3 | 2,6 | 4,4 | 1,7 | 2,2 |
| | G2 (n ₂ =77) | 75-84 | 7,5 | 3,1 | 5,6 | 1,9 | 2,9 |
| | G3 (n ₃ =23) | ≥ 85 | 5,2 | 5,1 | 8,5 | 3,8 | 1,6 |
| | G4 (n ₄ =151) | 65-84 | 7,4 | 2,8 | 5,0 | 1,8 | 2,6 |
| | G5 (n ₅ =51) | 65-70 | 11,0 | 2,4 | 4,2 | 1,6 | 2,2 |
| | G6 (n ₆ =123) | ≥ 71 | 5,9 | 3,4 | 5,9 | 2,1 | 2,5 |

Tabla 24. Distribución por edad de las MGTs de Acs HAs de los sueros pre-vacunales y la RIC frente a virus de gripe A y B.

| | Sexo | Subtipos y linajes | | | | |
|------------------------------------|--------------|--------------------|------|------|--------|---------|
| | | H1pdm09 | H1N1 | H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| Media títulos pre vacunales | Varón | 1,8 | 23,4 | 37,5 | 22,2 | 27,6 |
| | Mujer | 1,8 | 17,9 | 31,3 | 20,2 | 26,1 |
| Media RIC (efecto vacuna) | Varón | 7,1 | 2,7 | 5,4 | 1,7 | 2,5 |
| | Mujer | 7,1 | 3,6 | 5,3 | 2,4 | 2,3 |

Tabla 25. Distribución por sexo de las MGTs de Acs HAs de los sueros pre-vacunales y la RIC frente a virus de gripe A y B.

El análisis de los títulos de Acs HAs pre-vacunales en función de la edad se realizó mediante el uso del estadístico de contraste T de Student de muestras independientes (Tabla 26), y mostró diferencias significativas entre los grupos G1 y G2 con respecto al grupo G3, y del grupo G3 con respecto al G4 frente al subtipo A/H1N1pdm09 ($p < 0,05$) y frente al linaje B/Victoria ($p < 0,01$). Por su parte, la RIC fue significativamente diferente entre los grupos G1 y G2 con respecto al grupo G3, y el grupo G3 respecto al grupo G4 frente al linaje B/Yamagata ($p < 0,01$). No se encontraron más diferencias entre el resto de comparaciones y subtipos analizados. El análisis del título de Acs HAs pre-vacunales y la RIC en función del sexo no mostró diferencias significativas entre hombres y mujeres.

| Subtipos | | Valores T de Student y de significación (p-valor) entre los diferentes grupos etarios | | | | | | | | | |
|---------------------------|--------------------|---|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|---------|
| | | G1 vs G2 | | G2 vs G3 | | G1 vs G3 | | G3 vs G4 | | G5 vs G6 | |
| | | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor |
| MGTs pre-vacunales | A/H1N1pdm09 | 0,592 | 0,555 | 2,155 | 0,034 | 2,543 | 0,013 | 2,615 | 0,010 | 0,464 | 0,643 |
| | A/H1N1 | 0,945 | 0,346 | 0,120 | 0,905 | 0,792 | 0,431 | 0,468 | 0,640 | 1,494 | 0,137 |
| | A/H3N2 | 0,043 | 0,966 | 0,392 | 0,696 | 0,453 | 0,652 | 0,168 | 0,647 | 0,005 | 0,996 |
| | B(Yam) | 0,963 | 0,337 | 1,187 | 0,238 | 1,853 | 0,067 | 1,695 | 0,092 | 1,208 | 0,229 |
| | B(Vict) | 0,365 | 0,716 | 4,548 | 0,000 | 4,318 | 0,000 | 4,809 | 0,000 | 2,464 | 0,015 |
| RIC | A/H1N1pdm09 | 0,254 | 0,800 | 0,172 | 0,864 | 0,013 | 0,989 | 0,077 | 0,938 | 1,884 | 0,061 |
| | A/H1N1 | 0,404 | 0,687 | 1,809 | 0,074 | 1,982 | 0,050 | 2,014 | 0,046 | 1,166 | 0,245 |
| | A/H3N2 | 1,064 | 0,289 | 1,239 | 0,218 | 1,809 | 0,074 | 1,697 | 0,091 | 0,937 | 0,350 |
| | B(Yam) | 0,454 | 0,650 | 3,943 | 0,000 | 3,857 | 0,000 | 4,651 | 0,000 | 2,062 | 0,041 |
| | B(Vict) | 1,868 | 0,064 | 1,825 | 0,071 | 0,845 | 0,400 | 1,452 | 0,148 | 1,488 | 0,139 |

*T = Valor T de Student

Tabla 26. Valores T de Student y significación estadística (p-valor) en el nivel de Acs HAs pre-vacunales y la RIC entre los distintos grupos etarios frente a los subtipos y linajes de gripe A y B



6. Análisis de la respuesta inmune humoral frente a los virus de gripe A y B en función del tipo de vacuna utilizada

Para el análisis de la respuesta humoral en función del tipo de vacuna administrada, se estratificaron dos grupos en función de la naturaleza de estas vacunas, ya sean Adyuvadas o Fraccionadas (VAD y VFR respectivamente). El análisis se realizó atendiendo a la tasa de seroconversión y a la RIC entre los títulos geométricos pre y post-vacunales para cada tipo de vacuna frente a los virus de gripe A y B estacionales analizados. Para el estudio de la seroconversión se realizó un test Chi-cuadrado ($\chi^2-\alpha=0,05$), mientras que en el caso de la RIC se realizó un test estadístico T de Student para muestras independientes ($\alpha=0,05$). Los valores de la Tasa de Seroconversión de cada tipo de vacuna frente a cada subtipo o linaje de gripe A y B y los valores de la RIC se encuentran expuestos en la Tabla 27.

| Subtipos y linajes | Tasa de Seroconversión | | Chi-cuadrado | | Valores de RIC | | T de Student | |
|--------------------|------------------------|-----------------------|--------------|--------------|----------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| | Adyuvadas | Fraccionadas | χ^2 * | p-valor | Adyuvadas | Fraccionadas | T** | p-valor |
| | (n ₁ =71) | (n ₂ =103) | | | (n ₁ =71) | (n ₂ =103) | | |
| A/H1N1pdm09 | 39,4 | 26,2 | 3,339 | 0,065 | 8,4 | 6,3 | 1,306 | 0,193 |
| A/H1N1 | 43,7 | 28,3 | 4,473 | 0,034 | 4,0 | 2,6 | 1,386 | 0,167 |
| A/H3N2 | 67,6 | 47,6 | 6,837 | 0,009 | 7,4 | 4,2 | 2,23 | 0,027 |
| B(Yam) | 18,3 | 10,7 | 2,058 | 0,151 | 2,3 | 1,8 | 0,161 | 0,098 |
| B(Vict) | 23,9 | 23,3 | 0,01 | 0,922 | 2,5 | 2,3 | 1,18 | 0,24 |

* χ^2 = Valor Chi-cuadrado

**T = Valor T de Student

Tabla 27. Valores Chi-cuadrado (Seroconversión), T de Student (RIC) y valores de significación estadística de cada tipo de vacuna (VAD y VFR) frente a los subtipos y linajes de gripe A y B.

La TSC fue significativamente diferente entre las vacunas tipo VAD y VFR frente a los subtipos A/H1N1 ($p<0,05$) y A/H3N2 ($p<0,01$), siendo la seroconversión más elevada frente a ambos subtipos en las vacunas de tipo VAD. En el caso de la RIC, solo se observaron diferencias significativas frente al subtipo A/H3N2 ($p<0,05$), siendo más elevada la RIC en el caso de las vacunas de tipo VAD. No se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de vacunas frente al subtipo A/H1N1pdm09 ni los linajes B/Yamagata ni B/Victoria ni en la seroconversión ni en la Razón de Incremento.

Estudio de los Acs HAs pre-vacunales y la respuesta inmune humoral heterotípica frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas tras la vacunación con vacuna trivalente anual

En este epígrafe se estudió la presencia de Acs HAs pre-vacunales en la población ≥ 65 años frente a las cepas A/Weiss/43 y A/FM/1/47. Estas dos cepas pertenecen al subtipo A/H1N1 de virus de la gripe que circularon en la década de 1940 como continuación de la variación antigénica menor de la cepa pandémica de Gripe Española de 1918. Además de estudiar el nivel de Acs pre-vacunales, se valoró el aumento de Acs protectores frente a dichos virus tras la vacunación anual trivalente antigripal.

1. Análisis del nivel de Acs HAs pre-vacunales totales y por cohorte frente a las cepas A/Weiss/43 y A/FM/1/47

Análisis global de los Acs HAs pre-vacunales frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas:

El análisis de los títulos de Acs de los sueros pre-vacunales frente a las cepas de virus A/H1N1 antiguas mostró títulos protectores ($\geq 1/40$) en el 43,7% de la población estudiada frente a la cepa A/Weiss/43 ($n_1=76$) y en el 20,1% frente a la cepa A/FM/1/47 ($n_2=35$) (Tabla 28) (Figura 45).

Valores absolutos y % de títulos

| Título | A/Weiss/43 | | A/FM/1/47 | |
|---------------------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 36 | 20,7 | 54 | 31,0 |
| 10 | 31 | 17,8 | 55 | 31,6 |
| 20 | 31 | 17,8 | 30 | 17,2 |
| 40 | 29 | 16,7 | 22 | 12,6 |
| 80 | 25 | 14,4 | 9 | 5,2 |
| 160 | 11 | 6,3 | 4 | 2,3 |
| 320 | 6 | 3,4 | 0 | 0,0 |
| 640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| >640 | 5 | 2,9 | 0 | 0,0 |
| Titulos $\geq 1/40$ | 76 | 43,7 | 35 | 20,1 |

Tabla 28. Distribución global de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

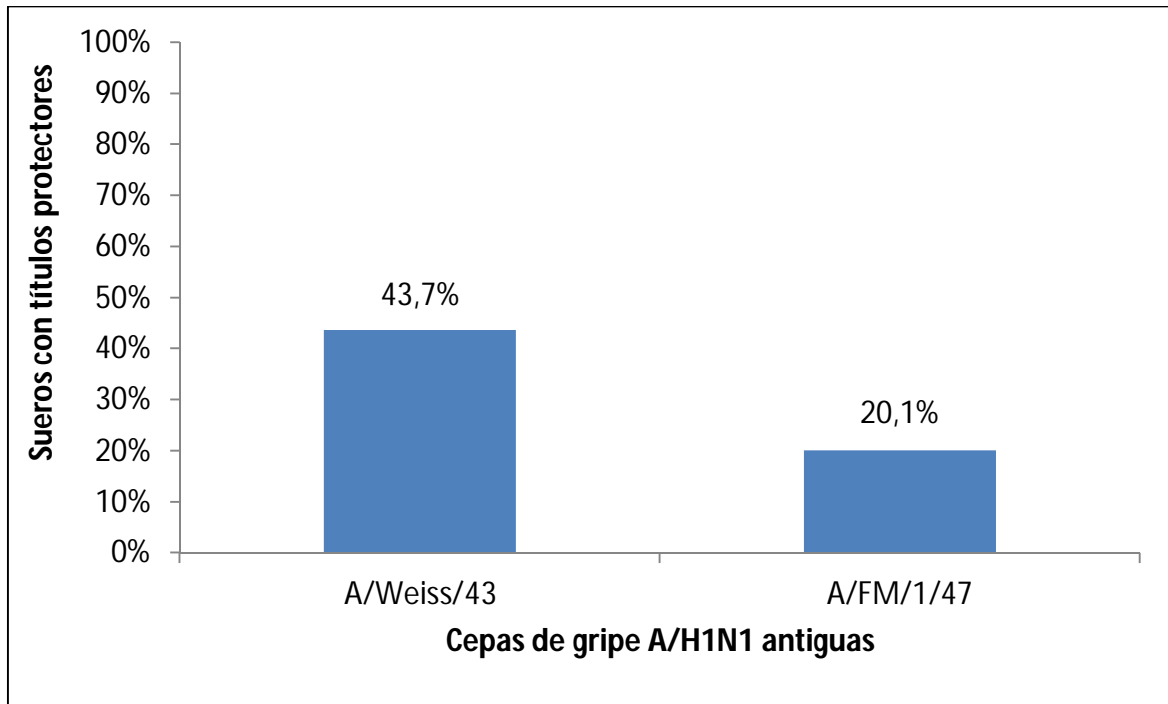


Figura 45. Distribución porcentual global de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs HAs frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

Análisis por cohortes de los Acs HAs pre-vacunales frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas:

Frente a la cepa A/Weiss/43 se observaron Acs pre-vacunales en todas las cohortes analizadas (Tabla 29). El mayor porcentaje de individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a esta cepa se observó en la cohorte de la temporada 2006-07 (66,7%) y el menor porcentaje en la cohorte de la temporada 2008-09 (20,9%). Gran parte de los sueros que mostraron títulos protectores mostraron títulos de 1/40 o cercanos a este valor. Sin embargo algunos sueros mostraron títulos pre-vacunales por encima de 1/160, sobre todo en la cohorte de la temporada 2006-07, en la que se observaron 10 sueros con títulos mayores a este valor. La cohorte que menos sueros mostró con títulos por encima de 1/160 fue la de la temporada 2008-09, que se correspondió con la temporada que mayor media de edad poseía.

Cepa A/Weiss/43 - Cohortes de población

| Título | 2006-07 | | 2008-09 | | 2009-10 | | 2010-11 | |
|----------------------|-----------|-------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 5 | 11,1 | 14 | 32,6 | 7 | 16,3 | 10 | 23,3 |
| 10 | 4 | 8,9 | 10 | 23,3 | 9 | 20,9 | 8 | 18,6 |
| 20 | 6 | 13,3 | 10 | 23,3 | 10 | 23,3 | 5 | 11,6 |
| 40 | 10 | 22,2 | 5 | 11,6 | 8 | 18,6 | 6 | 14,0 |
| 80 | 10 | 22,2 | 2 | 4,7 | 6 | 14,0 | 7 | 16,3 |
| 160 | 6 | 13,3 | 2 | 4,7 | 1 | 2,3 | 2 | 4,7 |
| 320 | 2 | 4,4 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 | 4 | 9,3 |
| 640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| >640 | 2 | 4,4 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 | 1 | 2,3 |
| Títulos ≥1/40 | 30 | 66,7 | 9 | 20,9 | 17 | 39,5 | 20 | 44,2 |

Tabla 29. Distribución de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs en las cohortes del estudio frente a la cepa A/Weiss/43.

En el caso de la cepa A/FM/1/47, se observaron Acs pre-vacunales también en todas las cohortes incluidas en el estudio (Tabla 30). El mayor porcentaje de individuos con Acs HAs con títulos protectores fue observado en la cohorte de la temporada 2006-07 (26,6%), en un porcentaje muy similar a los observados en la cohorte de la temporada 2009-10 (25,6%). La cohorte con el menor porcentaje de sueros con títulos protectores correspondió a la de la temporada 2008-09 (9,3%). La mayor parte de los sueros con títulos protectores se correspondieron con títulos de 1/40 o 1/80. Frente a la cepa A/FM/1/47 se observó un bajo porcentaje de sueros con títulos superiores o iguales a 1/160, únicamente en la cohorte de la temporada 2006-07 (2 sueros con títulos de 1/160) y 1 suero con título 1/160 en cada una de las cohortes de las temporadas 2009-10 y 2010-11.

Cepa A/FM/1/47 - Cohortes de población

| Título | 2006-07 | | 2008-09 | | 2009-10 | | 2010-11 | |
|----------------------|-----------|-------------|----------|------------|-----------|-------------|----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 17 | 37,8 | 24 | 55,8 | 6 | 14,0 | 7 | 16,3 |
| 10 | 8 | 17,8 | 12 | 27,9 | 18 | 41,9 | 17 | 39,5 |
| 20 | 8 | 17,8 | 3 | 7,0 | 8 | 18,6 | 11 | 25,6 |
| 40 | 6 | 13,3 | 3 | 7,0 | 8 | 18,6 | 5 | 11,6 |
| 80 | 4 | 8,9 | 1 | 2,3 | 2 | 4,7 | 2 | 4,7 |
| 160 | 2 | 4,4 | 0 | 0,0 | 1 | 2,3 | 1 | 2,3 |
| 320 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| 640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| >640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Títulos ≥1/40 | 12 | 26,6 | 4 | 9,3 | 11 | 25,6 | 8 | 18,6 |

Tabla 30. Distribución de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs en las cohortes del estudio frente a la cepa A/FM/1/47.

Ambas cepas de gripe A/H1N1 antiguas mostraron el mayor porcentaje de sueros con títulos pre-vacunales protectores en la cohorte de la temporada 2006-07. Mientras que en el caso de la cepa A/Weiss/43 se observó un descenso en este porcentaje de Acs en las últimas cohortes del estudio, en el caso de la cepa A/FM/1/47 el porcentaje no varió a lo largo de todas las cohortes incluidas (Figura 46).

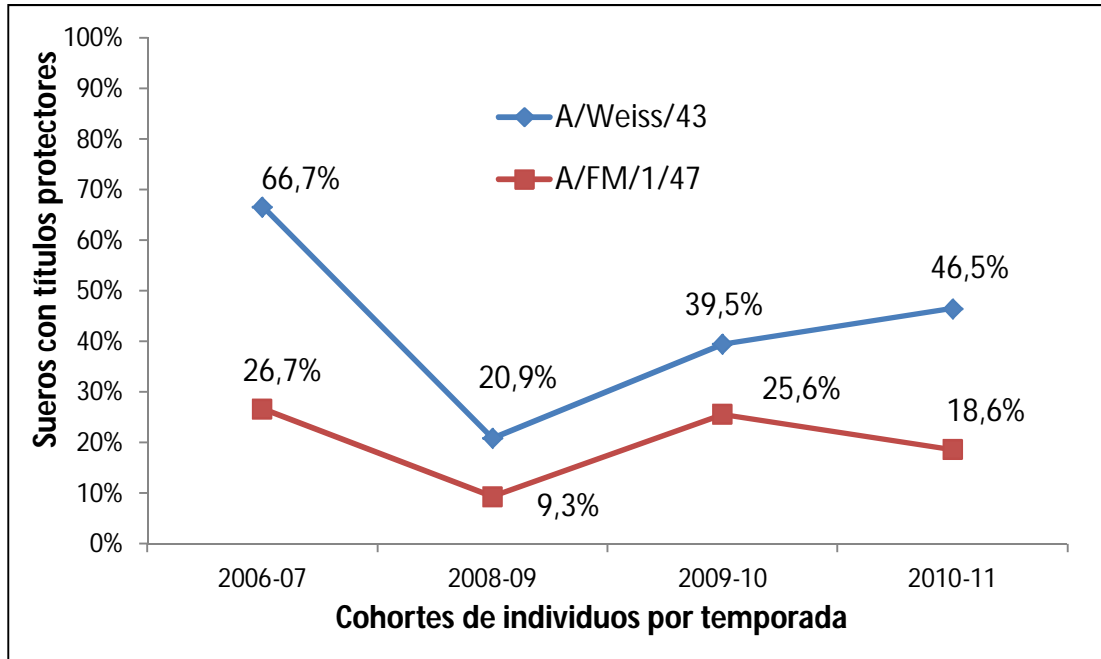


Figura 46. Distribución porcentual por cohorte de los individuos con títulos protectores pre-vacunales frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

2. **Análisis global del efecto de la vacuna trivalente anual sobre la generación de Acs HAs frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas**

Los valores de la TPP, TS, TPV y TSC obtenidos mediante el estudio RIH de los sueros pre y post-vacunales frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas están expuestos en la Tabla 31. De forma global, la vacuna indujo un aumento de los Acs HAs hasta títulos protectores en el 19,5% (TPV) de los individuos frente a la cepa A/Weiss/43, mientras que frente a la cepa A/FM/1/47 este aumento se observó en el 10,9% de los sujetos.

| | Cepas de gripe A/H1N1 antiguas | |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------|
| | A/Weiss/43 | A/FM/1/47 |
| N° Total de Sueros | 174 | 174 |
| N° de Pre-Protegidos | 76 | 35 |
| Tasa protección previa | 43,7 | 20,1 |
| N° de Post-Protegidos | 110 | 54 |
| Tasa Seroprotección | 63,2 | 31,0 |
| N° Protegidos por vacuna | 34 | 19 |
| Tasa Protección Vacunal | 19,5 | 10,9 |
| Seroconversiones | 28 | 23 |
| Tasa Seroconversión | 16,1 | 13,2 |

Tabla 31. Resultados globales de la TPP, TS, TPV y TSC frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

La TSC frente a la cepa A/Weiss/43 fue ligeramente menor que la TPV (16,1%), mientras que frente a la cepa A/FM/1/47 fue ligeramente superior (13,2%) (Figura 47). La TS fue superior frente a la cepa A/Weiss/43, registrándose Acs HAs protectores después de la vacunación en el 63,2% de los individuos, mientras que frente a la cepa A/FM/1/47 la TS en el 31,0% de los mismos. Frente a la cepa A/Weiss/43 el 76,3% de los individuos que seroconvirtieron no poseían Acs protectores previos a la vacunación trivalente anual, mientras que el 23,7% restante mostraron títulos $\geq 1/40$ antes de ser vacunados. En el caso de la cepa A/FM/1/47 este porcentaje fue muy similar, observándose un 74,2% de individuos que seroconvirtieron que no poseían Acs protectores previos a la vacunación, y un 25,8% que si mostraron Acs protectores previos.

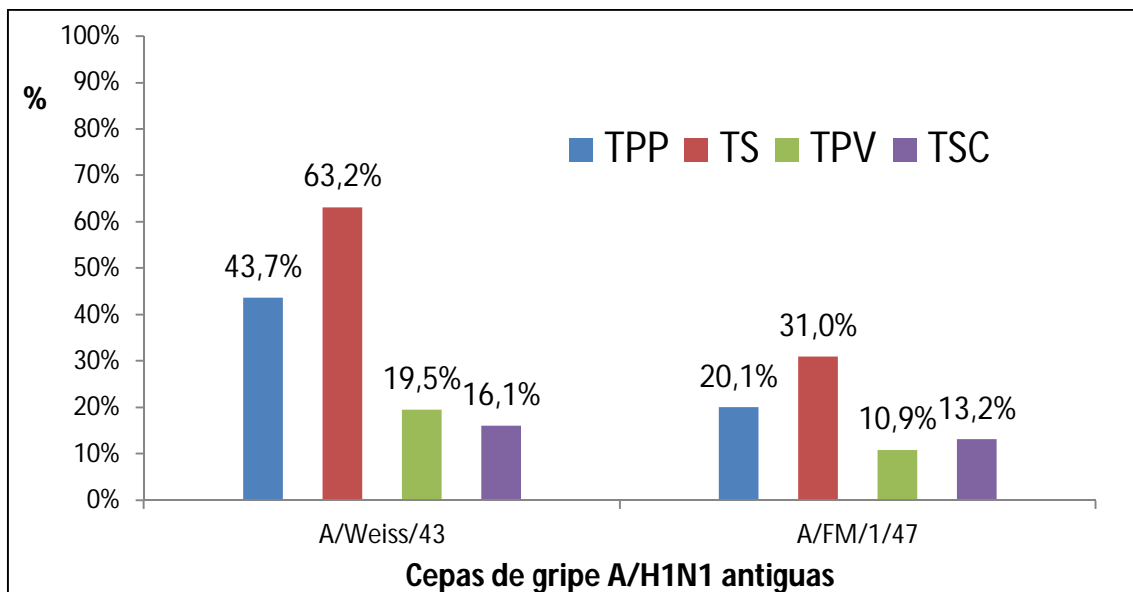


Figura 47. Valores globales de TPP, TS, TPV y TSC frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

La MGTs de Acs HAs previos y posteriores a la vacunación y la RIC frente a cada cepa de gripe A/H1N1 antigua se exponen en la Tabla 32.

| | A/Weiss/43 | A/FM/1/47 |
|---------------------|--------------------|--------------------|
| | <i>MGT (IC95%)</i> | <i>MGT (IC95%)</i> |
| MGTs PreVac | 18,3 (13,5-23,1) | 7,8 (6,3-9,8) |
| MGTs PostVac | 44,2 (33,6-52,8) | 13,6 (10,6-17,4) |
| RIC | 2,4 | 1,7 |

Tabla 32. MGTs y RIC globales de los títulos de los sueros pre y post-vacunales frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas. Intervalo de Confianza al 95% (IC95%).

El análisis de la seroconversión inducida por la vacuna (aumento en al menos 4 veces el título pre-vacunal con respecto al post-vacunal) frente a todos los subtipos y linajes de gripe A y B estacionales se realizó mediante el Test de McNemar ($\alpha=0,05$). Se observó que la seroconversión fue significativa frente a ambas cepas de gripe A/H1N1 antiguas ($p<0,01$). De la misma forma, las MGTs fueron significativamente diferentes entre los títulos de los sueros pre y post-vacunales frente a ambas cepas analizadas (T-Student; $p<0,01$).

El análisis de los valores de la TS, TSC y RIC para evaluar la eficacia de la vacuna trivalente anual siguiendo los criterios EMA para ≥ 60 años mostró que la TS fue superior al 60% frente a la cepa A/Weiss/43, mientras que frente a la cepa A/FM/1/47 la TS fue del 31,0%. Frente a ninguna de estas dos cepas la TSC fue mayor o igual al 30%. La RIC de la MGTs entre los sueros pre y post-vacunales fue superior a 2,0 frente a la cepa A/Weiss/43 (2,4) y de 1,7 frente a la cepa A/FM/1/47 (Tabla 33).

| Criterio EMA | Cepas de gripe A/H1N1 antiguas | |
|----------------------------|---------------------------------------|------------------|
| | A/Weiss/43 | A/FM/1/47 |
| Tasa Seroprotección | 63,2 | 31,0 |
| Tasa Seroconversión | 16,1 | 13,2 |
| Razón de Incremento | 2,4 | 1,7 |

*Color verde: Valor superior al cut-off del criterio EMA

**Color rojo: Valor inferior al cut-off del criterio EMA

Tabla 33. Valores globales de la TS, TSC y RIC de los sueros analizados siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

3. **Análisis por cohortes del efecto de la vacuna trivalente anual sobre la generación de Acs HAs frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas**

- Cepa A/Weiss/43:

Los valores de la TPP, TS, TPV y TSC de todas las cohortes del estudio frente a la cepa A/Weiss/43 están expuestos en la Tabla 34.

| Cepa A/Weiss/43 | Cohortes | | | |
|---------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| N° Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| N° de Pre-Protegidos | 30 | 9 | 17 | 20 |
| Tasa protección previa | 66,7 | 20,9 | 39,5 | 46,5 |
| N° de Post-Protegidos | 38 | 20 | 28 | 24 |
| Tasa Seroprotección | 84,4 | 46,5 | 65,1 | 55,8 |
| N° Protegidos por vacuna | 8 | 11 | 11 | 4 |
| Tasa Protección Vacunal | 17,8 | 25,6 | 25,6 | 9,3 |
| Seroconversiones | 11 | 6 | 7 | 4 |
| Tasa Seroconversión | 24,4 | 14,0 | 16,3 | 9,3 |

Tabla 34. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente a la cepa A/Weiss/43.

La TS frente a la cepa A/Weiss/43 mostró valores descendentes desde la cohorte de la temporada 2006-07 (84,4%) hasta la cohorte de la temporada 2010-11 (55,8%), observándose un valor estable en torno al 45-65% en el resto de cohortes estudiadas (Figura 48). Por su parte, tanto la TPV como la TSC se mantuvieron en torno al 10-25% en todas las cohortes de las distintas temporadas.

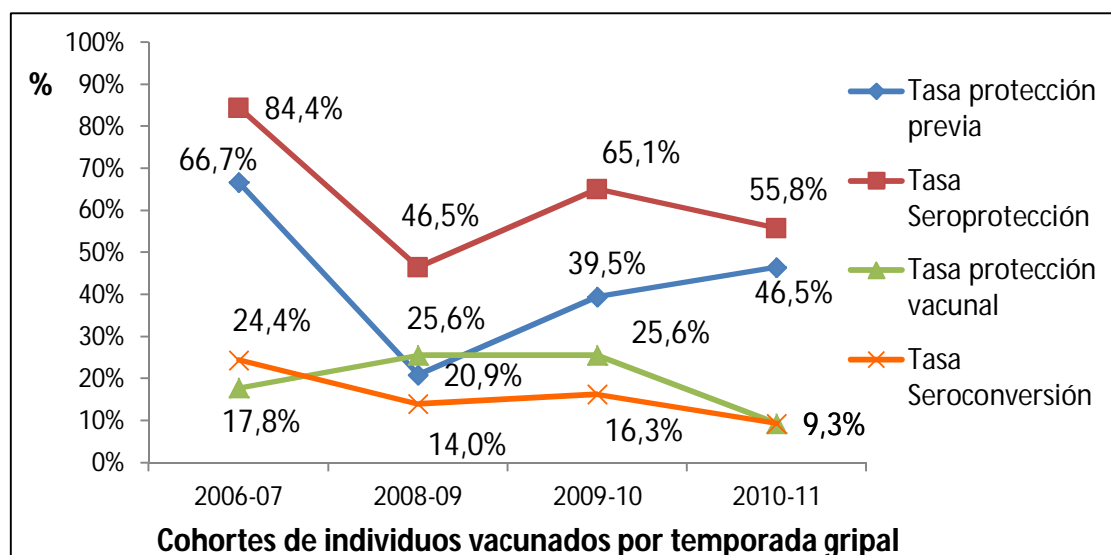


Figura 48. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente a la cepa A/Weiss/43.

- Cepa A/FM/1/47:

Los valores de la TPP, TS, TPV y TSC de todas las cohortes del estudio frente a la cepa A/FM/1/47 están expuestos en la Tabla 35.

| Cepa A/FM/1/47 | Cohortes | | | |
|---------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| N° Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| N° de Pre-Protegidos | 12 | 4 | 11 | 8 |
| Tasa protección previa | 26,7 | 9,3 | 25,6 | 18,6 |
| N° de Post-Protegidos | 16 | 6 | 13 | 19 |
| Tasa Sero protección | 35,6 | 14,0 | 30,2 | 44,2 |
| N° Protegidos por vacuna | 4 | 2 | 2 | 11 |
| Tasa Protección Vacunal | 8,9 | 4,7 | 4,7 | 25,6 |
| Seroconversiones | 5 | 2 | 3 | 13 |
| Tasa Seroconversión | 11,1 | 4,7 | 7,0 | 30,2 |

Tabla 35. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente a la cepa A/FM/1/47.

Frente a la cepa A/FM/1/47, en la cohorte de individuos de la temporada 2008-09 se observó una disminución de la TS respecto a la cohorte de individuos de la temporada anterior (2008-09; 14,0%), manteniéndose posteriormente en valores similares a la primera cohorte (Figura 49). Se observó un comportamiento similar en los valores de la TPV y TSC, que mostraron valores muy bajos en la primera cohorte del estudio (2006-07; 8,9% y 11,1% respectivamente), y alcanzaron en la última cohorte (temporada 2010-11) valores en torno al 25% y 30% respectivamente.

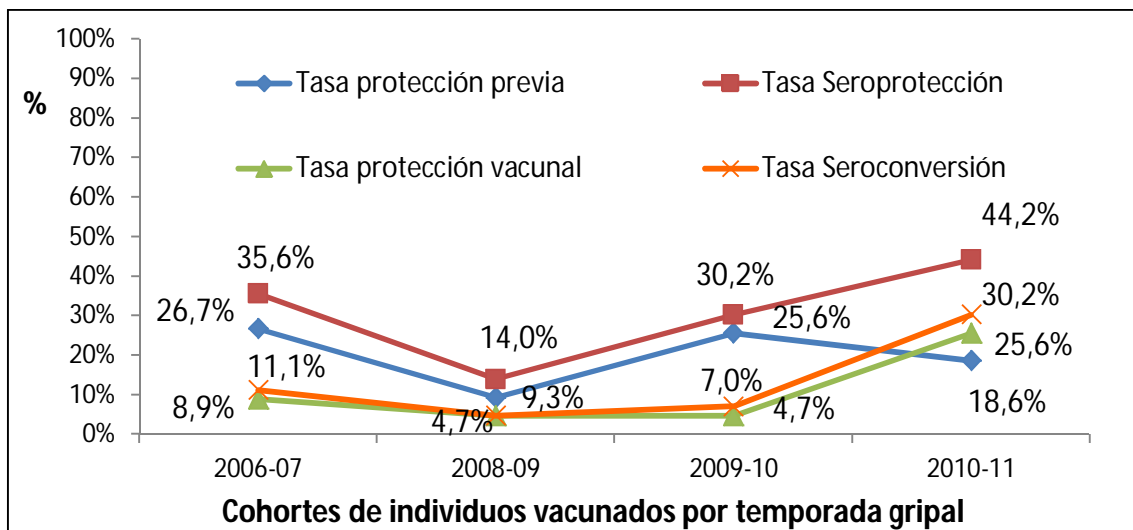


Figura 49. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente a la cepa A/FM/1/47.

4. Análisis estadístico de la respuesta inmune heterotípica a la vacunación trivalente anual sobre la generación de Acs HAs frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas

El análisis de la seroconversión inducida por la vacuna se realizó mediante el test de McNemar ($\alpha=0,05$). Los valores estadísticos p-valor de este test se describen en la Tabla 36. El efecto de la vacunación y la seroconversión fueron significativos en todas las cohortes frente a la cepa A/Weiss/43 a excepción de la cohorte de la temporada 2010-11, mientras que estos valores solo fueron significativos en la cohorte de la temporada 2010-11 frente a la cepa A/FM/1/47 (Test de McNemar; $p<0.01$).

| Cepa | Niveles de significación - Test de McNemar | | | |
|-------------------|--|---------|---------|---------|
| | Cohortes | | | |
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| A/Weiss/43 | 0,001 | 0,031 | 0,016 | 0,125 |
| A/FM/1/47 | 0,063 | 0,500 | 0,250 | 0,000 |

Tabla 36. Valores de significación estadística (p-valor) de la seroconversión frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

Los valores de las MGTs y la RIC de cada cohorte frente a cada cepa de gripe A/H1N1 antigua están representados en la Tabla 37. Los valores del intervalo de confianza (IC95%) para las MGTs se encuentran también representados en la misma tabla.

| Cepa | MGTs pre y post-vacunales y RIC | | | |
|----------------------------|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Cohortes | | | |
| | 2006-2007 | 2008-2009 | 2009-2010 | 2010-2011 |
| | MGT (IC95%) | MGT (IC95%) | MGT (IC95%) | MGT (IC95%) |
| MGTs PreA/Weiss/43 | 38,4 (23,6-63,3) | 8,2 (5,1-13,7) | 18,7 (11,0-31,4) | 19,0 (10,2-32,9) |
| MGTs PostA/Weiss/43 | 83,8 (50,8-143,1) | 24,5 (16,6-37,3) | 45,8 (28,8-73,7) | 39,4 (21,0-68,0) |
| RIC-A/Weiss/43 | 2,2 | 3,0 | 2,4 | 2,1 |
| MGTs PreA/FM/1/47 | 7,8 (4,9-13,0) | 3,4 (2,2-5,1) | 12,5 (8,7-18,1) | 11,3 (7,6-16,7) |
| MGTs PostA/FM/1/47 | 20,5 (13,7-31,0) | 4,6 (2,9-7,1) | 15,3 (10,4-22,6) | 23,1 (13,6-37,0) |
| RIC-A/FM/1/47 | 2,6 | 1,4 | 1,2 | 2,0 |

Tabla 37. MGTs de los sueros pre y post-vacunales y RIC de cada cohorte frente a cada cepa de gripe A/H1N1 antigua. Intervalo de Confianza al 95% (IC95%).

Se realizó un ANOVA de un factor (test de Bonferroni; $\alpha=0,05$) utilizando los valores de la RIC entre los títulos geométricos pre y post-vacunales, para comparar el efecto de la vacunación frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B estacionales entre las distintas

cohortes estudiadas (Tabla 38). No se observaron diferencias en la RIC frente a la cepa A/Weiss/43 entre ninguna de las cohortes estudiadas. Se observaron diferencias altamente significativas entre la RIC de la cohorte de la temporada 2009-10 con respecto al resto de cohortes frente a la cepa A/FM/1/47 ($p < 0,01$).

| Cohorte modelo | Cohorte comparada | p-valor - Bonferroni $\alpha=0,05$ | |
|----------------|-------------------|------------------------------------|-----------|
| | | Cepa de gripe A/H1N1 antigua | |
| | | A/Weiss/43 | A/FM/1/47 |
| 2006-07 | 2008-09 | 1,000 | 0,000 |
| | 2009-10 | 1,000 | 1,000 |
| | 2010-11 | 1,000 | 1,000 |
| 2008-09 | 2006-07 | 1,000 | 0,000 |
| | 2009-10 | 1,000 | 0,003 |
| | 2010-11 | 1,000 | 0,000 |
| 2009-10 | 2006-07 | 1,000 | 1,000 |
| | 2008-09 | 1,000 | 0,003 |
| | 2010-11 | 1,000 | 0,882 |
| 2010-11 | 2006-07 | 1,000 | 1,000 |
| | 2008-09 | 1,000 | 0,000 |
| | 2009-10 | 1,000 | 0,882 |

Tabla 38. Valores de significación estadística (p-valor) de la comparación de la RIC entre las distintas cohortes frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

Al analizar los datos de la TS, TSC y RIC siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal para individuos mayores de 60 años, la TS solo alcanzó un valor superior al 60% frente a la cepa A/Weiss/43 en las cohortes de las temporadas 2006-07 y 2009-10 (Tabla 39), mientras que la TSC no alcanzó los valores de corte de la EMA en ninguna cohorte. La RIC fue superior a 2,0 en todas las cohortes frente a esta cepa. Por su parte, ni la TS fue superior al 60% ni la TSC fue superior al 30% en ninguna de las cohortes estudiadas frente a la cepa A/FM/1/47, a excepción de la cohorte de la temporada 2010-11 (TSC=30,2%). La RIC fue superior a 2,0 frente a esta cepa en las cohortes de las temporadas 2006-07 y 2010-11. En ninguna de las cohortes de las cuatro temporadas que fueron analizadas se cumplieron todos los criterios EMA frente a ninguna de las dos cepas analizadas.

| Cepa | Criterio EMA | Cohortes | | | |
|------------|---------------------|----------|---------|---------|---------|
| | | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| A/Weiss/43 | Tasa Seroprotección | 84,4 | 46,5 | 65,1 | 55,8 |
| | Tasa Seroconversión | 24,4 | 14,0 | 16,3 | 9,3 |
| | Razón de Incremento | 2,2 | 3,0 | 2,4 | 2,1 |
| A/FM/1/47 | Tasa Seroprotección | 35,6 | 14,0 | 30,2 | 44,2 |
| | Tasa Seroconversión | 11,1 | 4,7 | 7,0 | 30,2 |
| | Razón de Incremento | 2,6 | 1,4 | 1,2 | 2,0 |

*Color verde: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA

**Color rojo: Valor inferior al *cut-off* del criterio EMA

Tabla 39. Valores por cohorte de la TS, TSC y RIC de los sueros analizados siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

5. Análisis de los Acs HAs pre-vacunales y de la respuesta inmune heterotípica a la vacuna trivalente anual frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas

Para analizar las diferencias en la media geométrica de los títulos de Acs HAs pre-vacunales y el efecto de la vacuna trivalente anual en términos de la RIC en función de la edad y el sexo, se siguió la misma estratificación etaria que la usada en el análisis de Acs HAs frente a los virus de gripe A y B estacionales. La media geométrica de los títulos pre-vacunales y la RIC entre los títulos pre y post-vacunales tras la vacunación en los diferentes grupos etarios y en ambos sexos se encuentran descritos en las Tablas 40 y 41.

| | Grupo etario | Edad | Cepas de gripe A/H1N1 | |
|--------------------|--------------------------|-------|-----------------------|-----------|
| | | | A/Weiss/43 | A/FM/1/47 |
| MGTs pre-vacunales | G1 (n ₁ =74) | 65-74 | 21,9 | 13,1 |
| | G2 (n ₂ =77) | 75-84 | 23,4 | 6,2 |
| | G3 (n ₃ =23) | ≥85 | 4,8 | 3,0 |
| | G4 (n ₄ =151) | 65-84 | 22,6 | 9,0 |
| | G5 (n ₅ =51) | 65-70 | 15,5 | 20,3 |
| | G6 (n ₆ =123) | ≥71 | 19,8 | 5,3 |
| RIC | G1 (n ₁ =74) | 65-74 | 2,4 | 2,0 |
| | G2 (n ₂ =77) | 75-84 | 2,2 | 1,6 |
| | G3 (n ₃ =23) | ≥85 | 2,3 | 1,3 |
| | G4 (n ₄ =151) | 65-84 | 2,3 | 1,8 |
| | G5 (n ₅ =51) | 65-70 | 2,4 | 1,8 |
| | G6 (n ₆ =123) | ≥71 | 2,4 | 1,7 |

Tabla 40. Distribución por edad de las MGTs de Acs HAs de los sueros pre-vacunales y la RIC entre los títulos pre y post-vacunales frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

| | | Cepas de gripe A/H1N1 antiguas | |
|---------------------------|--------------|--------------------------------|------------|
| | | Sexo | A/Weiss/43 |
| MGTs pre-vacunales | Varón | 19,3 | 9,0 |
| | Mujer | 17,3 | 6,5 |
| RIC | Varón | 2,4 | 1,7 |
| | Mujer | 2,4 | 1,9 |

Tabla 41. Distribución por sexo de las MGTs de Acs HAs de los sueros pre-vacunales y la RIC frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

El análisis estadístico de los títulos de Acs HAs pre-vacunales mediante el contraste T de Student de muestras independientes ($\alpha=0,05$) mostró diferencias significativas entre todos los grupos etarios frente a ambas cepas de gripe A/H1N1 antiguas ($p<0,05$), a excepción de las comparaciones entre los grupos G1-G2 y G5-G6 frente a la cepa A/Weiss/43. Cuando este contraste estadístico se aplicó para conocer si existían diferencias entre los distintos grupos etarios en el efecto de la vacuna medido como RIC, se observaron diferencias significativas entre todos los grupos etarios frente a la cepa A/FM/1/47 ($p<0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos etarios frente a la cepa A/Weiss/43 (Tabla 42).

| Cepas | | Valores T de Student y de significación (p-valor) entre los diferentes grupos etarios | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|---|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | | G1 vs G2 | | G2 vs G3 | | G1 vs G3 | | G3 vs G4 | | G5 vs G6 | |
| | | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor |
| MGTs pre-vacunales | A/Weiss/43 | 0,235 | 0,815 | 4,490 | 0,000 | 3,205 | 0,002 | 3,959 | 0,000 | 0,807 | 0,421 |
| | A/FM/1/47 | 3,058 | 0,003 | 2,156 | 0,034 | 4,460 | 0,000 | 3,345 | 0,001 | 5,808 | 0,000 |
| RIC | A/Weiss/43 | 1,045 | 0,298 | 1,536 | 0,128 | 0,327 | 0,745 | 0,811 | 0,419 | 1,558 | 0,121 |
| | A/FM/1/47 | 2,973 | 0,003 | 2,148 | 0,034 | 4,735 | 0,000 | 3,466 | 0,001 | 3,820 | 0,000 |

*T = Valor T de Student

Tabla 42. Valores T de Student y significación estadística (p-valor) en el nivel de Acs HAs pre-vacunales y la RIC entre los distintos grupos etarios frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

El análisis realizado para conocer las diferencias en los títulos de Acs HAs pre-vacunales y de la RIC en función del sexo no mostraron diferencias significativas entre hombres y mujeres.

6. Análisis de la respuesta inmune heterotípica frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas en función del tipo de vacuna utilizada

El análisis de la respuesta heterotípica a la vacuna trivalente anual en función del tipo de vacuna administrada se realizó atendiendo a la tasa de seroconversión y a la RIC entre los títulos pre y post-vacunales para cada tipo de vacuna frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas. Se realizó un test Chi-cuadrado (χ^2 - $\alpha=0,05$) para comprobar si la seroconversión fue diferente entre ambos tipos de vacuna, mientras que en el caso de la RIC se realizó un test estadístico T de Student para muestras independientes ($\alpha=0,05$). Los valores de la TSC de cada tipo de vacuna frente a cada cepa de gripe A/H1N1 antigua y los valores de RIC se encuentran expuestos en la Tabla 43. Tanto la seroconversión como la RIC fueron significativamente diferentes entre ambos tipos de vacuna frente a la cepa A/FM/1/47, siendo ambos valores más elevados en el caso de las vacunas de tipo Fraccionado. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta heterotípica mostrada frente a la cepa A/Weiss/43 en ninguno de los dos tipos de vacunas utilizadas.

| Cepas | Tasa de Seroconversión | | Chi-cuadrado | | Valores de RIC | | T de Student | |
|------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|
| | Adyuvadas (n ₁ =71) | Fraccionadas (n ₂ =103) | χ^2 * | p-valor | Adyuvadas (n ₁ =71) | Fraccionadas (n ₂ =103) | T** | p-valor |
| A/Weiss/43 | 18,3 | 19,4 | 0,034 | 0,855 | 2,6 | 2,3 | 0,664 | 0,507 |
| A/FM/1/47 | 9,9 | 23,3 | 5,186 | 0,023 | 1,4 | 2,0 | 3,323 | 0,001 |

* χ^2 = Valor Chi-cuadrado

**T = Valor T de Student

Tabla 43. Valores Chi-cuadrado (Seroconversión), T de Student (RIC) y valores de significación estadística de cada tipo de vacuna (VAD y VFR) frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas.

Estudio de los Acs HAs pre-vacunales y la respuesta inmune humoral heterotípica frente a virus de gripe aviar tras la vacunación con vacuna trivalente anual

En este epígrafe se estudió la respuesta heterotípica medida como la presencia de Acs HAs capaces de reconocer subtipos de gripe aviar A/H5N1, A/H7N3 y A/H9N2, virus que nunca se ha demostrado su circulación ni aislado en individuos humanos en España. Se valoró además la respuesta heterotípica tras la vacunación anual trivalente sobre la generación de Acs en los individuos mayores de 65 años que se vacunan anualmente.

1. Análisis del nivel de Acs HAs pre-vacunales totales y por cohorte frente a virus de gripe aviar

Análisis global de los Acs HAs pre-vacunales frente a virus de gripe aviar:

El número de individuos con títulos de Acs HAs protectores ($\geq 1/40$) frente a los tres subtipos de gripe aviar analizados fue mínimo. Se observaron 2 sueros con títulos protectores frente al subtipo A/H5N1 (1,1%) y 1 frente a los subtipos A/H7N3 y A/H9N2 (0,6%). Los sueros pre-vacunales en los que se detectaron Acs con títulos protectores no fueron superiores en ningún caso al título 1/80. Frente al subtipo A/H9N2 se observó la mayor cantidad de individuos con presencia detectable de Acs HAs, encontrándose 39 individuos con título de 1/10, 5 individuos con título 1/20 y 1 individuo con un título de 1/40. Por otra parte, frente al subtipo A/H5N1 se observaron 3 individuos con títulos de 1/10, 1 con título de 1/40 y 1 con título de 1/80. En el caso del subtipo A/H7N3 se observó un individuo con título de 1/20 y un individuo con un título de 1/80.

Solo un individuo varón de 76 años de edad mostró títulos de Acs HAs pre-vacunales frente a todos los virus de gripe aviar analizados. Este individuo mostró un título de 1/80 frente al subtipo A/H5N1 y frente al subtipo A/H7N3, y un título de 1/20 frente al subtipo A/H9N2. En este mismo individuo se encontraron títulos de Acs pre-vacunales elevados frente a subtipos y cepas humanas de gripe. Sus títulos de Acs pre-vacunales fueron de 1/1280 frente al subtipo A/H1N1, 1/1280 frente a la cepa A/Weiss/43 y 1/160 frente a la cepa A/FM/1/47, además de títulos por encima de 1/10 frente al resto de virus de gripe A y B estacionales analizados en este estudio.

Análisis por cohorte de los Acs HAs pre-vacunales frente a virus de gripe aviar:

La distribución por cohortes del número de sueros con títulos de Acs HAs pre-vacunales fue homogénea en todas las temporadas analizadas (Tabla 44). El número de sueros con títulos de Acs positivos frente al subtipo A/H5N1 fue mínimo y muy similar en todas las cohortes, al igual que frente al subtipo A/H7N3. Por otra parte, el número de sueros con títulos de Acs positivos frente al subtipo A/H9N2 fue mayor que en los subtipos A/H5N1 y A/H7N3 y muy similar entre todas las cohortes analizadas.

| Nº sueros con Acs HAs pre-vacunales en cada cohorte | | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Subtipo | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| A/H5N1 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| A/H7N3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| A/H9N2 | 11 | 10 | 14 | 10 |

Tabla 44. Número absoluto de sueros con Acs HAs pre-vacunales en cada cohorte frente a los subtipos de gripe aviar.

El número de sueros pre-vacunales con títulos protectores en las diferentes cohortes fue de 1 en las cohortes de la temporadas 2006-07 (2,2%) y 2009-10 (2,3%) frente al subtipo A/H5N1, 1 en la cohorte de la temporada 2006-07 (2,2%) frente al subtipo A/H7N3, y 1 (2,3%) en la cohorte de la temporada 2009-10 frente al subtipo A/H9N2.

2. Análisis global del efecto de la vacuna trivalente anual sobre la generación de Acs HAs heterotípicos frente a virus de la gripe aviar

Con los resultados de los títulos de los sueros pre y post-vacunales obtenidos mediante RIH se analizó la TPP, TS, TPV y TSC (Tabla 45). También se analizó el número de individuos que mostraron serorrefuerzo (aumento de títulos $\leq 1/10$ hasta títulos de $1/20$). La vacuna trivalente anual elevó el título de Acs HAs frente al subtipo A/H5N1 en el 13,8% de los individuos hasta un título mayor o igual a $1/40$ (TPV). Ese porcentaje fue del 12,1% frente al subtipo A/H9N2, mientras que frente al subtipo A/H7N3 este hecho no se observó en ningún caso. Se observó serorrefuerzo en 17 individuos frente a los subtipos A/H5N1 y A/H9N2 y en 2 individuos frente al subtipo A/H7N3, de 80 y 82 años respectivamente ambos vacunados con vacuna adyuvada.

| | Subtipos de gripe aviar | | |
|---------------------------------|-------------------------|--------|--------|
| | A/H5N1 | A/H7N3 | A/H9N2 |
| N° Total de Sueros | 174 | 174 | 174 |
| N° de Pre-Protegidos | 2 | 1 | 1 |
| Tasa protección previa | 1,1 | 0,6 | 0,6 |
| N° de Post-Protegidos | 26 | 1 | 22 |
| Tasa Seroprotección | 14,9 | 0,6 | 12,6 |
| N° Protegidos por vacuna | 24 | 0 | 21 |
| Tasa Protección Vacunal | 13,8 | 0,0 | 12,1 |
| Seroconversiones | 25 | 0 | 19 |
| Tasa Seroconversión | 14,4 | 0,0 | 10,9 |

Tabla 45. Resultados globales de la TPP, TS, TPV y TSC frente a los subtipos de gripe aviar.

La TSC fue similar a la TPV frente a todos los subtipos de gripe aviar analizados. La TS tras la vacunación fue del 14,9% frente al subtipo A/H5N1, 0,6% frente al subtipo A/H7N3 y 12,6% frente al subtipo A/H9N2 (Figura 50).

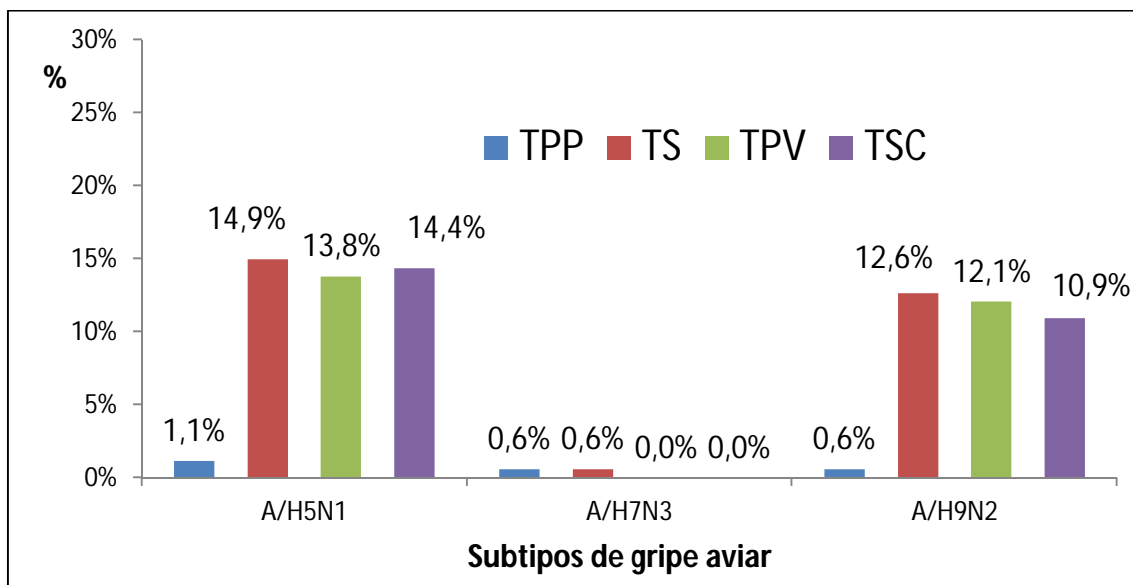


Figura 50. Valores globales de TPP, TS, TPV y TSC frente a los subtipos de gripe aviar.

El nivel de Acs HAs previos y posteriores a la vacunación fue también analizado hallando la MGTs. Los valores de la MGTs de los sueros pre-vacunales fue de 1,9 (IC95%: 1,6-2,2) frente al subtipo A/H9N2, de 1,1 (IC95%: 1,0-1,2) frente al subtipo A/H5N1 y 1,0 (IC95%: 1,0-1,1) frente al subtipo A/H7N3 y. En el caso de los sueros post-vacunales, las MGTs fueron de 5,9 (IC95%: 4,8-7,5) frente al subtipo A/H9N2, de 4,3 (IC95%: 3,4-5,4) frente al subtipo A/H5N1, y de 1,1 (IC95%: 1,0-1,2) frente al subtipo A/H7N3. De estos datos, se obtuvo una RIC de 3,9 frente al subtipo A/H5N1, 1,1 frente al subtipo A/H7N3 y 3,1 frente al subtipo A/H9N2.

Mediante el test de McNemar ($\alpha=0,05$) se observó que tras la vacunación con vacuna trivalente anual la seroconversión fue significativa frente a los subtipos A/H5N1 y A/H9N2 ($p<0,01$). La diferencia entre los valores de la MGTs pre y post-vacunales frente a los subtipos A/H5N1 y A/H9N2 fue altamente significativa (T-Student; $p<0,01$). Sin embargo, al analizar la respuesta humoral siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal para individuos ≥ 60 años, no se alcanzaron ninguno de los valores *cut-off* de los criterios EMA frente a ninguno de los subtipos de gripe aviar analizados, a excepción de la RIC frente a los subtipos A/H5N1 y A/H9N2 (Tabla 46).

| Criterio EMA | Subtipos de gripe aviar | | |
|---------------------|-------------------------|--------|--------|
| | A/H5N1 | A/H7N3 | A/H9N2 |
| Tasa Seroprotección | 14,9 | 0,6 | 12,6 |
| Tasa Seroconversión | 14,4 | 0,0 | 10,9 |
| Razón de Incremento | 3,9 | 1,1 | 3,1 |

*Color verde: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA

**Color rojo: Valor inferior al *cut-off* del criterio EMA

Tabla 46. Valores globales de la TS, TSC y RIC de los sueros analizados siguiendo los criterios EMA de efectividad vacunal frente a los subtipos de gripe aviar.

3. *Análisis por cohorte del efecto de la vacuna trivalente anual sobre la generación de Acs HAs heterotípicos frente a los virus de la gripe aviar*

- Subtipo A/H5N1:

Los valores de la TPP, TS, TPV y TSC frente al subtipo A/H5N1 de las cohortes incluidas en el estudio se exponen en la Tabla 47 y Figura 51. La TS, TPV y TSC mostraron valores bajos (por encima del 15%) en las cohortes de la temporada 2006-07 y 2010-11, mientras que en las temporadas 2008-09 y 2009-10 los valores de estos tres parámetros estuvieron por debajo del 10%.

| Subtipo A/H5N1 | Cohortes de individuos | | | |
|--------------------------|------------------------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| Nº Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| Nº de Pre-Protegidos | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Tasa protección previa | 2,2 | 0,0 | 2,3 | 0,0 |
| Nº de Post-Protegidos | 9 | 1 | 4 | 12 |
| Tasa Seroprotección | 20,0 | 2,3 | 9,3 | 27,9 |
| Nº Protegidos por vacuna | 8 | 1 | 3 | 12 |
| Tasa Protección Vacunal | 17,8 | 2,3 | 7,0 | 27,9 |
| Seroconversiones | 9 | 1 | 3 | 12 |
| Tasa Seroconversión | 20,0 | 2,3 | 7,0 | 27,9 |

Tabla 47. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente al subtipo A/H5N1.

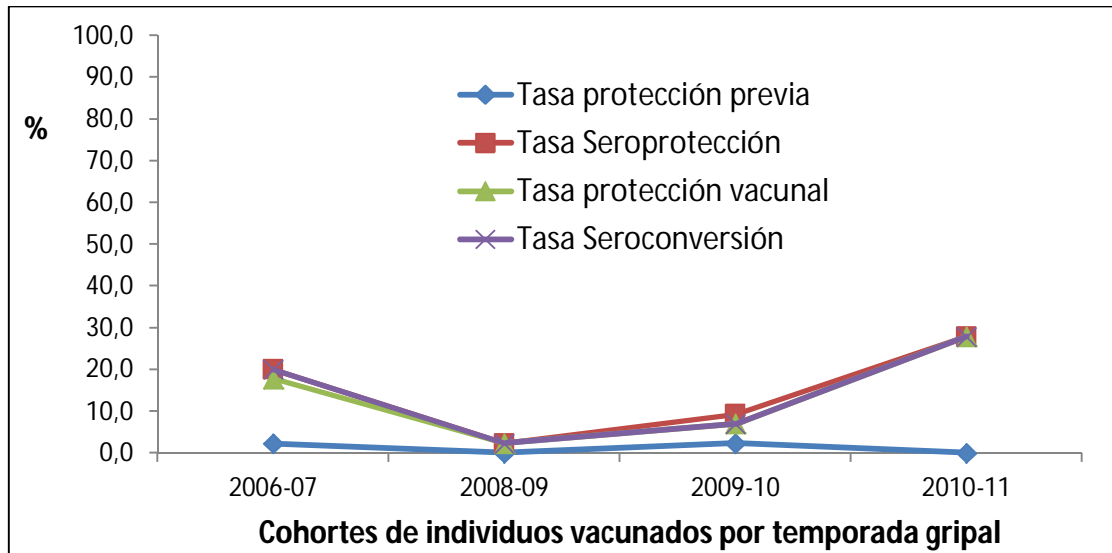


Figura 51. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente al subtipo de gripe aviar A/H5N1.

- Subtipo A/H7N3:

Los valores de la TS, TPV y TSC frente al subtipo A/H7N3 fueron del 0% en todas las cohortes analizadas. Por otra parte, en la cohorte de la temporada 2006-07 la TS fue del 2,2%.

- Subtipo A/H9N2:

Los valores de la TPP, TS, TPV y TSC están expuestos en la Tabla 48 y en la Figura 52. Los valores más elevados de la TS, TPV y TSC se observaron en la cohorte de la temporada 2006-07, con valores por encima del 20% en los tres parámetros. En el resto de cohortes analizadas los valores fueron menores estando en todas ellas por debajo del 10%.

| Subtipo A/H9N2 | Cohortes de individuos | | | |
|---------------------------------|------------------------|---------|---------|---------|
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| N° Total de Sueros | 45 | 43 | 43 | 43 |
| N° de Pre-Protegidos | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Tasa protección previa | 0,0 | 0,0 | 2,3 | 0,0 |
| N° de Post-Protegidos | 13 | 3 | 3 | 3 |
| Tasa Seroprotección | 28,9 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |
| N° Protegidos por vacuna | 13 | 3 | 2 | 3 |
| Tasa Protección Vacunal | 28,9 | 7,0 | 4,7 | 7,0 |
| Seroconversiones | 11 | 3 | 2 | 3 |
| Tasa Seroconversión | 24,4 | 7,0 | 4,7 | 7,0 |

Tabla 48. Resultados por cohorte de la TPP, TS, TPV y TSC frente al subtipo A/H9N2.

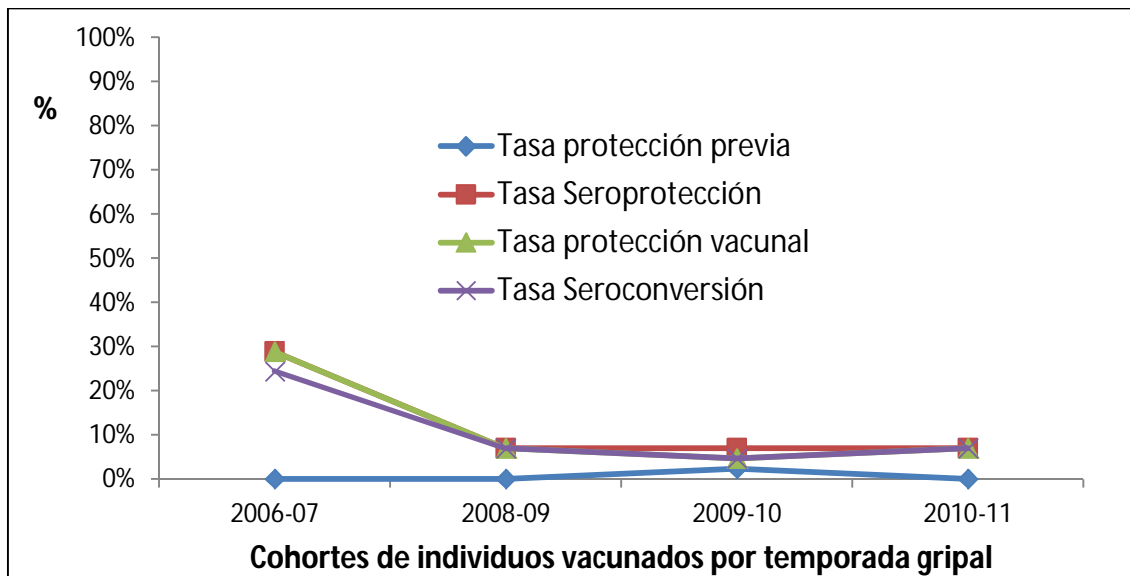


Figura 52. Valores de TPP, TS, TPV y TSC en cada cohorte frente al subtipo de gripe aviar A/H9N2.

4. Análisis estadístico de la respuesta a la vacunación trivalente anual sobre la generación de Acs HAs heterotípicos frente a subtipos de gripe aviar

Los valores estadísticos (nivel de significación; p-valor) de la seroconversión y del efecto de la vacunación medido como incremento del título de Acs HAs hasta un título mayor o igual a 1/40 se describen en la Tabla 49. El efecto de la vacuna y la seroconversión fueron significativos en las cohortes de las temporadas 2006-07 y 2010-11 frente al subtipo A/H5N1, y en la cohorte de la temporada 2006-07 frente al subtipo A/H9N2 (Test de McNemar; $p < 0.05$). El efecto de la vacuna y la seroconversión no fueron significativos frente al subtipo A/H7N3 en ninguna de las cohortes analizadas.

| Subtipo | Niveles de significación-Test de McNemar | | | |
|---------------|--|---------|---------|---------|
| | Cohortes | | | |
| | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| A/H5N1 | 0,008 | 1,000 | 0,250 | 0,000 |
| A/H7N3 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| A/H9N2 | 0,001 | 0,250 | 0,500 | 0,250 |

Tabla 49. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de seroconversión frente a los subtipos de virus de gripe aviar en cada cohorte del estudio.

Los valores de la MGTs de los sueros pre y post-vacunales de cada cohorte analizada frente a los tres subtipos de gripe aviar están descritos en la Tabla 50.

MGTs pre y post-vacunales y RIC

| Subtipos | Cohortes | | | |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 2006-2007 | 2008-2009 | 2009-2010 | 2010-2011 |
| | <i>MGT (IC95%)</i> | <i>MGT (IC95%)</i> | <i>MGT (IC95%)</i> | <i>MGT (IC95%)</i> |
| MGTs PreA/H5N1 | 1,1 (1,0-1,3) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,1 (1,0-1,3) | 1,2 (1,0-1,4) |
| MGTs PostA/H5N1 | 5,0 (2,9-8,7) | 2,0 (1,4-2,8) | 3,6 (2,2-5,2) | 9,0 (5,1-13,0) |
| RIC-A/H5N1 | 4,5 | 2,0 | 3,3 | 7,5 |
| MGTs PreA/H7N3 | 1,1 (1,0-1,3) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,1 (1,0-1,2) | 1,0 (1,0-1,0) |
| MGTs PostA/H7N3 | 1,1 (1,0-1,3) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,1 (1,0-1,2) | 1,1 (1,0-1,4) |
| RIC-A/H7N3 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,1 |
| MGTs PreA/H9N2 | 1,8 (1,4-2,5) | 1,7 (1,3-2,4) | 2,3 (1,6-3,1) | 1,7 (1,3-2,3) |
| MGTs PostA/H9N2 | 15,3 (9,5-25,2) | 4,5 (3,1-7,2) | 4,4 (3,1-6,6) | 3,8 (2,7-5,9) |
| RIC-A/H9N2 | 8,5 | 2,6 | 1,9 | 2,2 |

Tabla 50. MGTs de los sueros pre y post-vacunales y RIC de cada cohorte frente a cada subtipo de gripe aviar. Intervalo de Confianza al 95% (IC95%).

Las diferencias en la RIC entre las diferentes cohortes analizó mediante un análisis ANOVA de un factor (test de Bonferroni; $\alpha=0,05$) que mostró diferencias significativas entre la cohorte de la temporada 2010-11 frente a las cohortes de las temporadas 2008-09 y 2009-10, y la cohorte de la temporada 2006-07 frente a la cohorte de la temporada 2008-09 frente al subtipo A/H5N1 ($p<0,05$) (Tabla 51). Se observaron también diferencias significativas en la RIC entre la cohorte de la temporada 2006-07 con respecto al resto de cohortes frente al subtipo A/H9N2 ($p<0,05$). No se encontraron diferencias significativas en la RIC entre ninguna de las cohortes frente al subtipo A/H7N3.

| Cohorte modelo | Cohorte comparada | p-valor - Bonferroni $\alpha=0,05$ | | |
|----------------|-------------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| | | Subtipo A/H5N1 | Subtipo A/H7N3 | Subtipo A/H9N2 |
| 2006-07 | 2008-09 | 0,021 | 1,000 | 0,001 |
| | 2009-10 | 0,243 | 1,000 | 0,000 |
| | 2010-11 | 1,000 | 0,246 | 0,000 |
| 2008-09 | 2006-07 | 0,021 | 1,000 | 0,001 |
| | 2009-10 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | 2010-11 | 0,001 | 0,260 | 1,000 |
| 2009-10 | 2006-07 | 0,243 | 1,000 | 0,000 |
| | 2008-09 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | 2010-11 | 0,019 | 0,260 | 1,000 |
| 2010-11 | 2006-07 | 1,000 | 0,246 | 0,000 |
| | 2008-09 | 0,001 | 0,260 | 1,000 |
| | 2009-10 | 0,019 | 0,260 | 1,000 |

Tabla 51. Valores de significación estadística (p-valor) de la comparación de la RIC entre las distintas cohortes frente a los subtipos de gripe aviar.

El análisis de la eficacia vacunal utilizando los criterios EMA para individuos ≥ 60 años mostró que solo se alcanzaron los valores requeridos de la RIC frente al subtipo A/H5N1 en todas las cohortes y frente al subtipo A/H9N2 en las cohortes 2006-07, 2008-09 y 2010-11 (Tabla 52). No se cumplió ninguno de los criterios restantes frente a ningún subtipo en ninguna de las cohortes analizadas.

| Subtipo | Criterio EMA | Cohortes | | | |
|---------|--------------|----------|---------|---------|---------|
| | | 2006-07 | 2008-09 | 2009-10 | 2010-11 |
| A/H5N1 | TS | 20,0 | 2,3 | 9,3 | 27,9 |
| | TSC | 20,0 | 2,3 | 7,0 | 27,9 |
| | RIC | 4,5 | 2,0 | 3,3 | 7,5 |
| A/H7N3 | TS | 2,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | TSC | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | RIC | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,1 |
| A/H9N2 | TS | 28,9 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |
| | TSC | 24,4 | 7,0 | 4,7 | 7,0 |
| | RIC | 8,5 | 2,6 | 1,9 | 2,2 |

*Color verde: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA

**Color rojo: Valor inferior al *cut-off* del criterio EMA

Tabla 52. Valores por cohorte de la TS, TSC y RIC de los sueros analizados siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal frente a los subtipos de gripe aviar.

5. Análisis de los Acs HAs pre-vacunales y de la respuesta inmune heterotípica frente a los virus de la gripe aviar en función de la edad y el sexo tras la vacunación trivalente anual

Para el análisis de las diferencias en la media geométrica de los títulos de Acs pre-vacunales y en la RIC en función de la edad y el sexo se siguió la misma estratificación etaria que en el caso de los virus descritos anteriormente. La media geométrica de los títulos pre-vacunales y la RIC para cada grupo etario y para ambos sexos están descritos en las Tablas 53 y 54.

| | Grupo etario | Edad | Subtipos de gripe aviar | | |
|--------------------|--------------------------|-------|-------------------------|--------|--------|
| | | | A/H5N1 | A/H7N3 | A/H9N2 |
| MGTs pre-vacunales | G1 (n ₁ =74) | 65-74 | 1,1 | 1,0 | 1,8 |
| | G2 (n ₂ =77) | 75-84 | 1,1 | 1,1 | 2,0 |
| | G3 (n ₃ =23) | ≥85 | 1,0 | 1,1 | 1,7 |
| | G4 (n ₄ =151) | 65-84 | 1,1 | 1,1 | 1,9 |
| | G5 (n ₅ =51) | 65-70 | 1,0 | 1,0 | 1,9 |
| | G6 (n ₆ =123) | ≥71 | 1,1 | 1,1 | 1,9 |
| RIC | G1 (n ₁ =74) | 65-74 | 3,7 | 1,0 | 3,4 |
| | G2 (n ₂ =77) | 75-84 | 4,1 | 1,1 | 2,9 |
| | G3 (n ₃ =23) | ≥85 | 4,1 | 1,0 | 3,1 |
| | G4 (n ₄ =151) | 65-84 | 3,9 | 1,0 | 3,2 |
| | G5 (n ₅ =51) | 65-70 | 4,7 | 1,0 | 3,3 |
| | G6 (n ₆ =123) | ≥71 | 3,6 | 1,1 | 3,1 |

Tabla 53. Distribución por edad de las MGTs de Acs HAs de los sueros pre-vacunales y la RIC frente a virus de gripe aviar.

| | Sexo | Subtipos de gripe aviar | | |
|--------------------|-------|-------------------------|--------|--------|
| | | A/H5N1 | A/H7N3 | A/H9N2 |
| MGTs pre-vacunales | Varón | 1,1 | 1,1 | 1,9 |
| | Mujer | 1,1 | 1,0 | 1,8 |
| RIC | Varón | 4,6 | 1,0 | 3,3 |
| | Mujer | 3,1 | 1,0 | 3,0 |

Tabla 54. Distribución por sexo de las MGTs de Acs HAs de los sueros pre-vacunales y la RIC frente a virus de gripe aviar.

El análisis T de Student de muestras independientes ($\alpha=0,05$) no mostró diferencias significativas entre ningún grupo etario frente a ninguno de los subtipos de gripe aviar incluidos en el estudio, ni en la media geométrica de los títulos de Acs HAs previos a la vacunación ni en la RIC (Tabla 55).

Valores T de Student y de significación (p-valor) entre los diferentes grupos etarios

| | Subtipos | G1 vs G2 | | G2 vs G3 | | G1 vs G3 | | G3 vs G4 | | G5 vs G6 | |
|--------|----------|-----------------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor | T* | p-valor |
| | | MGTs pre-vacunales | A/H5N1 | 0,276 | 0,783 | 0,739 | 0,461 | 0,948 | 0,345 | 0,846 | 0,399 |
| A/H7N3 | 0,980 | | 0,329 | 0,582 | 0,562 | 1,815 | 0,073 | 1,128 | 0,261 | 0,897 | 0,371 |
| A/H9N2 | 0,412 | | 0,681 | 0,542 | 0,589 | 0,283 | 0,778 | 0,445 | 0,657 | 0,069 | 0,945 |
| RIC | A/H5N1 | 0,457 | 0,648 | 0,593 | 0,555 | 0,867 | 0,388 | 0,761 | 0,448 | 1,014 | 0,312 |
| | A/H7N3 | 1,395 | 0,165 | 0,775 | 0,440 | 0,555 | 0,580 | 0,552 | 0,581 | 0,913 | 0,363 |
| | A/H9N2 | 0,628 | 0,531 | 0,291 | 0,771 | 0,700 | 0,486 | 0,515 | 0,607 | 0,963 | 0,337 |

*T = Valor T de Student

Tabla 55. Valores T de Student y significación estadística (p-valor) en el nivel de Acs HAs pre-vacunales y la RIC entre los distintos grupos etarios frente a los subtipos de gripe aviar.

6. *Análisis de la respuesta heterotípica frente a los virus de la gripe aviar en función del tipo de vacuna utilizada*

Las diferencias en la seroconversión y en la RIC inducida por las vacunas Adyuvadas y Fraccionadas en la población ≥ 65 años se analizaron mediante los test Chi-cuadrado ($\alpha=0,05$) (seroconversión) y el test T de Student ($\alpha=0,05$) (RIC). Ninguno de estos dos parámetros fue significativamente diferente entre ambos tipos de vacunas frente a los subtipos de gripe aviar analizados. Los valores de la TSC y la RIC entre ambos tipos de vacunas frente a estos subtipos de gripe se exponen en la Tabla 56.

| Subtipos | Tasa de Seroconversión | | Chi-cuadrado | | Valores de RIC | | T de Student | |
|----------|------------------------|-----------------------|--------------|---------|----------------------|-----------------------|--------------|---------|
| | Adyuvadas | Fraccionadas | χ^2 * | p-valor | Adyuvadas | Fraccionadas | T** | p-valor |
| | (n ₁ =71) | (n ₂ =103) | | | (n ₁ =71) | (n ₂ =103) | | |
| A/H5N1 | 16,9 | 12,6 | 0,626 | 0,429 | 4,8 | 3,4 | 0,649 | 0,517 |
| A/H7N2 | 1,0 | 1,0 | 1,000 | 1,000 | 1,1 | 1,1 | 1,718 | 0,088 |
| A/H9N2 | 9,9 | 13,6 | 1,854 | 0,173 | 2,5 | 3,7 | 1,054 | 0,293 |

* χ^2 = Valor Chi-cuadrado

**T = Valor T de Student

Tabla 56. Valores Chi-cuadrado (Seroconversión), T de Student (RIC) y valores de significación estadística de cada tipo de vacuna (VAD y VFR) frente a los subtipos de gripe aviar.

Análisis filogenético de las cepas de gripe A incluidas en el estudio

El análisis filogenético del gen de la hemaglutinina de las cepas de gripe A utilizadas en el estudio, junto con el de cepas de gripe humanas relevantes del siglo XX y XXI, se realizó mediante la construcción de una matriz de distancias genéticas (Tabla 57) y posteriormente un árbol filogenético a partir de esta primera (Figura 53).

El análisis de la matriz de distancias genéticas mostró diferencias máximas del 87,1% entre las secuencias de las cepas de gripe A humanas A/Wisconsin/67/2005 (A/H3N2) y A/HongKong/378.1/2001 (A/H5N1), mientras que las cepas con menor distancia genética fueron A/Weiss/43 (A/H1N1) y A/Bellamy/JY2/1942 (A/H1N1) (2,4%). El árbol filogenético construido agrupó las cepas incluidas en el estudio en dos diferentes grandes grupos filogenéticos con gran separación evolutiva, englobando las cepas H1, H2, H5 y H9 en un grupo y las cepas H3 y H7 en otro, asimilándose a los dos clados filogenéticos aceptados a nivel internacional para el gen de la HA.

Analizando el árbol filogenético se observó que las cepas A/H1N1 antiguas analizadas filogenéticamente (aisladas en la década de 1940) surgieron de un nodo común desde la cepa de la Gripe Española de 1918. A poca distancia genética de estas y dentro del mismo taxón se situaron las cepas A/H1N1 utilizadas en las composiciones vacunales de las temporadas 2006-07, 2008-09 y 2009-10, así como la predecesora de estas, la cepa A/USSR/90/1977. Por su parte, la cepa A/California/7/2009 (subtipo A/H1N1pdm09) incluida en la vacuna de gripe trivalente estacional a partir de la temporada 2010-11, se situó en este árbol en una posición más alejada con respecto a este taxón, con una diferencia genética en torno a un 22-28% con respecto del grupo de cepas A/H1N1 vacunales previas y también con respecto a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas analizadas en este trabajo.

Los *scores* de los nodos fueron muy elevados en todos los casos, observándose valores desde el 82% (nodo establecido entre las cepas A/Perth/16/2009 y A/Brisbane/10/2007) hasta el 100% en la mayoría de las ramificaciones, aceptándose una buena representación del árbol filogenético.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| H1N1_A/Bellamy/JY2/1942 | 0,007 | 0,008 | 0,004 | 0,010 | 0,023 | 0,013 | 0,011 | 0,007 | 0,047 | 0,050 | 0,067 | 0,099 | 0,097 | 0,099 | 0,099 | 0,099 | 0,104 |
| H1N1_A/Fort_Monmouth/1/1947 | 0,048 | 0,005 | 0,007 | 0,012 | 0,025 | 0,012 | 0,011 | 0,006 | 0,049 | 0,047 | 0,068 | 0,099 | 0,099 | 0,099 | 0,099 | 0,099 | 0,103 |
| H1N1_A/Fort_Warren/1/1950 | 0,065 | 0,033 | 0,008 | 0,012 | 0,025 | 0,013 | 0,012 | 0,007 | 0,048 | 0,047 | 0,050 | 0,068 | 0,099 | 0,099 | 0,098 | 0,098 | 0,105 |
| H1N1_A/Weiss/1943 | 0,024 | 0,053 | 0,067 | 0,011 | 0,024 | 0,013 | 0,012 | 0,008 | 0,048 | 0,048 | 0,050 | 0,068 | 0,101 | 0,097 | 0,101 | 0,101 | 0,106 |
| H1N1_A/South_Carolina/1/18 | 0,088 | 0,104 | 0,115 | 0,095 | 0,020 | 0,017 | 0,016 | 0,013 | 0,046 | 0,045 | 0,047 | 0,068 | 0,098 | 0,096 | 0,099 | 0,099 | 0,101 |
| H1N1_A/California/07/2009 | 0,225 | 0,237 | 0,247 | 0,235 | 0,197 | 0,027 | 0,027 | 0,025 | 0,051 | 0,047 | 0,048 | 0,071 | 0,097 | 0,096 | 0,098 | 0,097 | 0,105 |
| H1N1_A/Brisbane/59/2007 | 0,116 | 0,110 | 0,119 | 0,126 | 0,166 | 0,277 | 0,005 | 0,011 | 0,050 | 0,048 | 0,050 | 0,070 | 0,104 | 0,103 | 0,105 | 0,104 | 0,103 |
| H1N1_A/New_Caledonia/20/1999 | 0,098 | 0,092 | 0,102 | 0,108 | 0,154 | 0,269 | 0,030 | 0,009 | 0,050 | 0,049 | 0,051 | 0,070 | 0,104 | 0,102 | 0,105 | 0,104 | 0,108 |
| H1N1_A/USSR/90/1977 | 0,055 | 0,038 | 0,051 | 0,059 | 0,115 | 0,249 | 0,086 | 0,067 | 0,048 | 0,048 | 0,050 | 0,069 | 0,100 | 0,100 | 0,101 | 0,100 | 0,105 |
| H2N2_A/Albany/22/1957 | 0,481 | 0,488 | 0,485 | 0,480 | 0,467 | 0,501 | 0,493 | 0,495 | 0,488 | 0,036 | 0,036 | 0,072 | 0,105 | 0,103 | 0,105 | 0,106 | 0,097 |
| H5N1_A/Hong_Kong/378.1/2001 | 0,484 | 0,475 | 0,480 | 0,486 | 0,459 | 0,472 | 0,486 | 0,495 | 0,484 | 0,378 | 0,005 | 0,070 | 0,107 | 0,108 | 0,106 | 0,108 | 0,097 |
| H5N1_A/Viet_Nam/1194/2004 | 0,507 | 0,498 | 0,503 | 0,512 | 0,478 | 0,486 | 0,506 | 0,514 | 0,507 | 0,381 | 0,031 | 0,071 | 0,106 | 0,109 | 0,106 | 0,108 | 0,099 |
| H9N2_A/Hong_Kong/1074/1997 | 0,631 | 0,643 | 0,640 | 0,638 | 0,636 | 0,655 | 0,644 | 0,648 | 0,644 | 0,659 | 0,644 | 0,652 | 0,106 | 0,106 | 0,107 | 0,107 | 0,100 |
| H3N2_A/Brisbane/10/2007 | 0,827 | 0,825 | 0,821 | 0,839 | 0,816 | 0,813 | 0,851 | 0,857 | 0,835 | 0,849 | 0,861 | 0,859 | 0,858 | 0,014 | 0,003 | 0,003 | 0,074 |
| H3N2_A/Hong_Kong/1-1-MA21-1/1968 | 0,808 | 0,817 | 0,819 | 0,809 | 0,810 | 0,805 | 0,840 | 0,845 | 0,823 | 0,834 | 0,864 | 0,873 | 0,861 | 0,136 | 0,015 | 0,014 | 0,075 |
| H3N2_A/Perth/16/2009 | 0,829 | 0,827 | 0,822 | 0,840 | 0,818 | 0,820 | 0,855 | 0,859 | 0,837 | 0,851 | 0,856 | 0,858 | 0,864 | 0,011 | 0,136 | 0,004 | 0,074 |
| H3N2_A/Wisconsin/67/2005 | 0,827 | 0,825 | 0,820 | 0,838 | 0,822 | 0,815 | 0,848 | 0,854 | 0,830 | 0,854 | 0,871 | 0,870 | 0,863 | 0,011 | 0,134 | 0,017 | 0,075 |
| H7H3_A/Mallard/Netherlands/12/2000 | 0,849 | 0,840 | 0,853 | 0,857 | 0,836 | 0,851 | 0,847 | 0,869 | 0,855 | 0,810 | 0,805 | 0,820 | 0,820 | 0,670 | 0,665 | 0,673 | 0,673 |

Tabla 57. Matriz de distancias genéticas generada siguiendo el algoritmo de sustitución Maximum Composite Likelihood entre las cepas de gripe utilizadas en el estudio y las cepas de gripe más relevantes en la historia epidemiológica mundial del Siglo XX y XXI. Los valores en la parte inferior izquierda de la tabla se corresponden con la distancia genética entre cepas. Los valores en azul se corresponden con el valor de desviación estándar de los anteriores.

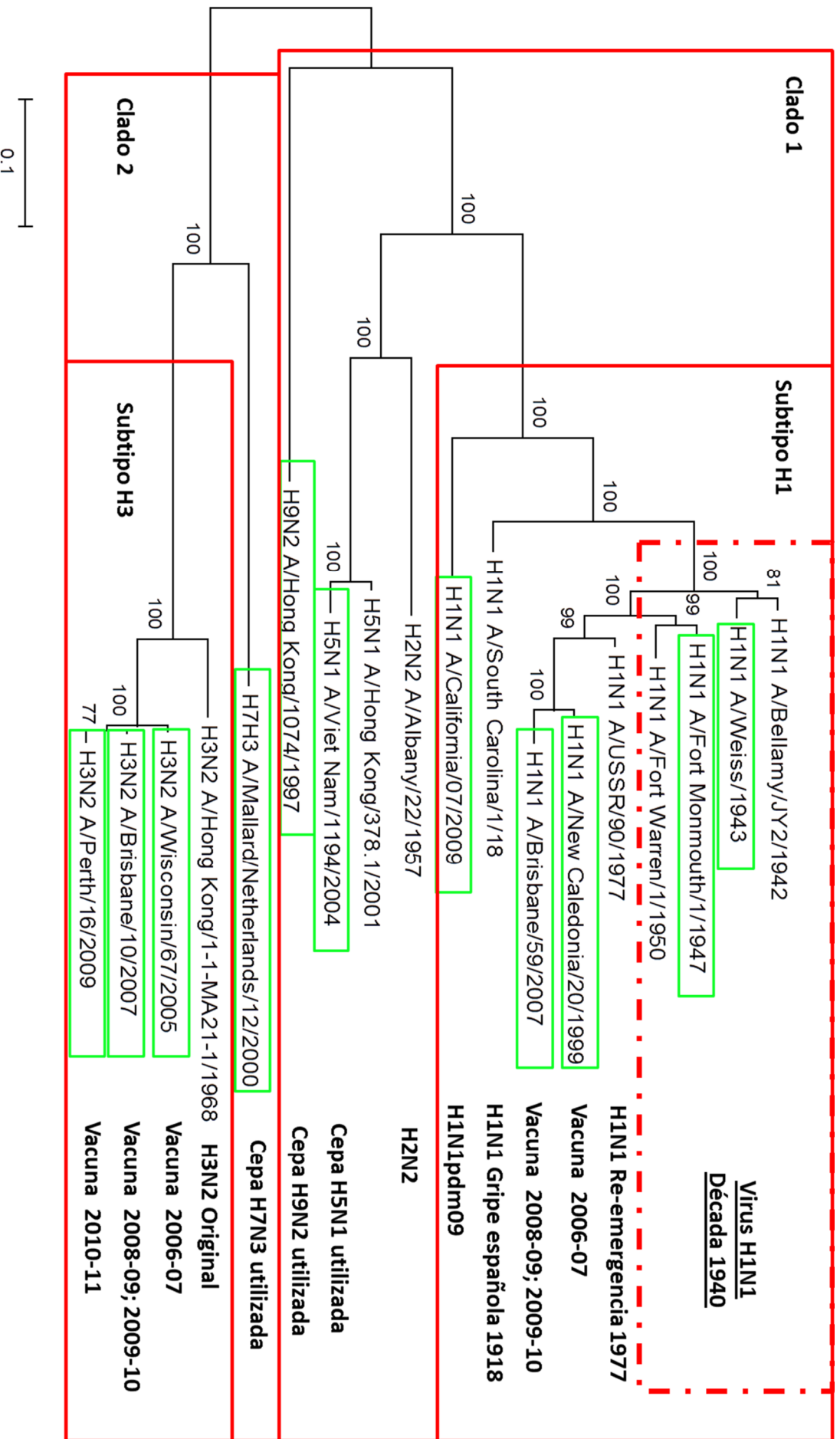


Figura 53. : Cepas de gripe del estudio y las más relevantes del Siglo XX y XXI: Árbol filogenético del gen de la HA generado a partir de la matriz de distancias genéticas siguiendo el modelo Maximum Likelihood Tree mediante el algoritmo Tamura-Nei. En rojo se señalan los grupos filogenéticos aceptados en la nomenclatura internacional. En verde se señalan las cepas de gripe utilizadas en el estudio. Los valores internodales estiman la bondad del cálculo de la distancia genética.

Análisis de Acs HAs previos a la vacunación y de la respuesta inmune humoral frente a virus de la gripe A y B tras la vacunación monovalente pandémica frente al subtipo A/H1N1pdm09 en enfermos autoinmunes

Los resultados obtenidos de este ensayo de eficacia humoral tras la vacunación en individuos con enfermedades autoinmunes se exponen en función de las características clínicas y demográficas de los pacientes. En este epígrafe se estudió el nivel de Acs HAs previos a la vacunación y la respuesta inmune humoral frente a subtipos y linajes de gripe A y B epidémicos tras la vacunación con vacuna monovalente *Pandemrix* frente a la cepa A/California/7/2009 (Subtipo A/H1N1pdm09).

Características demográficas y clínicas de los individuos con enfermedades autoinmunes y controles sanos

En el estudio de la población con enfermedades autoinmunes se incluyeron 48 pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes (EA) y 47 individuos controles sanos (CS). La media de edad de los EA incluidos fue de 52,5 años con una DE de 16,2 años y una mediana de 54,0 años. La mayor parte de los pacientes incluidos fueron mujeres ($n_1=39$; 83,0%) (Figura 54).

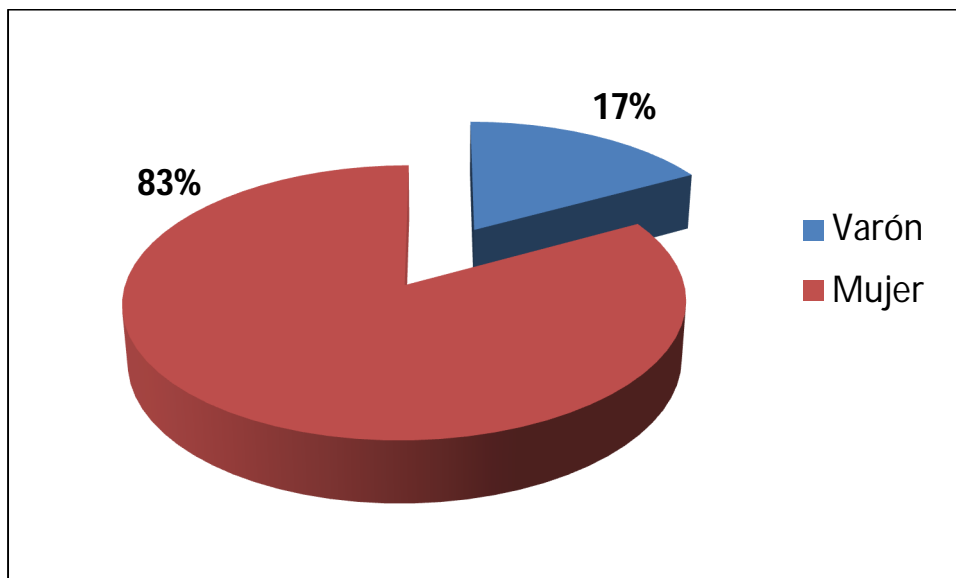


Figura 54. Distribución de sexos en el grupo de EA.

Se enumeraron once tipos diferentes de enfermedades autoinmunes dentro del grupo de EA, las cuales se describen en la Tabla 58.

| Enfermedad | Nº casos |
|--|-----------------|
| <i>Artritis reumatoide</i> | 8 |
| <i>Síndrome de Behçet</i> | 1 |
| <i>Dermatomiositis</i> | 3 |
| <i>Enf. Mixta Tejido Conectivo</i> | 1 |
| <i>Escleroderma</i> | 2 |
| <i>Lupus Eritematoso Sistémico (LES)</i> | 18 |
| <i>Síndrome Overlap</i> | 3 |
| <i>Polimiositis</i> | 2 |
| <i>Síndrome antifosfolípídico (SAF)</i> | 2 |
| <i>Síndrome de Sjögren</i> | 5 |
| <i>Vasculitis sistémica</i> | 2 |
| Total | 47 |

Tabla 58. Enfermedades autoinmunes incluidas en el estudio y número de individuos afectados por cada una de ellas.

La media de edad del grupo de CS fue de 39,8 años con una DE de 9,9 años y una mediana de 37,0 años. El 71,1% de los controles incluidos fueron mujeres ($n_1=32$) (Figura 55).

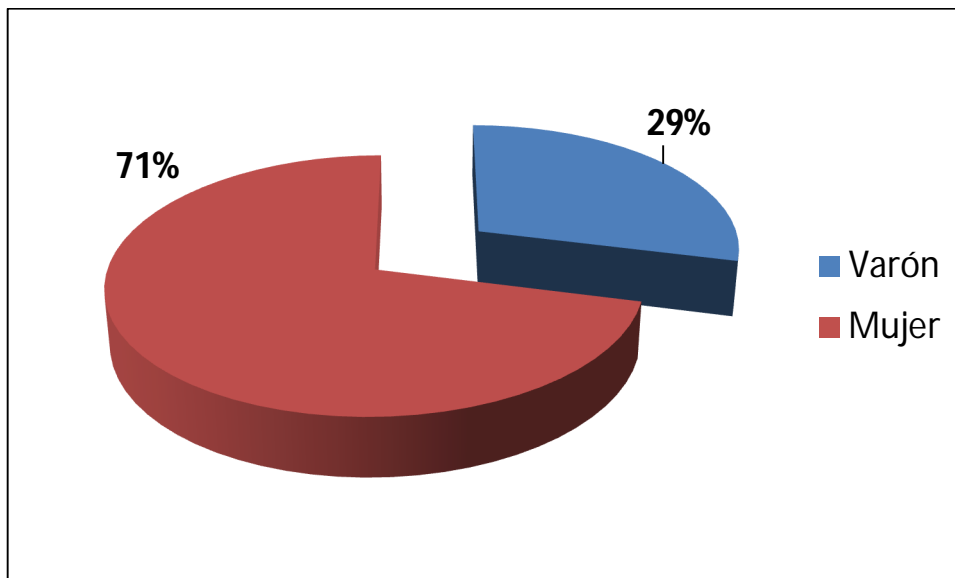


Figura 55. Distribución de sexos en el grupo de CS.

Mediante el contraste estadístico T de Student ($\alpha=0,05$) se analizaron las diferencias en la media de edad entre el grupo poblacional de EA y de CS. Se observaron diferencias altamente significativas entre la media de ambos grupos (T de Student; $p<0,01$), siendo significativamente mayor en el grupo de enfermos autoinmunes. La dispersión de la edad dentro del grupo de EA fue mayor que en el caso de los CS (Figura 56).

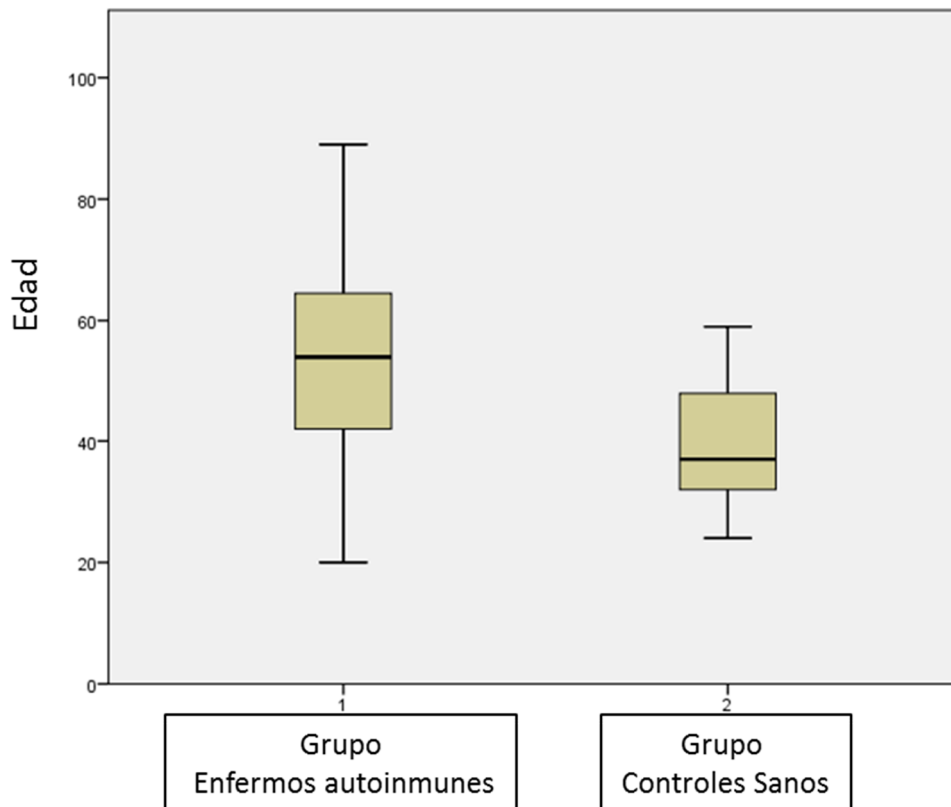


Figura 56. Medias de edad y DE del grupo de Enfermos Autoinmunes y controles sanos.



Estudio de los Acs HAs pre-vacunales y de la eficacia de la vacuna monovalente frente a cepas de gripe A y B epidémicas en individuos con enfermedades autoinmunes

En este epígrafe se analizó la presencia de Acs HAs previos a la vacunación en el grupo de EA así como en el grupo control. Se evaluaron también los Acs HAs producidos tras la vacunación con vacuna monovalente frente a la cepa pandémica A/California/7/2009 (subtipo A/H1N1pdm09), comparándose los resultados obtenidos entre ambos grupos de población con el fin de comprobar si existen diferencias en la capacidad inmunizante de esta vacuna en función de las características clínicas de los individuos a los que se administra.

1. Análisis del nivel de Acs HAs pre-vacunales en EA y CS frente a subtipos y linajes de gripe A y B

Población con enfermedades autoinmunes (EA):

El análisis mediante RIH de los sueros pre-vacunales de los pacientes EA mostró una ausencia casi total de Acs protectores ($\geq 1/40$) frente al subtipo A/H1N1pdm09 ($n_1=2$; 4,3%) (Tabla 59). Se encontraron 9 individuos con sueros pre-vacunales que mostraron títulos de 1/10-1/20 frente a este subtipo pandémico. Ambos linajes de gripe B (Yamagata y Victoria) fueron los virus frente a los que se encontró un mayor porcentaje individuos con títulos pre-vacunales protectores en los EA. De estos, 19 sueros mostraron títulos protectores frente al linaje B/Yamagata (40,4%) y 23 sueros frente al linaje B/Victoria (48,9%).

Valores absolutos y % de títulos frente a cada subtipo o linaje

| Título | A/H1N1pdm09 | | A/H1N1 | | A/H3N2 | | B(Yam) | | B(Vict) | |
|---------------------------------------|-------------|------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 36 | 76,6 | 28 | 59,6 | 16 | 34,0 | 16 | 34,0 | 16 | 34,0 |
| 10 | 7 | 14,9 | 6 | 12,8 | 6 | 12,8 | 6 | 12,8 | 5 | 10,6 |
| 20 | 2 | 4,3 | 4 | 8,5 | 8 | 17,0 | 6 | 12,8 | 3 | 6,4 |
| 40 | 1 | 2,1 | 3 | 6,4 | 9 | 19,1 | 3 | 6,4 | 10 | 21,3 |
| 80 | 1 | 2,1 | 4 | 8,5 | 6 | 12,8 | 8 | 17,0 | 5 | 10,6 |
| 160 | 0 | 0,0 | 1 | 2,1 | 2 | 4,3 | 5 | 10,6 | 4 | 8,5 |
| 320 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | 6,4 | 2 | 4,3 |
| 640 | 0 | 0,0 | 1 | 2,1 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 4,3 |
| >640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Títulos $\geq 1/40$ | 2 | 4,3 | 9 | 19,1 | 17 | 36,2 | 19 | 40,4 | 23 | 48,9 |

Tabla 59. Distribución de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a virus de gripe A y B en la cohorte de EA.

El porcentaje de sueros pre-vacunales con títulos de Acs HAs protectores frente al subtipo A/H3N2 fue ligeramente inferior (36,2%), mientras que frente al subtipo A/H1N1 el porcentaje fue la mitad que en el caso de los virus B (19,1%) (Figura 57).

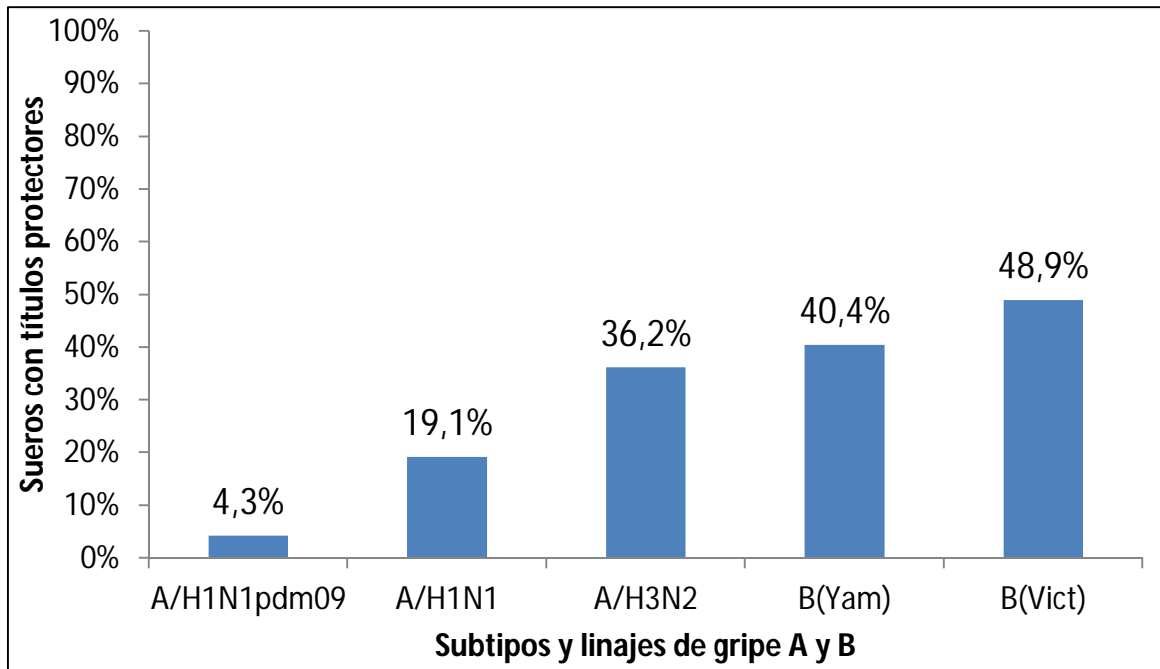


Figura 57. Distribución porcentual de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs HAs frente a subtipos de gripe A y B en el grupo de EA.

Población de controles sanos (CS):

En la población de CS no se encontró ningún sujeto con Acs HAs pre-vacunales con títulos considerados como protectores ($\geq 1/40$) frente al subtipo A/H1N1pdm09 (Tabla 60). De igual modo que en los enfermos autoinmunes, se encontraron 9 individuos con sueros pre-vacunales con títulos de 1/10-1/20 frente al subtipo pandémico. El número de sueros con títulos protectores frente al linaje B/Yamagata fue muy alto (n=32; 71,1%), mientras que para el linaje B/Victoria y el subtipo A/H3N2 el porcentaje fue algo menor (n=23; 51,1% en ambos) (Figura 58). Por otra parte, frente al subtipo A/H1N1 se encontraron 14 sueros con títulos protectores previos a la vacunación (31,1%).

Valores absolutos y % de títulos frente a cada subtipo o linaje

| Título | A/H1N1pdm09 | | A/H1N1 | | A/H3N2 | | B(Yam) | | B(Vict) | |
|----------------------|-------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|---------|------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <10 | 36 | 80,0 | 17 | 37,8 | 4 | 8,9 | 5 | 11,1 | 8 | 17,8 |
| 10 | 7 | 15,6 | 7 | 15,6 | 7 | 15,6 | 1 | 2,2 | 5 | 11,1 |
| 20 | 2 | 4,4 | 7 | 15,6 | 11 | 24,4 | 7 | 15,6 | 9 | 20,0 |
| 40 | 0 | 0,0 | 5 | 11,1 | 7 | 15,6 | 9 | 20,0 | 2 | 4,4 |
| 80 | 0 | 0,0 | 5 | 11,1 | 11 | 24,4 | 14 | 31,1 | 9 | 20,0 |
| 160 | 0 | 0,0 | 2 | 4,4 | 5 | 11,1 | 5 | 11,1 | 8 | 17,8 |
| 320 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 | 0 | 0,0 | 3 | 6,7 | 1 | 2,2 |
| 640 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 | 3 | 6,7 |
| >640 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Títulos ≥1/40 | 0 | 0,0 | 14 | 31,1 | 23 | 51,1 | 32 | 71,1 | 23 | 51,1 |

Tabla 60. Distribución de los títulos pre-vacunales HAs e individuos con títulos protectores de Acs HAs frente a virus de gripe A y B en la cohorte de CS.

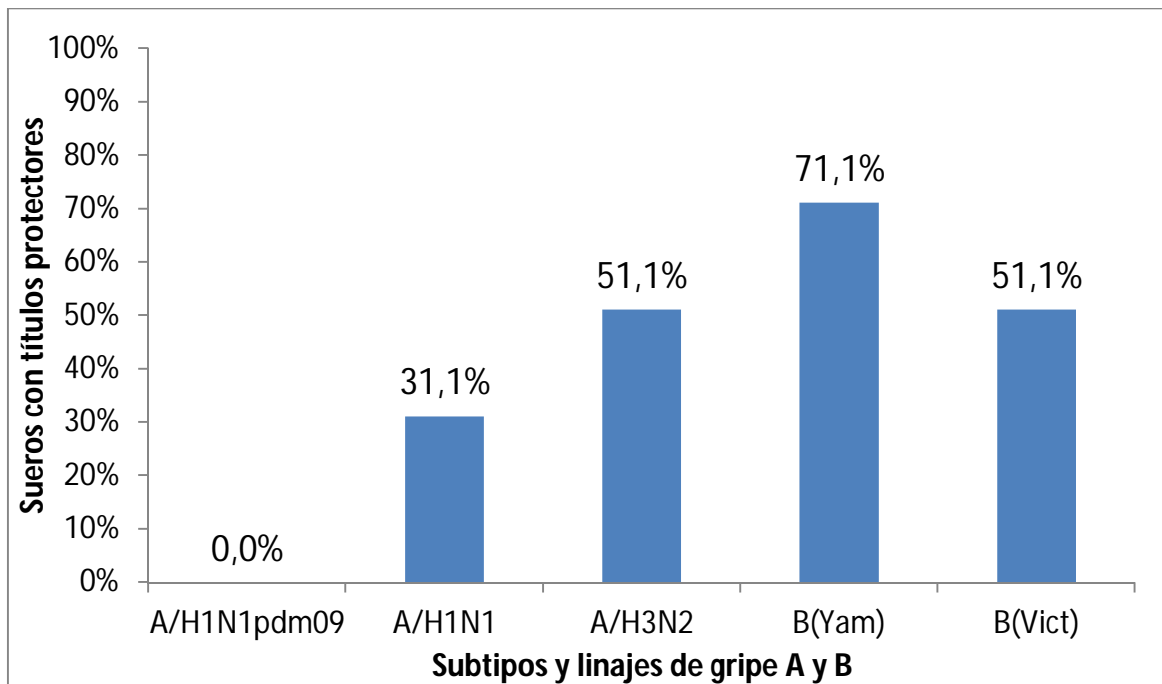


Figura 58. Distribución porcentual de sueros pre-vacunales con títulos protectores de Acs HAs frente a subtipos de gripe A y B en la cohorte de CS.

2. Análisis estadístico de los Acs HAs pre-vacunales frente a los virus epidémicos de gripe A y B en enfermos autoinmunes y controles sanos

Para analizar la existencia de diferencias en el porcentaje de individuos con títulos protectores de Acs HAs previos a la vacunación ($\geq 1/40$) entre los diferentes subtipos y linajes de gripe A y B estacionales en ambos grupos de población se realizó un test de McNemar ($\alpha=0,05$). En los EA se observaron diferencias significativas en el número de individuos con títulos protectores entre todos los subtipos y linajes de gripe ($p < 0,05$), a excepción de entre los linajes B/Yamagata y B/Victoria y entre el subtipo A/H3N2 y el linaje B/Yamagata (Tabla 61).

Valores de significación (p-valor) - Grupo de EA
Test de McNemar ($\alpha=0,05$)

| Subtipos y linajes | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
|--------------------|-------------|--------|--------|--------|---------|
| A/H1N1pdm09 | | | | | |
| A/H1N1 | 0,016 | | | | |
| A/H3N2 | 0,000 | 0,008 | | | |
| B(Yam) | 0,000 | 0,002 | 0,500 | | |
| B(Vict) | 0,000 | 0,000 | 0,031 | 0,125 | |

Tabla 61. Grupo de EA: Valores de significación estadística (test de McNemar; $\alpha=0,05$) entre el número de sueros con títulos pre-vacunales protectores ($\geq 1/40$) de los distintos subtipos y linajes de gripe A y B.

En el grupo de control sanos se encontraron diferencias altamente significativas en el número de sueros pre-vacunales con títulos de Acs protectores entre todos los subtipos y linajes ($p < 0,01$), a excepción de entre el subtipo A/H3N2 y el linaje B/Victoria (Tabla 62).

Valores de significación (p-valor) - Grupo de CS
Test de McNemar ($\alpha=0,05$)

| Subtipos y linajes | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
|--------------------|-------------|--------|--------|--------|---------|
| A/H1N1pdm09 | | | | | |
| A/H1N1 | 0,000 | | | | |
| A/H3N2 | 0,000 | 0,004 | | | |
| B(Yam) | 0,000 | 0,000 | 0,008 | | |
| B(Vict) | 0,000 | 0,004 | 1,000 | 0,008 | |

Tabla 62. Grupo de CS: Valores de significación estadística (test de McNemar; $\alpha=0,05$) entre el número de sueros con títulos pre-vacunales protectores ($\geq 1/40$) de los distintos subtipos y linajes de gripe A y B.



Por otro lado, mediante el test T de Student ($\alpha=0,05$) se analizaron las diferencias en la MGTs pre-vacunales entre los enfermos autoinmunes y controles sanos frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B estacionales (Tabla 63). Se observaron diferencias significativas entre la MGTs de los sueros pre-vacunales de ambos grupos (EA y controles) frente a los subtipos A/H3N2 ($p=0,024$) y el linaje B/Yamagata ($p=0,010$), siendo la media de los títulos pre-vacunales más elevada en el caso del grupo control.

| Subtipo o linaje | MGTs Pre-Vacunales | | T* | p-valor |
|------------------|--------------------|----------|--------------|--------------|
| | Grupo EA | Grupo CS | | |
| A/H1N1pdm09 | 1,1 | 1,0 | 1,193 | 0,236 |
| A/H1N1 | 16,0 | 21,9 | 1,494 | 0,139 |
| A/H3N2 | 21,5 | 33,1 | 2,289 | 0,024 |
| B(Yam) | 28,4 | 52,6 | 2,614 | 0,010 |
| B(Vict) | 30,6 | 43,1 | 1,274 | 0,206 |

T*=Valor T de Student

Tabla 63. Valores de las MGTs de los sueros pre-vacunales, valores T de Student y valores de significación (p-valor) entre EA y CS frente a los virus de gripe A y B estacionales.

3. **Análisis del efecto de la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 sobre la generación de Acs HAs frente a los virus de gripe A y B**

Población con enfermedades autoinmunes (EA):

En el grupo de población de EA se observó una TPV frente al subtipo pandémico frente al que se vacunó (A/H1N1pdm09) del 63,8% ($n=30$). Se observó seroconversión en el 66,0% de los individuos ($n=31$) y tras la vacunación se alcanzó una TS frente al subtipo A/H1N1pdm09 del 68,1% (Tabla 64).

| | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| N° Total de Sueros | 47 | 47 | 47 | 47 | 47 |
| N° de Pre-Protegidos | 2 | 9 | 17 | 19 | 23 |
| Tasa protección previa | 4,3 | 19,1 | 36,2 | 40,4 | 48,9 |
| N° de Post-Protegidos | 32 | 11 | 22 | 20 | 23 |
| Tasa Sero protección | 68,1 | 23,4 | 46,8 | 42,6 | 48,9 |
| N° Protegidos por vacuna | 30 | 2 | 5 | 1 | 0 |
| Tasa Protección Vacunal | 63,8 | 4,3 | 10,6 | 2,1 | 0,0 |
| Seroconversiones | 31 | 2 | 5 | 1 | 0 |
| Tasa Seroconversión | 66,0 | 4,3 | 10,6 | 2,1 | 0,0 |

Tabla 64. Resultados de la TPP, TS, TPV y TSC frente a subtipos de gripe A y B en el grupo población de enfermos autoinmunes.

La tasa de protección por la vacuna (TPV) fue baja (0-4,3%) en los subtipos y linajes de gripe A y B no incluidas en la formulación de la vacuna monovalente, a excepción de frente al subtipo A/H3N2, en el que este valor fue del 10,6%. En los subtipos no incluidos en la vacuna, la seroconversión (TSC) fue mayor frente al subtipo A/H3N2 y los linajes de gripe B que frente al subtipo A/H1N1, sin embargo en todos estos virus la Tasa de Seroprotección fue similar al porcentaje de Acs HAs pre-vacunales previos descritos anteriormente (TPP) (Figura 59).

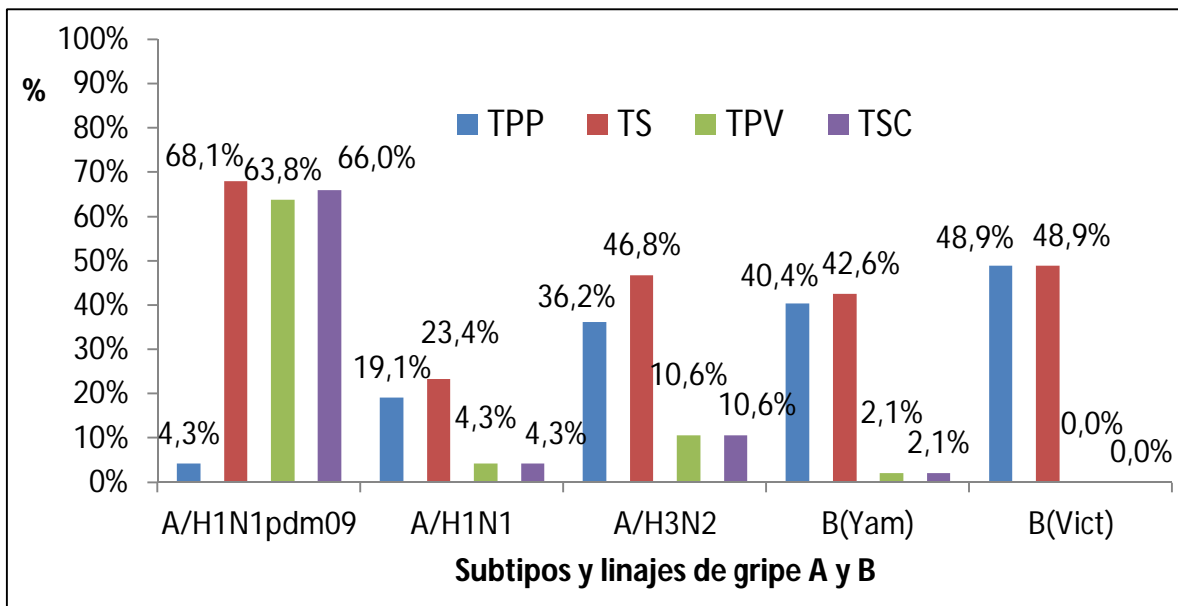


Figura 59. Porcentajes de la TPP, TS, TPV y TSC frente a subtipos de gripe A y B en el grupo poblacional de enfermos autoinmunes.

La MGTs de Acs HAs de los sueros pre y post-vacunales frente a los diferentes subtipos y linajes de gripe A y B utilizados en este estudio están expuestos en la Tabla 65. La RIC frente al subtipo A/H1N1pdm09 fue de 26,6, mientras que frente al resto de cepas se encontraron valores de la RIC de 1,9 frente al subtipo A/H3N2, 1,6 frente al subtipo A/H1N1 y 1,3 frente a ambos linajes de gripe B.

| Subtipos | MGT (IC95%) | | RIC |
|--------------------|-----------------|------------------|------|
| | PreVac | PostVac | |
| A/H1N1pdm09 | 1,9 (1,4-2,8) | 50,5 (24,8-99,6) | 26,6 |
| A/H1N1 | 4,1 (2,4-6,8) | 6,7 (3,9-11,1) | 1,6 |
| A/H3N2 | 9,8 (5,7-16,6) | 18,9 (11,9-29,7) | 1,9 |
| B/Yam | 13,0 (7,0-24,6) | 16,7 (9,3-30,5) | 1,3 |
| B/Vict | 14,4 (8,0-26,4) | 19,3 (11,3-34,5) | 1,3 |

Tabla 65. MGTs de los sueros pre y post-vacunales de la población de EA frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B. Intervalo de confianza al 95% (IC95%).



Dado que el rango de edad en los individuos de la cohorte de EA comprendió desde los 20 hasta los 89 años y el tamaño del grupo fue reducido, no se pudo evaluar la eficacia vacunal siguiendo los criterios EMA para mayores y menores de 60 años en función de cada grupo etario (18-59 años y ≥ 60 años). Para unificar los datos y poder comparar los resultados del grupo de EA y el de CS, se evaluaron los resultados de ambos grupos siguiendo los criterios EMA para individuos menores de 60 años ($TS \geq 70\%$; $TSC \geq 40\%$; $RIC \geq 2,5$). Al analizar estos datos se observó que en el grupo de EA únicamente se alcanzaron los valores recomendados por la EMA frente al subtipo A/H1N1pdm09 en términos de TSC y RIC (Tabla 66). Ninguno de los valores analizados frente al resto de subtipos y linajes de gripe A y B estacionales alcanzó los límites mínimos de aceptación de la EMA para menores de 60 años.

| Criterio EMA | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|---------------------|-----------------------------------|------|------|------|-------|
| | H1N1pdm09 | H1N1 | H3N2 | Byam | Bvict |
| Tasa Seroprotección | 68,1 | 23,4 | 46,8 | 42,6 | 48,9 |
| Tasa Seroconversión | 66,0 | 4,3 | 10,6 | 2,1 | 0,0 |
| Razón de Incremento | 6,8 | 1,1 | 1,4 | 1,1 | 1,0 |

*Color verde: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA

**Color rojo: Valor inferior al *cut-off* del criterio EMA

Tabla 66. Valores globales de la TS, TSC y RIC de los sueros analizados siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal frente a los subtipos y linajes de gripe A y B en el grupo de EA.

Cohorte de población de controles sanos (CS):

En el grupo de CS, tras la administración de la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09, la TPV y la TSC mostraron valores del 82,2% frente al subtipo pandémico (Tabla 67), obteniéndose el mismo valor en la TS debido a la ausencia de población con títulos protectores previos a la vacunación frente a este subtipo ($TPP=0,0\%$).

| | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| Nº Total de Sueros | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 |
| Nº de Pre-Protegidos | 0 | 14 | 23 | 32 | 23 |
| Tasa protección previa | 0,0 | 31,1 | 51,1 | 71,1 | 51,1 |
| Nº de Post-Protegidos | 37 | 15 | 25 | 32 | 23 |
| Tasa Seroprotección | 82,2 | 33,3 | 55,6 | 71,1 | 51,1 |
| Nº Protegidos por vacuna | 37 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Tasa Protección Vacunal | 82,2 | 2,2 | 4,4 | 0,0 | 0,0 |
| Seroconversiones | 37 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Tasa Seroconversión | 82,2 | 2,2 | 4,4 | 0,0 | 0,0 |

Tabla 67. Resultados de la TPP, TS, TPV y TSC frente a subtipos de gripe A y B en el grupo poblacional de controles sanos.

Frente al resto de subtipos y linajes de gripe A y B analizados la TPV y TSC fueron muy bajos (2,2%-A/H1N1; 4,4%-A/H3N2; 0%-B/Yamagata y B/Victoria) (Figura 60). La TS frente a estos virus fue muy similar a la TPP.

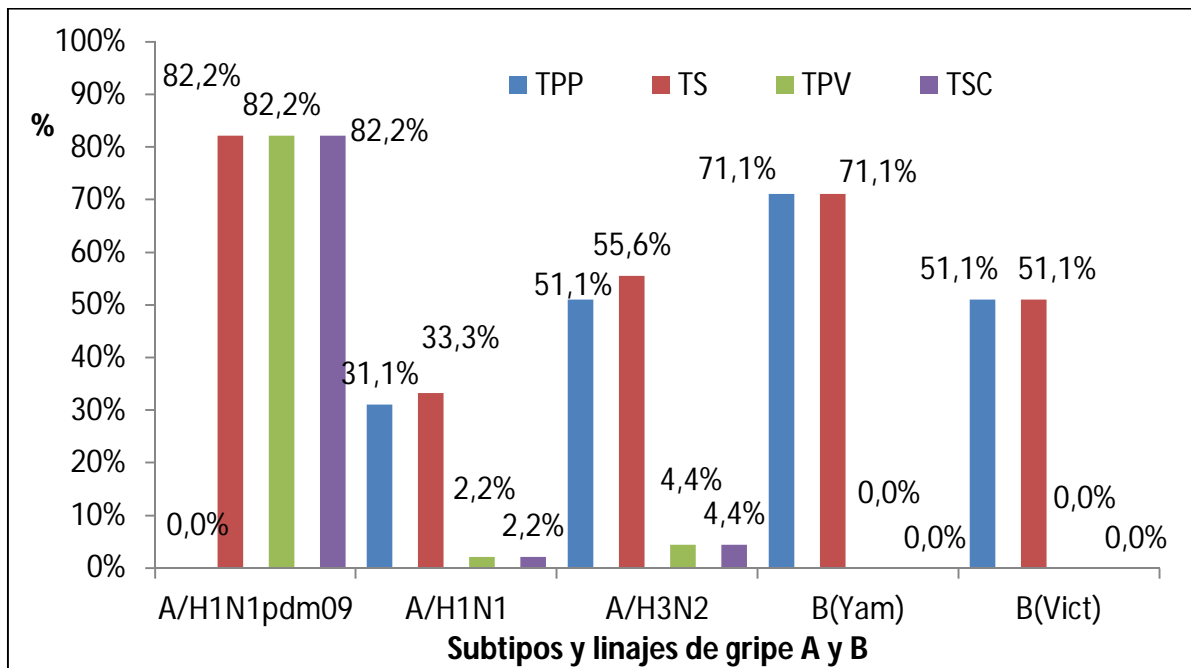


Figura 60. Porcentajes de la TPP, TS, TPV y TSC frente a subtipos de gripe A y B en el grupo poblacional de controles sanos.

En el grupo de individuos sanos la MGTs de los sueros pre y post-vacunales frente a todos los subtipos y linajes de gripe A y B utilizados en el estudio mostraron los valores expuestos en la Tabla 68. El valor de la RIC frente al subtipo A/H1N1pdm09 fue de 70,9, mientras que frente al resto de subtipos y linajes osciló entre 1,2 (linaje B/Yamagata), 1,4 (A/H1N1), 1,5 (A/H3N2) y 1,7 (linaje B/Victoria).

| Subtipos | MGT (IC95%) | | RIC |
|-------------|------------------|--------------------|------|
| | PreVac | PostVac | |
| A/H1N1pdm09 | 1,6 (1,2-2,2) | 113,4 (69,3-178,2) | 70,9 |
| A/H1N1 | 9,3 (5,4-17,3) | 12,8 (7,4-23,3) | 1,4 |
| A/H3N2 | 27,1 (17,9-39,4) | 40,2 (28,6-57,3) | 1,5 |
| B/Yam | 40,9 (25,3-62,8) | 49,9 (29,3-79,4) | 1,2 |
| B/Vict | 28,7 (16,4-50,8) | 48,4 (30,0-74,7) | 1,7 |

Tabla 68. MGTs de los sueros pre y post-vacunales de la población de CS frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B. Intervalo de confianza al 95% (IC95%)



Al igual que en el caso de la población de enfermos autoinmunes, en el grupo de individuos sanos la eficacia vacunal se evaluó siguiendo los criterios EMA para individuos menores de 60 años ($TS \geq 70\%$; $TSC \geq 40\%$; $RIC \geq 2,5$). Los datos mostraron que únicamente se cumplieron los tres criterios EMA frente al subtipo A/H1N1pdm09 (Tabla 69). Además se verificó una TS mayor al 70% frente al linaje B/Yamagata debido a la elevada presencia de sujetos con Acs pre-vacunales (TPP).

| Criterio EMA | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|------|------|------|-------|
| | H1N1pdm09 | H1N1 | H3N2 | Byam | Bvict |
| Tasa Sero protección | 82,2 | 33,3 | 55,6 | 71,1 | 51,1 |
| Tasa Seroconversión | 82,2 | 2,2 | 4,4 | 0,0 | 0,0 |
| Razón de Incremento | 10,1 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 1,2 |

*Color verde: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA

**Color rojo: Valor inferior al *cut-off* del criterio EMA

Tabla 69. Valores globales de la TS, TSC y RIC de los sueros analizados siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal frente a los subtipos y linajes de gripe A y B en el grupo de CS.

4. Análisis estadístico de la respuesta a la vacunación monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 sobre la generación de Acs HAs frente a los virus de gripe A y B

Para analizar si la vacuna monovalente indujo una respuesta humoral significativa en términos de seroconversión y de la RIC frente a los diferentes virus analizados, se realizó un test de McNemar de muestras relacionadas ($\alpha=0,05$) y un test T de Student de muestras apareadas ($\alpha=0,05$). Los resultados del Test de McNemar mostraron que la seroconversión fue significativa frente al subtipo A/H1N1pdm09 tanto en enfermos autoinmunes como en los individuos sanos ($p=0,000$ en ambos casos). No se observó ninguna respuesta heterotípica tras la vacunación monovalente frente al resto de subtipos de gripe A y B estacionales. El contraste estadístico T de Student mostró que la respuesta humoral medida como RIC fue significativa frente al subtipo A/H1N1pdm09 en ambos grupos de población, no observándose ningún aumento significativo de la RIC frente al resto de virus analizados.

Para conocer si la seroconversión y la RIC tras la vacunación fueron diferentes frente a alguno de los virus analizados entre enfermos autoinmunes y controles sanos, se realizó un análisis Chi-cuadrado ($\alpha=0,05$) de la TSC y un análisis T-de Student ($\alpha=0,05$) de la RIC entre ambas cohortes (Tabla 70).

| Subtipos y linajes | Tasa de Seroconversión | | Chi-cuadrado | | Valores de RIC | | T de Student | |
|--------------------|------------------------|------|--------------|---------|----------------|------|--------------|---------|
| | EA | CS | χ^2 * | p-valor | EA | CS | T** | p-valor |
| A/H1N1pdm09 | 68,1 | 82,2 | 3,154 | 0,076 | 43,5 | 69,4 | 1,11 | 0,27 |
| A/H1N1 | 4,3 | 2,2 | 0,301 | 0,583 | 1,6 | 1,4 | X*** | X*** |
| A/H3N2 | 12,8 | 2,2 | 3,636 | 0,057 | 1,9 | 1,5 | X*** | X*** |
| B(Yam) | 2,1 | 0,0 | 0,968 | 0,325 | 1,3 | 1,2 | X*** | X*** |
| B(Vict) | 0,0 | 0,0 | 1,000 | 1,000 | 1,3 | 1,7 | X*** | X*** |

* χ^2 = Valor Chi-cuadrado

**T = Valor T de Student

X***=imposible el cálculo estadístico debido al bajo valor de la RIC en ambas cohortes

Tabla 70. Valores Chi-cuadrado (Seroconversión), T de Student (RIC) y valores de significación estadística de cada cohorte de individuos (EA y CS) frente a los virus de gripe A y B.

Ninguno de los dos test estadísticos utilizados mostró diferencias significativas en la seroconversión ni en la RIC entre los individuos enfermos autoinmunes y los controles sanos frente a ninguno de los subtipos y linajes analizados. Pese a esta ausencia de diferencias, si se observó que tanto la TSC como la RIC frente al subtipo A/H1N1pdm09 mostraron valores más elevados en el caso del grupo poblacional de controles sanos.

5. *Análisis de los Acs HAs pre-vacunales y de la respuesta a la vacunación monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 en función de la edad y el sexo*

Para el análisis de las diferencias en el título de los Acs HAs previos a la vacunación y la RIC tras la vacunación monovalente en función de la edad y el sexo, se utilizaron los valores MGTs de los títulos pre-vacunales frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B, y posteriormente el valor de la RIC frente a cada subtipo y linaje respectivamente.

Para analizar la MGTs pre-vacunales y la RIC en el grupo de individuos con enfermedades autoinmunes se segregó la población en dos grupos etarios, un grupo que comprendía aquellos individuos entre 18 y 64 años ($n_1=36$), y otro que agrupó los que poseían más de 65 años ($n_2=12$). Por otra parte, se segregó la población en función del sexo (masculino/femenino). Los valores de la MGTs de Acs pre-vacunales y la RIC frente a todos los subtipos y linajes de gripe A y B analizados se exponen en la Tabla 71.



| | | | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|--------------|-------|-----------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | | | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| Grupo etario | 18-64 | MGTPreVac | 11,2 | 14,8 | 19,2 | 30,8 | 30,9 |
| | | RIC | 60,0 | 1,8 | 2,0 | 1,2 | 1,4 |
| | ≥65 | MGTPreVac | 9,8 | 18,8 | 29,9 | 12,5 | 31,6 |
| | | RIC | 16,9 | 1,2 | 1,6 | 1,4 | 1,2 |
| Sexo | Varón | MGTPreVac | 9,8 | 10,9 | 33,5 | 23,7 | 56,2 |
| | | RIC | 41,2 | 3,8 | 1,6 | 1,5 | 1,0 |
| | Mujer | MGTPreVac | 11,3 | 17,3 | 19,6 | 29,5 | 27,0 |
| | | RIC | 43,8 | 1,4 | 2,0 | 1,3 | 1,4 |

Tabla 71. Valores de la MGTs pre-vacunales y de la RIC en los grupos etarios y sexos frente a los subtipos y linajes de gripe A y B en la cohorte de EA.

Se realizó un test T de Student de muestras independientes ($\alpha=0,05$) para comprobar la existencia de diferencias entre los valores de la MGTs y de la RIC entre los diferentes grupos etarios y sexos para cada virus de gripe. No se observaron diferencias significativas entre los valores de la MGTs pre-vacunales del grupo etario de 18-64 años frente al grupo etario de ≥ 65 años. El análisis de la RIC mostró diferencias significativas entre ambos grupos etarios frente al subtipo A/H1N1pdm09 (T de Student=2,331; $p=0,024$), siendo la RIC más elevada en el grupo etario de 18-64 años (RIC=60,0). No se encontraron diferencias significativas en la RIC entre ambos grupos etarios frente a ninguno de los otros virus de gripe A y B incluidos, ni tampoco entre ambos sexos. Debido que el grupo de controles sanos no mostró suficiente dispersión etaria para realizar una segregación por edades como la anteriormente descrita en EA, únicamente se analizó la MGTs pre-vacunales y la RIC en función del sexo, obteniéndose los valores medios de títulos pre-vacunales y valores de RIC expuestos en la Tabla 72.

| | | | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|------|-------|-----------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | | | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| Sexo | Varón | MGTPreVac | 10,5 | 15,3 | 35,8 | 84,1 | 49,0 |
| | | RIC | 33,6 | 1,3 | 1,5 | 1,5 | 2,0 |
| | Mujer | MGTPreVac | 10,0 | 25,3 | 32,1 | 43,5 | 40,8 |
| | | RIC | 93,2 | 1,4 | 1,5 | 1,1 | 1,6 |

Tabla 72. Valores de la MGTs pre-vacunales y de la RIC en ambos sexos frente a los subtipos y linajes de gripe A y B en la cohorte de CS.

El análisis mediante el contraste estadístico T de Student de muestras independientes ($\alpha=0,05$) no mostró diferencias significativas en la MGTs de los títulos pre-vacunales ni en la RIC entre ambos sexos frente a ninguno de los subtipos y linajes de gripe A y B analizados.

Análisis comparativo de los Acs HAs previos a la vacunación frente a virus de la gripe A y B entre los diferentes grupos de individuos incluidos en el estudio

Para comprobar la existencia de diferencias en la media geométrica de los títulos de Acs HAs previos a la vacunación frente a los distintos virus de gripe A y B epidémicos entre los diferentes grupos de individuos vacunados del estudio, se confeccionó una tabla (Tabla 73) que reunió los datos anteriormente expuestos de las MGTs pre-vacunales de los individuos mayores de 65 años de cada temporada, individuos con enfermedades autoinmunes y controles sanos.

Las cohortes de población de individuos ≥ 65 años reclutadas en las temporadas 2006-07, 2008-09, 2009-10 y 2010-11 fueron nombrados con números consecutivos desde el 1 (temporada 2006-07), 2 (temporada 2008-09), 3 (temporada 2009-10) hasta el 4 (temporada 2010-11). Por otra parte, el grupo de individuos con enfermedades autoinmunes y el de individuos sanos fueron designados con los números 5 y 6 respectivamente.

| Grupos de población | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| MGTs pre-vacunales | | | | | |
| ≥ 65 años: T2006-07 (1) | 1,5 | 34,5 | 41,7 | 12,0 | 12,2 |
| ≥ 65 años: T2008-09 (2) | 1,6 | 13,6 | 18,5 | 8,7 | 31,3 |
| ≥ 65 años: T2009-10 (3) | 1,9 | 13,2 | 35,0 | 11,0 | 8,1 |
| ≥ 65 años: T2010-11 (4) | 2,4 | 29,8 | 46,2 | 20,1 | 27,5 |
| Enf. Autoinmunes (5) | 1,9 | 4,1 | 9,8 | 13,0 | 14,4 |
| Controles Sanos (6) | 1,6 | 9,3 | 27,1 | 40,9 | 28,7 |

*T-Temporada

Tabla 73. MGTs pre-vacunales frente virus de gripe A y B en todos los grupos de población incluidos en el estudio.

Para el estudio de las diferencias en la MGTs de Acs pre-vacunales frente a los diferentes virus de gripe A y B estacionales entre los grupos de población analizados, se realizó un ANOVA de un factor mediante el test de Bonferroni ($\alpha=0,05$) (Tabla 74). Se observaron diferencias significativas en la MGTs pre-vacunales frente al linaje B/Yamagata ($p<0,05$) entre el grupo de controles sanos frente a todas las cohortes de individuos ≥ 65 años de todas las temporadas y frente al grupo de enfermos autoinmunes, siendo la MGTs pre-vacunales más elevadas en el caso del grupo de controles sanos. En el caso del linaje B/Victoria, se observaron diferencias significativas de las MGTs pre-vacunales entre la población ≥ 65 años de la temporada 2008-09 con la temporada 2009-10, y entre la 2009-10 y la población de controles

sanos ($p < 0,05$), siendo más elevados los valores MGTs pre-vacunales en el caso de la cohorte de la temporada 2008-09 y en el grupo de población control.

Valores de significación (p-valor) de las MGTs de los títulos pre-vacunales- Test de Bonferroni ($\alpha=0,05$)

| Grupo modelo | Grupo comparado | Subtipos y linajes de gripe A y B | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | | A/H1N1pdm09 | A/H1N1 | A/H3N2 | B(Yam) | B(Vict) |
| ≥65 años: T2006-07 (1) | ≥65 años: T2008-09 (2) | 1,000 | 0,151 | 0,457 | 1,000 | 0,405 |
| | ≥65 años: T2009-10 (3) | 1,000 | 0,049 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | ≥65 años: T2010-11 (4) | 0,285 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | Enf. Autoinmunes (5) | 1,000 | 0,001 | 0,006 | 1,000 | 1,000 |
| | Controles Sanos (6) | 1,000 | 0,152 | 1,000 | 0,000 | 0,112 |
| ≥65 años: T2008-09 (2) | ≥65 años: T2006-07 (1) | 1,000 | 0,151 | 0,457 | 1,000 | 0,405 |
| | ≥65 años: T2009-10 (3) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,032 |
| | ≥65 años: T2010-11 (4) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | Enf. Autoinmunes (5) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,546 | 1,000 |
| | Controles Sanos (6) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,000 | 1,000 |
| ≥65 años: T2009-10 (3) | ≥65 años: T2006-07 (1) | 1,000 | 0,049 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | ≥65 años: T2008-09 (2) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,032 |
| | ≥65 años: T2010-11 (4) | 1,000 | 0,648 | 1,000 | 1,000 | 0,158 |
| | Enf. Autoinmunes (5) | 1,000 | 1,000 | 0,065 | 1,000 | 0,335 |
| | Controles Sanos (6) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,001 | 0,006 |
| ≥65 años: T2010-11 (4) | ≥65 años: T2006-07 (1) | 0,285 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | ≥65 años: T2008-09 (2) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | ≥65 años: T2009-10 (3) | 1,000 | 0,648 | 1,000 | 1,000 | 0,158 |
| | Enf. Autoinmunes (5) | 1,000 | 0,020 | 0,028 | 1,000 | 1,000 |
| | Controles Sanos (6) | 0,491 | 1,000 | 1,000 | 0,014 | 1,000 |
| Enf. Autoinmunes (5) | ≥65 años: T2006-07 (1) | 1,000 | 0,001 | 0,006 | 1,000 | 1,000 |
| | ≥65 años: T2008-09 (2) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,546 | 1,000 |
| | ≥65 años: T2009-10 (3) | 1,000 | 1,000 | 0,065 | 1,000 | 0,335 |
| | ≥65 años: T2010-11 (4) | 1,000 | 0,020 | 0,028 | 1,000 | 1,000 |
| | Controles Sanos (6) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,038 | 1,000 |
| Controles Sanos (6) | ≥65 años: T2006-07 (1) | 1,000 | 0,152 | 1,000 | 0,000 | 0,112 |
| | ≥65 años: T2008-09 (2) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,000 | 1,000 |
| | ≥65 años: T2009-10 (3) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,001 | 0,006 |
| | ≥65 años: T2010-11 (4) | 0,491 | 1,000 | 1,000 | 0,014 | 1,000 |
| | Enf. Autoinmunes (5) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,038 | 1,000 |

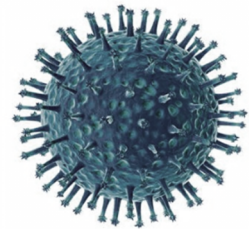
*T-Temporada

Tabla 74. Valores de significación estadística (p-valor) del test de Bonferroni ($\alpha=0,05$) entre las MGTs pre-vacunales de cada grupo poblacional analizado frente a cada subtipo y linaje de gripe A y B.

Frente al subtipo A/H3N2 se observaron diferencias significativas en las MGTs pre-vacunales entre el grupo de enfermos autoinmunes frente a las cohortes de ≥65 años de las temporadas 2006-07 y 2010-11, siendo más elevadas en el caso de ambas cohortes de

población ≥ 65 años. En el caso del subtipo A/H1N1 se observaron diferencias significativas entre las MGTs pre-vacunales del grupo de enfermos autoinmunes y las cohortes ≥ 65 años de las temporadas 2006-07 y 2010-11, siendo más elevadas en el caso de ambas cohortes ≥ 65 años. También se observaron diferencias significativas frente al subtipo A/H1N1 entre la cohorte ≥ 65 años de la temporada 2006-07 y de la temporada 2009-10, siendo las MGTs más elevadas en la temporada 2006-07. Pese a no mostrar diferencias significativas, las MGTs pre-vacunales frente a este subtipo en la población control fueron menores que en el resto de grupos ≥ 65 años. Por su parte, frente al subtipo A/H1N1pdm09 no se observaron diferencias significativas en las MGTs pre-vacunales entre ninguno de los grupos analizados.

DISCUSIÓN



Discusión

La continua actualización que cada año realiza la OMS de la vacuna antigripal estacional es lo que permite adecuar los virus gripales que componen esta vacuna con aquellos que se prevén que van a circular mayoritariamente en la siguiente temporada de gripe. Esta labor de vigilancia virológica y epidemiológica recae fundamentalmente sobre la Red Mundial de Centros Nacionales de Gripe y sobre los Centros Colaboradores de la OMS, a través del aislamiento e identificación diaria y semanal de los casos de gripe circunscritos a un determinado territorio. Las labores de los NICs han sido descritas detalladamente en la Introducción de este trabajo (169,176,177), pero una de las que posee mayor importancia es la evaluación de la eficacia de la vacuna en cada temporada, lo que ofrece datos de laboratorio en población real vacunada sobre la población vigilada. Este tipo de experimentos de evaluación de la eficacia vacunal se encuentran también dentro del proyecto plurianual "I-MOVE" que el ECDC y la OMS llevan realizando conjuntamente desde el año 2007 (178–180). En la actualidad el número de estudios a este respecto no es muy elevado a pesar de la valiosa información que ofrecen.

El Centro Nacional de Gripe de Valladolid recoge anualmente desde el año 1989 muestras de sueros previos y posteriores a la vacunación frente a la gripe de cada temporada gripal en grupos de individuos de un amplio rango de edades, pero sobre todo población mayor de 60 años. El objetivo de esta práctica es evaluar las características de la formulación vacunal y su eficacia en la generación de la respuesta humoral frente a los distintos virus de la gripe, lo que da la oportunidad de realizar investigación y vigilancia en un campo como es la respuesta serológica post-vacunal y la inmunidad previa a la vacunación, aspectos que no se estudian en muchos sitios por su laboriosidad técnica. En el presente trabajo se analizaron los Acs de los sueros pre y post-vacunales de 174 individuos en cuatro temporadas distintas pre y post-pandémicas frente a 10 virus de la gripe diferentes, lo que supuso la realización de 3.480 reacciones de inhibición de hemaglutinación durante un periodo de 2 años. Además se realizó cultivo en huevo embrionado de gallina de las cepas A/H1N1 antiguas suministradas por el Centro Colaborador de la OMS *Francis Crick Institute* de Londres para fabricar antígeno hemaglutinante de cepas de gripe antiguas.

Las infecciones por gripe constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad en la población general, pero la gravedad incide principalmente en la población anciana y personas que poseen patologías crónicas o enfermedades autoinmunes (181). El presente

estudio describe la presencia de Acs previos y posteriores a la vacunación frente a distintos virus de la gripe en las citadas poblaciones (mayores de 65 años y enfermos autoinmunes), y además aprovecha la aparición de un nuevo subtipo de gripe pandémica (A/H1N1pmd09) en el año 2009 para comprobar la presencia de Acs pre-vacunales en estas poblaciones antes y después de su vacunación pandémica.

Se realizaron ensayos serológicos de eficacia vacunal antes y después de la emergencia de este nuevo virus, así como el estudio de Acs pre-vacunales y el efecto de la vacuna frente a subtipos de gripe A y B estacionales, virus de gripe aviar que han dado casos esporádicos y brotes epidémicos localizados en humanos, y cepas de gripe A/H1N1 variantes menores de la Gripe Española de 1918 que circularon durante la década de 1940.

ESTUDIO DE LOS ACS PREVIOS A LA VACUNACIÓN Y DE LA RESPUESTA A LA VACUNA TRIVALENTE ESTACIONAL EN LA COHORTE DE INDIVIDUOS ≥ 65 AÑOS

ÁMBITO POBLACIONAL DE ESTUDIO

Este trabajo presenta datos de la presencia de Acs pre-vacunales y post-vacunales frente a distintos virus de la gripe en una población anciana, una de las dianas clásicas de la vacunación antigripal (182). La edad media de los individuos incluidos en este estudio fue de 75,9 años, siendo según los criterios de la OMS, uno de los grupos de riesgo indicados para la vacunación frente a la gripe estacional (137). La media de edad fue similar entre las diferentes cohortes analizadas, permitiendo la creación de subgrupos poblacionales homogéneos para su comparación. A pesar de ello, en la cohorte de la temporada 2008-09 la media de edad de los individuos incluidos fue significativamente superior, lo que debe ser tenido en cuenta a la hora de interpretar algunos de los apartados de este trabajo.

En el estudio previo de Acs hemaglutinantes es importante tener en cuenta la edad de los individuos, puesto que aquellos de más edad son los que más experiencias de exposición a los virus de la gripe han tenido en su vida, y por tanto en los que debería observarse una mayor cantidad de Acs pre-vacunales. Sin embargo, se ha constatado en varios trabajos científicos que la inmunosenescencia es un proceso que impacta de forma negativa en el desarrollo del sistema inmune y en su funcionamiento (134,183). Esto sucede especialmente frente a patógenos como los virus de la gripe, frente a los cuales la respuesta a las infecciones

y a la vacunación puede ser mucho menor a medida que el individuo envejece (135,136). Muchos autores definen que la inmunosenescencia del individuo provoca que el sistema inmune se vuelva hipo sensitivo y no funcional, generando una especie de estado de inmunosupresión progresiva (184). Sin embargo, aunque algunos mecanismos implicados en la respuesta inmune reducen su actividad con el tiempo, esto no ocurre de forma uniforme, ya que mientras unos elementos disminuyen su función o se mantienen (como la acción de los linfocitos CD8) (185), otros mecanismos incluso mejoran (como la producción de citoquinas por parte de los macrófagos) (186). Esto significa que la inmunosenescencia es un proceso complejo y multifactorial que ha de tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados de esta tesis. Por otra parte, se acepta comunmente que la inmunosenescencia disminuye la respuesta inmune ante las infecciones naturales y ante la vacunación (184).

Esta peor respuesta del sistema inmune frente a los virus de la gripe en los individuos de más edad puede ser consecuencia de la denominada "paradoja de *Hoskins y Keitel*" (187–190). Dicha paradoja postula que los antígenos de gripe introducidos en un individuo mediante la vacunación o la infección natural sean rápidamente neutralizados por Acs fruto de infecciones o vacunaciones anteriores por subtipos de gripe antigénicamente muy próximos al inoculado, lo que imposibilita que estos puedan generar una respuesta inmune humoral eficaz ya que estos antígenos no llegan a ser reconocidos por los linfocitos B. Este efecto puede ocurrir más frecuentemente en los individuos de más edad debido a que su historial de contactos con los virus de la gripe es mucho mayor que en individuos más jóvenes.

Los resultados de este trabajo mostraron que la distribución porcentual de sexos varió en función de cada cohorte analizada, pero no se observaron diferencias en esta proporción entre las diferentes temporadas. El número de días desde la administración de la vacuna hasta la extracción del suero post-vacunal fue en todos los individuos superior a 28 días. Las guías de la EMA para el estudio de la eficacia vacunal frente a los virus de la gripe estiman en 3 semanas el periodo desde la inoculación de la vacuna hasta la generación de una respuesta humoral completa, en la que el individuo haya alcanzado el máximo título de Acs frente a un virus de la gripe determinado (159). En el presente trabajo este periodo se fijó en 28 días mínimo para asegurar una respuesta vacunal completa. En el caso de las cohortes incluidas en este trabajo, la media de días entre la inoculación de la vacuna y la extracción del suero post-vacunal fue similar en todas las cohortes (31-33 días) a excepción de la cohorte de la temporada 2009-10 (39,1 días), en la que en algunos individuos el suero post-vacunal se extrajo entre 40 y 102 días después de la vacunación. Pese a esto, no se estimó que los

individuos en los que se tardó más tiempo en extraer el suero post-vacunal influyeran en los resultados del análisis de la respuesta humoral a la vacunación. No se han encontrado trabajos científicos que demuestren descenso o aumento significativo en el título de Acs HAs en un lapso de tiempo menor a los 6 meses tras el periodo ventana de generación de Acs tras la vacunación.

El número de individuos incluidos en cada cohorte fue similar, por lo que las comparaciones entre las cuatro cohortes han sido válidas para el establecimiento de conclusiones.

ANÁLISIS FRENTE A SUBTIPOS Y LINAJES DE GRIPE A Y B ESTACIONALES EN POBLACIÓN MAYOR DE 65 AÑOS

El análisis de la presencia de Acs protectores previos a la vacunación, así como los que se generaron como fruto de la administración de la vacuna, permitió conocer por una parte el estado de inmunización pre-vacunal de la población mayor de 65 años, y por otro la respuesta humoral tras la vacunación con vacuna trivalente estacional en dichos individuos frente a los distintos virus de la gripe A y B estacionales responsables de las epidemias de gripe entre los años 2006 y 2011, que incluye un periodo pre-pandémico y otro post-pandémico.

Estudio de los Acs pre-vacunales frente a virus A y B estacionales en la población ≥ 65 años

El estudio de la presencia de Acs pre-vacunales ofrece información acerca del nivel de inmunización y protección de una población frente a un determinado virus de la gripe. Existen trabajos en este campo que determinan una correlación entre el título de Acs hemaglutinantes y el nivel de protección que presenta una persona ante la infección por un virus de la gripe. Así, dichos autores determinan que un título protector de 1/40 reduce en un 50% la probabilidad de infección por un virus de la gripe comparado con títulos $< 1/10$ (133,191–193). Algunos de los autores de los citados trabajos manifiestan que esta definición es relativa porque la respuesta inmune ante un patógeno es un proceso complejo y multifactorial. Sin embargo el conocimiento de la presencia Acs en una población, como la estudiada en el presente trabajo, puede aportar información sobre la capacidad de los individuos para evitar la infección frente a distintos virus de la gripe. Esto puede dar pistas sobre algunas de las líneas de actuación que se pueden llevar a cabo para prevenir dichas infecciones.

Los datos de este estudio en la población mayor de 65 años mostraron títulos de Acs protectores ($\geq 1/40$) previos a la vacunación bastante elevados frente a todos los virus de la gripe A y B estacionales a excepción de frente al nuevo subtipo A/H1N1pdm09. Este porcentaje de individuos con títulos protectores fue especialmente elevado frente al subtipo A/H3N2, frente al que se observó que uno de cada dos individuos poseía Acs pre-vacunales protectores, mientras que frente al subtipo A/H1N1 y ambos linajes de gripe B este porcentaje se situó entre el 30% y el 40%. Por otra parte, frente al subtipo A/H1N1pdm09 el porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores fue muy bajo (3,4%).

El elevado porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores frente al subtipo A/H3N2 también ha sido descrito en otros trabajos científicos en población vacunada, en los que se ha observado que la seroprevalencia de Acs pre-vacunales fue mayor frente al subtipo A/H3N2 con respecto al resto de virus A y B estacionales durante la década de los años 2000 (194). El alto porcentaje de individuos con Acs pre-vacunales observados en el presente trabajo se debe a la circulación mayoritaria del subtipo A/H3N2 en una gran parte de las epidemias desde la temporada de gripe 2003-04 hasta la aparición del subtipo A/H1N1pdm09 en el año 2009 (195–201). Esto parece haber generado un aumento constante de los Acs en la población ≥ 65 años, y por consiguiente de la seroprotección, debido a la exposición natural más frecuente frente a este subtipo que con respecto a otros subtipos de gripe.

La circulación mayoritaria del subtipo A/H3N2 durante la década del 2000 puede ser debida a las diferencias en el *fitness* viral entre los diferentes subtipos y linajes de los virus que han sido objeto de este estudio (202). Esto puede haber provocado que algunos subtipos de virus de gripe hayan circulado más frecuentemente con respecto a otros durante los años anteriores a la recogida de los sueros, lo que puede ser la causa de la mayor presencia de Acs con títulos protectores en la población ≥ 65 años frente al subtipo A/H3N2 con respecto al resto de subtipos analizados. La circulación mayoritaria del subtipo A/H3N2 durante los años previos al reclutamiento de los individuos de este trabajo puede haber acarreado una menor exposición de la población al subtipo A/H1N1, lo que ha derivado en que el título de Acs frente este subtipo haya sido menor que con respecto al subtipo A/H3N2. Sin embargo, las diferencias en el porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores no parecen estar provocadas solo por este factor, sino que otros factores parecen estar implicados, como la edad de los individuos o las características virológicas de los virus circulantes.

La interacción ecológica entre los distintos virus de la gripe no es un fenómeno exclusivo de la época pre-pandémica. Posteriormente a la aparición del nuevo subtipo A/H1N1pdm09, se ha observado que desde el año 2009 en el que este virus apareció hasta la temporada de gripe 2010-2011 el subtipo pandémico fue el principal protagonista de las epidemias de gripe desplazando al subtipo A/H3N2, mientras que a partir de la temporada de gripe 2011-12 las epidemias fueron causadas por ambos subtipos que comenzaron a circular de forma simultánea, observándose una paulatina estacionalización del subtipo A/H1N1pdm09 (114,167,201,203,204). La aparición de este subtipo es responsable de la extinción del antiguo subtipo A/H1N1 (114,201,203–205). La ausencia prolongada de un determinado subtipo de gripe puede acarrear una disminución de la inmunidad de grupo en la población debido a la ausencia de nuevas infecciones, lo que puede generar un riesgo de re-emergencia de ciertos virus como ha sido anteriormente postulado en otros trabajos científicos (78).

Además de lo expuesto anteriormente, otra posible explicación a las diferencias mencionadas en el porcentaje de individuos con títulos protectores de Acs pre-vacunales, puede ser el tiempo que llevan circulando los virus de la gripe A y B estacionales desde su aparición. Así pues, frente al subtipo A/H3N2, que apareció en el año 1968, se observó mayor número de individuos con títulos pre-vacunales protectores que frente a los virus que aparecieron posteriormente, como los linajes de gripe B, que comenzaron su divergencia evolutiva en la década de 1970 (206), o el subtipo A/H1N1, que re-apareció en el año 1977 procedentes de las cepas A/H1N1 que circularon en la década de 1940 (78). La diferencia en el porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores entre ambos linajes de gripe B pudo ser debido a las diferencias en la intensidad de la circulación epidémica que han mostrado ambos linajes desde su aparición hasta la recogida de los sueros (195–201,203).

Los resultados del estudio mostraron que el subtipo frente al que se observó mayor número de individuos con títulos protectores de Acs tuvo ligeras variaciones en función del año en que las cohortes fueron analizadas. En algunas de las cohortes se observó un porcentaje de individuos con Acs pre-vacunales protectores frente al linaje B/Yamagata más elevado que frente al subtipo A/H3N2, como por ejemplo en la temporada 2008-09. Dicha cohorte fue en la que se observó una mayor edad media de la población de entre todas las cohortes analizadas, por lo que la edad parece ser un factor muy importante en la respuesta del sistema inmune a los virus de la gripe. En el caso del linaje B/Yamagata la inmunidad parece verse claramente afectada por la circulación epidémica de este virus, ya que en la cohorte de la temporada 2009-10, que fue posterior a la epidemia 2008-09 causada

mayoritariamente por el linaje B/Yamagata (200), el porcentaje de individuos con títulos protectores previos a la vacunación superó en un 10% con respecto a la cohorte de la temporada anterior.

Frente al subtipo A/H1N1 el porcentaje de individuos con Acs protectores nunca fue superior a los observados frente al subtipo A/H3N2 en ninguna de las cohortes. Se observó sin embargo que alrededor del 50% de los individuos de la primera cohorte (2006-07) poseían Acs con títulos protectores, mientras que en las dos siguientes cohortes este porcentaje supuso solo el 20%. A pesar de que A/H1N1 dejó de circular en la temporada de gripe 2009-10 tras la aparición del nuevo subtipo A/H1N1pdm09, en la cohorte de la temporada 2010-2011 uno de cada dos individuos volvió a presentar Acs protectores frente a A/H1N1. Esta observación podría obedecer a una respuesta heterotípica o de inmunidad cruzada a expensas de la circulación pandémica del nuevo subtipo A/H1N1pdm09 durante el año 2009.

Frente al subtipo A/H1N1pdm09 se observó una proporción muy baja de individuos con Acs pre-vacunales protectores en las cohortes de las temporadas previas a la aparición de este virus en el año 2009. Pese a que el porcentaje de individuos con títulos protectores fue muy bajo (en torno al 2%), demuestra la existencia de Acs entre la población mayor de 65 años frente a un virus que todavía no existía. Al igual que lo observado con el subtipo A/H1N1 en la cohorte de la temporada 2010-11, estos datos demuestran la existencia de un fenómeno de inmunidad cruzada que ha generado Acs capaces de reconocer el subtipo pandémico antes de su aparición, probablemente por compartir epítomos antigénicos conservados con otros subtipos cercanos genética y antigénicamente con el subtipo A/H1N1 estacional. Este fenómeno ha sido observado previamente en algunos trabajos científicos con porcentajes de individuos con Acs protectores muy variables (194,207-211). Sin embargo en el presente trabajo la respuesta heterotípica ha sido observada bi-direccionalmente entre ambos subtipos de gripe A/H1.

Los individuos nacidos antes del año 1950 han estado expuestos a varias cepas de gripe del subtipo A/H1N1 antigénicamente relacionadas con el actual subtipo A/H1N1pdm09 (210). Esto justificaría la presencia de Acs previos a la vacunación frente al subtipo pandémico por mecanismos de inmunidad cruzada, incluso antes de la aparición del citado subtipo. Por otra parte, según algunos autores la presencia de Acs previos a la vacunación en la población anciana explica la menor frecuencia de casos por el subtipo A/H1N1pdm09 y la baja

mortalidad en este grupo etario con respecto a las personas más jóvenes durante la pandemia del subtipo A/H1N1pdm09 en el año 2009 (210,212,213).

La proporción de individuos con títulos pre-vacunales protectores frente al subtipo A/H1N1pdm09 fue mayor en la temporada 2010-11, que fue la primera temporada post-pandémica, que en la temporada 2009-10 en la que este virus emergió (9,3% vs 2,3%). Esto sugiere que la circulación pandémica del subtipo A/H1N1pdm09 durante el año 2009 y 2010 fue suficiente para elevar de forma natural casi un 7% el porcentaje de Acs protectores previos en las personas mayores de 65 años, hecho que también ha sido observado por otros investigadores (194).

En conclusión, los individuos ≥ 65 años poseen Acs pre-vacunales frente a gripe con títulos protectores ($\geq 1/40$) en una gran proporción. Este porcentaje es mayor frente al subtipo A/H3N2, seguido de los virus de gripe B y el subtipo A/H1N1. Dicho porcentaje guarda relación directa con el tiempo mayor de circulación de A/H3N2 y los virus B. Solo un 3% de los individuos ≥ 65 años mostró títulos protectores de Acs frente al subtipo A/H1N1pdm09 en temporadas previas a la aparición de este virus. Esto contrasta con lo observado en la temporada 2010-2011, en la que esos Acs cuadruplicaron los porcentajes previos, factor a tener en cuenta para explicar la desaparición del subtipo A/H1N1 antiguo.

Estudio de la respuesta inmune humoral a la vacuna trivalente anual frente a virus A y B estacionales en la población ≥ 65 años

Para la evaluación de la respuesta inmune humoral homóloga y heteróloga frente a los virus de la gripe A y B en la población ≥ 65 años se ha utilizado fundamentalmente la tasa de seroconversión. Sin embargo para el análisis de la eficacia vacunal, el resto de parámetros empleados como la tasa de Seroprotección o la razón de incremento de la media geométrica de los títulos se han analizado en el siguiente epígrafe de este capítulo.

Los datos de este estudio muestran que la respuesta homóloga y heteróloga global a la vacunación en términos de seroconversión fue mayor frente a los subtipos de gripe A que frente a los linajes de gripe B. Así mismo, la vacuna trivalente anual indujo una inmunización global heteróloga y homóloga mayor frente al subtipo A/H3N2, presente en las vacunas de todas las temporadas, que frente a los subtipos A/H1N1 y A/H1N1pdm09. Se observó

seroconversión frente a A/H3N2 en 1 de cada 2 individuos vacunados, y en un tercio de los individuos frente al resto de subtipos de gripe A estacionales. Es importante enfatizar que pese a que la seroconversión heteróloga global fue menor frente al subtipo A/H1N1pdm09 que frente a A/H3N2, solo la cohorte de la temporada 2010-11 fue vacunada frente al virus pandémico, por lo que los valores de seroconversión frente a ambos virus no son comparables a nivel global, y por tanto sus diferencias se explicaran posteriormente específicamente para cada cohorte.

La mayor respuesta homóloga inducida por la vacuna trivalente anual frente al subtipo A/H3N2 comparada con la obtenida frente al subtipo A/H1N1 parece responder a múltiples factores. Por un lado, el subtipo A/H3N2 ha sufrido una gran adaptación a los humanos durante los casi 50 años que lleva infectando a nuestra especie (78). Esta adaptación ha provocado que en la actualidad este subtipo haya dejado de ser cultivable en huevo embrionado de gallina y solo se pueda propagar a través de cultivos celulares de líneas procedentes de mamíferos (MDCK y MDCK-Siat1), utilizadas en el aislamiento habitual de virus de la gripe (150,214,215). Por otra parte, durante los últimos años se ha observado como en los ensayos de inhibición de hemaglutinación el subtipo A/H3N2 no reconoce bien los hematíes procedentes de especies aviares como por ejemplo gallina o pavo, por lo que los hematíes de mamífero como cobaya o humano se usan en ocasiones para estos protocolos (216,217). En este sentido, antes de la extinción en el año 2009 del subtipo A/H1N1, este era fácilmente propagado en huevo embrionado de gallina, y su capacidad para unirse a hematíes de especies aviares no estaba afectada ni limitada por su adaptación al ser humano (84,218). El subtipo A/H1N1 es un virus procedente del subtipo A/H1N1 que provocó la Gripe Española de 1918, de origen aviar, y que circuló hasta 1957, re-apareciendo en 1977 con un subtipo similar a los observados durante la década de 1940 y probablemente debido a un accidente de laboratorio (96,97). Las últimas cepas del subtipo A/H1N1 desaparecidas a partir del año 2009 guardaban mucha similitud antigénica con el virus original de 1918, cuyos genes en su mayoría procedían de especies aviares (71).

Es probable que la mayor adaptación del subtipo A/H3N2 a la infección de células humanas, o lo que coloquialmente se conoce como "humanización del subtipo A/H3N2", haya contribuido a que la vacuna trivalente anual induzca una respuesta humoral más elevada frente a A/H3N2 que frente a A/H1N1, cuya hemaglutinina era parecida a la del subtipo A/H1N1 de 1918 según los datos filogenéticos obtenidos en el presente trabajo.



Los estudios en biología evolutiva postulan que una especie no está mejor o peor adaptada que otra a un ambiente o nicho ecológico concreto. Simplemente por sobrevivir una determinada especie está adaptada aunque coexista en el mismo biotopo con otras especies. La capacidad de supervivencia de dichas especies depende de su capacidad biológica para adaptarse al cambio del ambiente que las rodea, lo que en biología evolutiva se conoce como “Hipótesis de la Reina Roja” (219). Esta hipótesis determina que aquella especie que no logra adaptarse continuamente las condiciones cambiantes del ecosistema se extingue. En relación con esto, los datos de este trabajo muestran una menor respuesta humoral frente al subtipo A/H1N1 tras la vacunación, lo que parece indicar que tanto la desaparición del subtipo A/H1N1 en el año 1957 (78), como su extinción en el año 2009, hayan sido provocados por un proceso multifactorial. En este proceso estarían implicados varios elementos, como la aparición de nuevos subtipos con mayor *fitness* viral, como el subtipo A/H2N2 en el año 1957 y el A/H1N1pdm09 en el año 2009, así como la mayor capacidad del subtipo A/H3N2 por adaptarse al ser humano, hecho que ha sido comentado con anterioridad. Por otro lado, el agotamiento de individuos susceptibles de ser infectados por el subtipo A/H1N1 debido al largo tiempo de circulación de este subtipo desde 1918 puede haber limitado las infecciones por este subtipo antes de su desaparición en el año 2009.

Otro argumento para entender la menor inmunización frente al subtipo A/H1N1 en comparación con el A/H3N2 es que la deriva genética sufrida por A/H1N1 desde la década de 1940 hasta el año 2009 ha sido proporcionalmente menor en comparación con la sufrida por el subtipo A/H3N2 desde su aparición en 1968 (220–224). La tasa de error del complejo polimerasa del subtipo A/H1N1 es más baja que la del subtipo A/H3N2 (44). Debido a esto, la exposición continuada en un mismo individuo a cepas del subtipo A/H1N1 antigénicamente muy similares entre sí puede haber provocado una disminución constante de la capacidad inmunizante de la vacuna frente a este subtipo. Esto puede haber sido más relevante en personas de edad avanzada que fueron primo-infectadas o que estuvieron en contacto con cepas de gripe A/H1N1 muy antiguas, como es el caso de este estudio. En relación a esto, existen trabajos científicos que demuestran una disminución de la respuesta humoral tras las vacunaciones reiteradas con cepas de gripe que han variado antigénicamente muy poco con respecto a la cepas implicadas en la primera inmunización del individuo, ya sea por vía natural (primo-infección) o mediante la vacunación. A este proceso se le ha descrito como la paradoja de “Hoskins y Keitel” y la Doctrina del “Pecado Original Antigénico” (187–190). Algunos autores también han denominado a este fenómeno con el nombre de interferencia negativa (188,225). En este sentido, conviene recordar que toda la población incluida en este estudio ha nacido

previamente al año 1946, y por tanto todos los individuos han sido susceptibles de haber sido infectados por cepas de gripe A/H1N1 muy antiguas, incluso relacionadas o directamente por la gripe A/H1N1 de 1918.

En cuanto a la seroconversión homóloga tras la vacunación trivalente anual, cabe destacar la excelente inmunización inducida frente al subtipo A/H1N1pdm09 en los ≥ 65 años, ya que en la cohorte de la temporada 2010-11 la seroconversión frente al subtipo pandémico (79,1%) fue casi un 30% mayor que frente al subtipo A/H3N2 (51,2%), que hasta entonces había sido el subtipo que mayor inmunización homóloga había mostrado de entre todos los virus de gripe A y B estacionales analizados. Esta seroconversión homóloga permitió alcanzar niveles de seroprotección en la cohorte 2010-11 del 86% frente al nuevo subtipo pandémico. Estos resultados enfatizan la importancia de las primeras exposiciones a los virus de la gripe en los individuos. El sistema inmune puede limitar la respuesta humoral frente a un virus si el subtipo emergente es filogenéticamente muy cercano al que primo-infectó a un determinado individuo, como en el caso de las cepas vacunales A/H1N1 de los años 2000 y las cepas A/H1N1 antiguas de la década de 1940. Por el contrario, puede inducir una respuesta humoral mayor si el subtipo emergente tiene una distancia genética mayor con el virus que primo-infectó a un individuo, como el subtipo A/H1N1pdm09 con las cepas A/H1N1 variantes menores de la Gripe Española de 1918.

Los datos de este trabajo mostraron que la vacunación frente al subtipo A/H1N1 en las tres primeras cohortes del estudio indujo una leve pero significativa seroconversión heterotípica frente al subtipo A/H1N1pdm09, observándose seroconversión entre el 13% y el 20% de los individuos vacunados. Dicha respuesta fue mucho más elevada, como se ha expuesto anteriormente, en la cohorte de la temporada 2010-11 en la que se vacunó con el subtipo A/H1N1pdm09. Por otra parte, se observó también una leve pero significativa seroconversión heterotípica (16,3%) en la cohorte de la temporada 2010-11 frente al subtipo A/H1N1. Estos datos demuestran que la vacunación frente a los subtipos A/H1N1 y A/H1N1pdm09 inducen una respuesta inmune cruzada entre estos dos virus, probablemente porque la relación filogenética entre estos dos subtipos permite que los Acs generados frente a un subtipo reconozcan al otro. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores, los cuales observaron una pobre respuesta frente al subtipo A/H1N1pdm09 cuando se vacunó con el virus A/H1N1 antiguo, sobre todo en individuos mayores de 65 años, menor incluso a la obtenida en este trabajo (210).



Siguiendo los resultados expuestos en este trabajo, la optimización de la vacunación en la población anciana frente a subtipos de gripe A que poseen un nivel moderado de deriva antigénica, como el antiguo subtipo A/H1N1, se podría llevar a cabo evitando la vacunación sucesiva en cada campaña vacunal. Eso equivaldría a que la vacunación se debería realizar cuando se hubiera observado una deriva antigénica suficientemente elevada entre la cepa vacunal y la cepa epidémica, con el objetivo de asegurar un fenómeno *booster* eficaz. Este sistema de vacunaciones entrañaría una excesiva dificultad logística. Sin embargo, apoya la idea de mejorar la fabricación y el diseño de las vacunas hacia un modelo más individualizado o personalizado en función de los requerimientos de cada persona (por ejemplo la vacuna adyuvada) (226–228). También apoya la necesidad expresada en los últimos años del desarrollo de una vacuna universal que pueda hacer frente a todos los subtipos y linajes de gripe A y B existentes en la actualidad, o los que puedan emerger en el futuro (128,229,230). A pesar de esta argumentación, la vacunación anual reiterada de los individuos mayores de 65 años parece seguir siendo el mejor método de protección frente a la gripe en la actualidad, ya que la inmunización generada por esta, aunque no sea óptima en muchos casos, permite en la mayor parte de los mismos aumentar el título de Acs, y por tanto mejorar la protección del individuo frente a la infección por virus de la gripe.

En otro orden de cosas, los datos obtenidos en este trabajo mostraron que la seroconversión homóloga inducida por la vacuna trivalente anual frente a los linajes de gripe B fue significativa frente al linaje B/Victoria en las cohortes vacunadas frente a este linaje, y frente a B/Yamagata en la cohorte 2008-09 vacunada frente a este linaje y en la cohorte 2006-07 que fue vacunada frente a B/Victoria. Como se ha comentado anteriormente, la seroconversión frente a los linajes de gripe B fue menor que frente a los subtipos de gripe A, alcanzándose valores de entre el 34% frente a B/Yamagata y el 14%-35% frente a B/Victoria.

En todas las cohortes se observó seroconversión heteróloga frente al linaje de gripe B no incluido en la vacuna en dicha temporada, en porcentajes que fueron desde el 4% al 11% frente al linaje B/Yamagata cuando era el B/Victoria el que estaba incluido en la vacuna, y del 9% frente al linaje B/Victoria en la cohorte vacunada con el linaje B/Yamagata. Estos valores demuestran una cierta respuesta humoral heterotípica entre ambos linajes de gripe B que ya ha sido descrita en otros trabajos científicos (122,231–233). Pese a que esta respuesta heteróloga no parece ser muy común y existe limitada información científica sobre el tema, sí que existen trabajos donde se ha demostrado protección cruzada en vacunados con linaje B/Yamagata frente a infecciones por linajes B/Victoria, hecho que no parece suceder en el

sentido opuesto (233). De forma contraria a lo expuesto en el trabajo de Levandowski y colaboradores (233), los datos de esta tesis muestran esta respuesta heterotípica en sentido contrario, observándose respuesta heterotípica frente a B/Yamagata en vacunados con linaje B/Victoria. Este hecho demuestra que la respuesta heterotípica entre estos dos linajes existe pero es un hecho poco conocido del que aún no se conocen las particularidades de su funcionamiento.

Durante las temporadas de gripe en las que se reclutaron las cohortes de ≥ 65 años del estudio, tuvo lugar un *mismatch* en los linajes de gripe B circulantes con respecto a los incluidos en la vacuna de la temporada 2008-09 (198,200,201,203). Este hecho, que ha sido recurrente en las últimas dos décadas en todo el mundo (234,235), apoya la necesidad de incluir la formulación cuadrivalente de la vacuna antigripal en el calendario vacunal. Esto evitaría fallos en la inmunización de la población en las temporadas en las que exista un fallo en la previsión del linaje de gripe B mayoritario (236–239), evitando los costes derivados de la atención sanitaria y del descenso en la productividad laboral como consecuencia de casos de gripe en vacunados (240).

En conclusión, La seroconversión tras la vacunación de los ≥ 65 años fue mayor frente a los virus de la gripe A que frente a los virus B. Esta respuesta fue mayor frente al subtipo A/H3N2 en todas las temporadas a excepción de la primera temporada post-pandémica, que fue mayor frente al subtipo A/H1N1pdm09. La vacunación indujo una leve seroconversión heteróloga entre los subtipos A/H1N1 y A/H1N1pdm09 y viceversa, y también entre los linajes B/Victoria y B/Yamagata, que se corresponde con la distancia genética entre linajes B y subtipos de gripe A.

Eficacia de la respuesta homóloga y heteróloga a la vacuna trivalente anual frente a los virus de gripe A y B estacionales

Para evaluar la eficacia de la respuesta inmune homóloga y heteróloga a la vacuna trivalente anual frente a los virus de gripe A y B estacionales, se consideró que la vacunación fue eficaz si se cumplió al menos uno de los tres parámetros EMA analizados para individuos ≥ 60 años (Tasa de Seroprotección, tasa de seroconversión y Razón e incremento) (8,241). Los datos que se presentan en este trabajo mostraron que en todas las cohortes se cumplieron los tres criterios EMA frente al subtipo A/H3N2 en las cuatro temporadas analizadas, mientras que

frente al subtipo A/H1N1 se cumplieron los tres criterios solo en las dos primeras cohortes de las dos primeras temporadas analizadas, y solo uno de ellos en las otras dos cohortes.

De acuerdo con los criterios EMA de eficacia vacunal, la vacuna se mostró eficaz serológicamente frente a los subtipos A/H3N2 y A/H1N1 en todas las cohortes del estudio. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, en el caso del subtipo A/H1N1 solo se cumplieron los tres criterios EMA en las dos cohortes de las dos primeras temporadas, mientras que en la temporada 2009-10 que fue la última en la que se vacunó frente a este subtipo, solo se cumplió el criterio de la Razón de Incremento, que además fue mucho menor que en la anterior temporada. En la cohorte 2009-10 la vacunación frente al subtipo A/H1N1 se realizó con la cepa A/Brisbane/59/2007, que fue la misma cepa que se usó en la vacunación de la cohorte 2008-09 en la que si se cumplieron los tres criterios EMA. Pese a que se utilizó la misma cepa de gripe A/H1N1 en dos temporadas consecutivas, no se logró obtener el mismo nivel de inmunización en ambas cohortes.

Por otra parte, se observó un acontecimiento similar frente al subtipo A/H3N2. Aunque frente a este subtipo se cumplieron los tres criterios EMA en las cohortes de las temporadas 2008-09 y 2009-10, en esta última la Razón de Incremento fue menor que en la anterior cohorte como frente al subtipo A/H1N1. Al igual que en el caso del subtipo A/H1N1, la vacuna frente al subtipo A/H3N2 estuvo compuesta en ambas temporadas por la misma cepa (A/Brisbane/10/2007), por lo que también se observó un descenso en la capacidad inmunogénica de la vacuna en dos temporadas consecutivas utilizando la misma cepa vacunal. Una de las posibles causas de la menor eficacia serológica de la vacuna administrada en la cohorte de la temporada 2009-10 frente a estos dos subtipos de gripe A puede ser la aparición del nuevo subtipo pandémico A/H1N1pdm09. La dispersión de este virus en España durante la segunda onda pandémica comenzó a partir del mes de Octubre (36), coincidiendo con la campaña de vacunación de la cohorte ≥ 65 años de la temporada 2009-10. De hecho, gran parte de los individuos de esta cohorte fueron vacunados en el mes de Noviembre, que fue justo el momento en el que se alcanzó el pico máximo de incidencia del virus pandémico en España, con tasas de incidencia en torno a los 372 casos/100.000 habitantes (36). Según esto, es posible y además probable que muchos individuos de esta cohorte se vieran expuestos al virus pandémico durante el periodo ventana tras la administración de la vacuna, lo que puede haber repercutido negativamente en la respuesta inmune inducida por la vacuna trivalente anual frente a los subtipos A/H3N2 y A/H1N1.

Pese a que en la cohorte de la temporada 2010-11 la vacunación se realizó frente al subtipo A/H1N1pdm09 y no frente al subtipo A/H1N1, se cumplió uno de los criterios EMA de eficacia vacunal frente al subtipo A/H1N1 (tasa de seroprotección). Siguiendo los criterios anteriormente descritos la vacunación con el subtipo A/H1N1pdm09 indujo una protección heteróloga eficaz frente al subtipo A/H1N1 en la cohorte 2010-11. Sin embargo, dado que la tasa de seroconversión y la razón de incremento obtuvieron valores muy bajos, gran parte del valor observado de la tasa de seroprotección se debe al alto porcentaje de individuos con títulos protectores previos a la vacunación frente al subtipo A/H1N1. Por esto la vacunación frente al subtipo A/H1N1pdm09 realmente no indujo una respuesta humoral heteróloga eficaz frente al subtipo A/H1N1.

Frente al virus pandémico A/H1N1pdm09 se cumplieron los tres criterios EMA en la cohorte 2010-11 que fue vacunada frente a este subtipo, observándose valores muy altos de la tasa de seroprotección, tasa de seroconversión y de la razón de incremento. El alto valor que alcanzaron estos tres criterios tras la vacunación con un subtipo nuevo de gripe muestra la gran importancia que poseen las primo-infecciones en la población humana incluso en los individuos de más edad, ya que puede generar una respuesta homóloga muy elevada que proteja de forma eficaz a un gran porcentaje de la población. Esto demuestra la necesidad de la vacunación en grupos de personas pertenecientes a grupos de riesgo como los individuos mayores de 65 años (182), ya que aunque muchas veces no se conoce fielmente la eficacia de la vacunación frente a ciertos virus de la gripe, siempre inducen una respuesta que mejora el título de Acs del individuo, y por consiguiente la inmunidad de grupo (242,243).

La vacunación frente al subtipo A/H1N1 en las tres primeras cohortes del estudio provocó que la razón de incremento superara el valor *cut-off* EMA frente al subtipo A/H1N1pdm09, por lo que la vacunación frente al subtipo A/H1N1 indujo una respuesta heterotípica eficaz frente al subtipo pandémico antes de su aparición. Aunque no se alcanzaron los valores *cut-off* EMA de la tasa de seroprotección y de seroconversión, el hecho de que se alcancen valores de razón de incremento por encima del punto de corte demuestra que la vacunación trivalente anual puede inducir una respuesta humoral heterotípica eficaz frente a virus de la gripe que aún no existen. Este hecho es interesante para la protección de la población frente a futuros virus de la gripe emergentes.

La eficacia de la vacunación respecto a los linajes de gripe B analizados parece menor que la alcanzada frente a los subtipos de gripe A/H3N2 y A/H1N1. Frente a los virus de gripe B

se cumplieron los tres criterios EMA solo en las cohortes de las temporadas 2006-07 frente al linaje B/Victoria y en la cohorte de la temporada 2008-09 frente al linaje B/Yamagata, y al menos uno de los criterios EMA solo en algunas cohortes frente al linaje B/Victoria (cohortes de las temporadas 2008-09 y 2010-11). A la vista de los resultados de este estudio, la vacuna administrada a la cohorte de la temporada 2006-07, en la que se utilizó la cepa B/Malaysia/2506/2004 del linaje B/Victoria, fue más eficaz que la utilizada en las últimas dos cohortes que fueron vacunadas con la cepa B/Brisbane/60/2008 del linaje B/Victoria. En estas dos últimas temporadas se observó un hecho similar al anteriormente comentado frente a los subtipos A/H1N1 y A/H3N2. La vacunación con la cepa B/Brisbane/60/2008 del linaje B/Victoria durante dos temporadas seguidas (2009-10 y 2010-11) indujo una menor respuesta humoral en la temporada 2009-10, por lo que es probable que la infección por el subtipo pandémico en algunos individuos durante el periodo ventana tras la vacunación haya limitado la respuesta humoral frente al linaje B/Victoria en la cohorte de la temporada 2009-10.

Los virus de la gripe B llevan circulando en la población humana mucho tiempo, siendo la cepa B/Lee/40 aislada en el año 1940 la primera gripe B de la que se tiene constancia (244,245). El ser humano es casi exclusivamente su único hospedador, pero los virus de la gripe B también se encuentran de forma esporádica en otros mamíferos como las focas (12–14). Debido a esto y a que la población del estudio lleva muchos años en contacto con estos virus debido a su elevada edad, lo esperable hubiera sido que la vacunación frente a los linajes de gripe B hubiera mostrado más eficacia, y que la tasa de seroprotección alcanzada hubiera sido más elevada frente a estos virus.

Los datos mostrados en este trabajo denotan un fallo en la capacidad inmunizante de las vacunas anuales frente al linaje B/Victoria en las dos últimas temporadas analizadas, mientras que en la primera temporada del estudio sí se alcanzó una respuesta humoral eficaz. Este fallo de eficacia no parece observarse frente al linaje B/Yamagata en la temporada 2008-09. En relación con esto, en las temporadas que se han estudiado en este trabajo ocurrió un *mismatch* entre la cepa vacunal y el linaje de gripe B mayoritario en una de las cuatro temporadas, concretamente en la temporada 2008-09 en la que se vacunó con el linaje B/Yamagata y sin embargo circuló mayoritariamente el linaje B/Victoria (200). Este *mismatch* es debido a un fallo por parte de la OMS y sus NICs en la previsión del linaje de gripe B mayoritario circulante en la siguiente epidemia de gripe, y que es probable que sea el responsable muchas veces de los fallos en la inmunización de la población. La corrección de este problema es extremadamente difícil, puesto que la predicción de las cepas circulantes

mayoritarias de la siguiente epidemia se realiza mediante el estudio y vigilancia de los virus que circulan la temporada anterior, lo que se denomina como ondas precursoras. Sin embargo, debido a que las relaciones biológicas de los virus de la gripe con el ser humano y otros hospedadores están influenciadas por múltiples factores, es muy difícil realizar una predicción totalmente fiable de que linaje de gripe B va a circular de forma mayoritaria.

En los últimos años se ha asistido a una circulación conjunta de ambos linajes que muchas veces sucede en un porcentaje muy similar, como en la temporada 2013-14 (114), por lo que la vacunación frente a uno de los dos linajes en la actualidad resulta altamente ineficiente. En este sentido, la formulación trivalente de las vacunas antigripales puede inducir una respuesta inmune defectuosa en la población mayor de 65 años cuando exista este *mismatch* (234,246). Debido a esto, cabe señalar de nuevo la necesidad de introducir de forma sistemática la vacuna tetravalente para el grupo etario de personas mayores de 65 años (235,236,246), además de la necesidad de un seguimiento correcto de las cepas de gripe A y B estacionales para realizar una predicción fiable de las que van a circular en la siguiente temporada gripal.

Analizando los datos mostrados en este trabajo, cabe hacer una lectura crítica de los criterios EMA usados hasta el año 2014, ya que al exigir el cumplimiento de uno solo de estos criterios puede a veces sobrevalorar o minusvalorar el efecto inmunizante de la vacuna. En este sentido, algunos autores aclaran que la razón de incremento y la tasa de seroconversión pueden infra estimar la inmunogenicidad real de una vacuna, y sin embargo, la tasa de seroprotección puede sobreestimar esta (247). En opinión del autor de este trabajo, una vez cumplido uno de los parámetros, se debe valorar la intensidad de los otros dos para tener una conclusión razonable y razonada sobre la eficacia de la vacuna estacional antigripal, opinión que también se encuentra reflejada en la literatura científica (133).

En conclusión, aplicando los criterios EMA para ≥ 60 años, todas las vacunaciones frente a la gripe en los ≥ 65 años fueron serológicamente más eficaces frente a los subtipos de gripe A que frente a los subtipos de gripe B. La mayor eficacia vacunal se observó frente al subtipo A/H3N2, solo superada por el nuevo subtipo A/H1N1pdm09. La inmunización frente al linaje B/Victoria no cumplió los criterios EMA en dos de las temporadas sin *mismatch* frente a este linaje.

Análisis de los Acs pre-vacunales y del efecto de la vacunación frente a virus de la gripe A y B estacionales en función de la edad y el sexo en la población ≥ 65 años

Para el estudio de este epígrafe, se ha considerado que no existe la misma inmunosenescencia en todos los individuos mayores de 65 años, sino que está aumentando con la edad, haciéndose más patente en los individuos más ancianos (134–136,183). Debido a esto, para el análisis de los resultados se realizó una segregación de los individuos mayores de 65 años en 6 grupos que se describen a continuación; 65-74 años, 75-84 años, ≥ 85 años, 65-84 años, 65-70 años y ≥ 71 años; realizándose las comparaciones oportunas entre ellos.

Los datos analizados en este trabajo mostraron diferencias significativas en la media geométrica del título de Acs pre-vacunales frente al subtipo A/H1N1pdm09 y frente a linaje B/Victoria, en razón de la edad pero no del sexo. A este respecto, cabe señalar que hubo diferencias frente al subtipo A/H1N1pdm09 y frente al linaje B/Victoria en los individuos mayores de 85 años con respecto a los individuos más jóvenes, observándose mayores títulos geométricos de Acs en el caso de los individuos de mayor edad, no encontrándose diferencias entre ninguno de los grupos etarios frente al resto de subtipos y linajes analizados.

Los datos mostrados en este trabajo contrastan con los fenómenos de inmunosenescencia descritos (134–136), por los que cabría esperar una menor presencia de Acs pre-vacunales y como consecuencia una menor media geométrica de los títulos a medida que aumenta la edad de los individuos. Es importante reseñar que la media geométrica del título de Acs pre-vacunales frente al subtipo A/H1N1pdm09 fue la menor de todos los virus analizados en este estudio debido a la novedad de esta cepa, y que las diferencias entre unos grupos etarios y otros, pese a ser significativamente diferentes, son muy pequeñas. Esta diferencia en la presencia de Acs pre-vacunales frente al subtipo A/H1N1pdm09 en mayores de 85 años ha sido descrita también en otros trabajos científicos (208). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la primo-exposición a subtipos o cepas de gripe similares a la Gripe Española de 1918, y también con el mayor tiempo de exposición en la vida del individuo a cepas antigénicamente relacionadas con el actual subtipo pandémico. Las primeras exposiciones naturales a virus de la gripe en la vida de un individuo son determinantes sobre la capacidad de la población a la hora de combatir ciertos virus de la gripe (187).

En el caso del linaje B/Victoria, el mayor título de Acs pre-vacunales en personas muy mayores puede ser debido al largo tiempo que llevan circulando los virus de la gripe B entre la población humana y a las características de la evolución de los linajes desde su separación en los años 1970 (244,245), idea que ya ha sido expuesta en este trabajo. Tras la separación en dicha década de los virus de la gripe B en los dos linajes actualmente conocidos (Victoria y Yamagata), estos no circularon de forma simultánea durante los siguientes años, sino que el linaje Victoria fue el predominante durante la década de 1980 mientras que el linaje Yamagata fue mayoritario en la década de 1990 (248). La circulación mayoritaria del linaje Victoria durante la década después de la separación de ambos linajes sugiere que la diferenciación no fue simétrica entre ambos virus, sino que en opinión del autor del presente trabajo, el linaje Victoria se comportó como una rama principal dentro de la filogenia de los virus de la gripe B, mientras que el linaje Yamagata se desligó de este posteriormente.

A pesar de que en el estudio filogenético realizado en este trabajo no ha sido plasmada la relación genética entre los virus de gripe B, la similitud entre el linaje B/Victoria y la cepa de gripe B/Lee/40 y otras cepas de gripe B muy antiguas es mayor que si se compara con el linaje B/Yamagata, hecho que ha sido observado por algunos investigadores (248). Esto sugiere que la presencia de un mayor título de Acs pre-vacunales en los individuos más mayores se debe a que el actual linaje B/Victoria guarda mayor similitud antigénica con las cepas de gripe B más antiguas que primo-infectaron a los individuos más ancianos, y que por tanto el concepto de la Doctrina del Pecado Original Antigénico (187,249–253) puede ser también válido para los virus de la gripe B. En nuestro conocimiento, este es uno de los primeros trabajos científicos que sugiere esta posibilidad.

No se encontraron diferencias en el nivel de Acs previos a la vacunación en función del sexo de los individuos frente a ninguno de los subtipos y linajes de gripe A y B, por lo que se el sexo de los individuos mayores de 65 años no es un factor que influya en la inmunidad previa hacia los virus de la gripe.

La razón de incremento inducida por la vacuna trivalente anual fue mayor frente al linaje B/Yamagata en el grupo etario de individuos más jóvenes con respecto al grupo etario de ≥ 85 años. Este hecho ya ha sido corroborado en otros trabajos previamente realizados por otros autores en los que se ha observado una menor respuesta ante la vacunación con el linaje B/Yamagata como consecuencia del aumento de la edad del individuo (231). Por otra parte, esto concuerda con la disminución de la capacidad inmunizante de la vacuna debido a los

procesos de inmunosenescencia del individuo (134–136,183), como ya ha sido comentado en este trabajo anteriormente.

A pesar de que los datos de este estudio solo han mostrado diferencias en la respuesta inmune a la vacuna en función de la edad frente a un solo tipo de virus de la gripe (B/Yamagata), la respuesta humoral homóloga y heteróloga tras la vacunación en la población anciana es un efecto complejo que no depende solo de la edad del individuo, sino también del historial de vacunación y de la historia de las infecciones naturales frente a los diferentes virus de la gripe (254). Debido a esto, la disminución de la actividad del sistema inmune frente a la gripe en personas mayores es un proceso complejo y multifactorial que no puede ser explicado únicamente por un solo factor como la edad. Pese a que existen publicaciones científicas que sugieren la existencia de diferencias en la respuesta a la vacunación en función del sexo de los individuos (255–257), en este trabajo no se observó una respuesta diferente frente a los virus analizados entre hombres y mujeres.

En conclusión, las MGTs de Acs pre-vacunales frente al subtipo A/H1N1pdm09 y al linaje B/Victoria fueron mayores en los ≥ 85 años, en consonancia con su año de nacimiento y la circulación del subtipo A/H1N1 de la Gripe Española. La razón de incremento frente al linaje B/Yamagata fue mayor en los individuos < 85 años, por lo que esta edad fija un punto de inflexión importante en la edad de respuesta a la vacunación trivalente antigripal.

Estudio de la respuesta humoral frente a virus de la gripe A y B estacionales en función del tipo de vacuna administrada

Pese a que la tendencia en los últimos años es la utilización cada vez más frecuentemente de la vacuna adyuvada en poblaciones de más de 65 años, en las cohortes analizadas el 60% de las vacunas administradas fueron de tipo fraccionado. Estos datos permitieron analizar si la respuesta inmune inducida por la vacuna trivalente anual fue diferente en función del tipo de vacuna utilizada. El análisis de estas diferencias se realizó atendiendo a los parámetros de seroconversión y razón de incremento entre la media geométrica de los títulos pre y post-vacunales.

Los datos analizados mostraron que la seroconversión inducida frente a los subtipos A/H3N2 y A/H1N1 por las vacunas de tipo adyuvado tuvo diferencias significativas de 1,5 a 2

veces mayores que la inducida por la vacunas de tipo fraccionado, mientras que la razón de incremento solo fue significativamente mayor frente al subtipo A/H3N2. Es importante resaltar que la seroconversión y la razón de incremento no fueron diferentes entre ambos tipos de vacunas para el subtipo pandémico A/H1N1pdm09 ni para ninguno de los linajes de gripe B, por lo que ambos tipos de vacunas indujeron una inmunización similar frente a estos tres virus.

El uso de adyuvantes en la composición química de la vacuna trivalente anual ha sido postulado como un buen método para mejorar su capacidad inmunizante en la población general y anciana (258–260). Este tipo de vacunas aumentan su poder inmunizante mediante la prolongación del tiempo de exposición del agente infeccioso al sistema inmune del hospedador (226). Sin embargo, en el caso de la población analizada en este trabajo, esto solo parece demostrarse frente a dos de los subtipos de gripe A, sin observarse un efecto diferente frente al resto de los subtipos y linajes de gripe A y B.

Esta ausencia de diferencias entre ambos tipos de vacunas no parece constatarse en otros trabajos científicos, donde si se observa una clara y mayor eficacia de la vacuna trivalente adyuvada con respecto a las vacunas no adyuvadas frente a todos los subtipos y linajes de gripe A y B estacionales en población mayor de 65 años (227,261). Sin embargo, en algunos de estos trabajos se expone también la ausencia de buena documentación y la realización de este tipo de estudios con un bajo número de sujetos, en personas muy mayores con edades superiores a 85 años o muy frecuentemente en individuos con largas estancias hospitalarias (261), lo que puede haber supuesto un *bias* en estos estudios y dificultado la obtención de conclusiones realistas. Debido a esto, en la actualidad tomando en consideración los resultados del presente trabajo y el de otros investigadores no se conoce bien el verdadero beneficio de este tipo de vacunas en la población mayor de 65 años, por lo que es necesaria la realización de este tipo de experimentos con un mayor número de sujetos.

En conclusión, las vacunas adyuvadas generan en la población ≥ 65 años una respuesta humoral significativamente mayor frente a los subtipos A/H1N1 y A/H3N2 en comparación con las fraccionadas. Sin embargo, no existen diferencias entre ambos tipos de vacuna frente al subtipo A/H1N1pdm09 y los linajes B/Yamagata y B/Victoria.

ANÁLISIS FRENTE A SUBTIPOS DE VIRUS DE LA GRIPE A/H1N1 ANTIGUOS EN POBLACIÓN MAYOR DE 65 AÑOS

El análisis de la presencia de Acs protectores previos a la vacunación, así como los obtenidos tras la administración de la vacuna trivalente anual, permitió conocer el estado de inmunización de la población mayor de 65 años y la respuesta humoral heterotípica de la vacuna trivalente anual en este grupo poblacional frente a algunos de los virus de la gripe A/H1N1 que circularon en la década de 1940.

El autor de esta tesis ha creído interesante conocer la inmunidad existente y la respuesta heterotípica tras la vacunación trivalente anual frente a cepas de virus de la gripe A/H1N1 antiguas variantes menores de la Gripe Española de 1918, y que no existen en la actualidad. Debido a la edad de los individuos de este trabajo, todos han estado en contacto con estos virus o han sido infectados por ellos durante su infancia o primeras etapas de su vida, por lo que en la actualidad se cuenta con un grupo de población que ha tenido experiencias frente a virus muy antiguos y que puede poseer Acs protectores. Sin embargo dentro de unos 20-30 años probablemente no existirá ningún individuo con Acs frente a estas cepas tan antiguas, por lo que la protección de grupo que aún existe en la población humana es probable que se vaya eliminando paulatinamente, lo que puede ser un riesgo para la re-emergencia de alguno de estos virus.

Se eligieron dos cepas de gripe A/H1N1 antiguas muy representativas para valorar la presencia de Acs previos a la vacunación y la respuesta humoral heterotípica tras la vacunación en personas que han estado en contacto con ellas. Por un lado se escogió la cepa A/Weiss/43, cepa que ha sido muy utilizada en trabajos científicos con otros cometidos y que es un buen representante de los virus que circularon en la década de 1940 (92,223,262,263). Por otra parte se eligió la cepa A/FM/1/47 debido a la importancia que tuvo está en la evolución del subtipo de gripe A/H1N1 tras la década de 1940, ya que A/FM/1/47 surgió como un virus desligado probablemente de la cepa A/Weiss/43 pero que sufrió un *drift* antigénico mucho mayor a lo esperable tras una epidemia anual, lo que llevó a este virus a generar la pseudo-pandemia del año 1947 (91). Dicha cepa además fue la precursora de las cepas A/H1N1 que re-emergieron en 1977 como A/USSR/90/77 (93,96,97), por lo que tiene una gran relevancia en la evolución del subtipo A/H1N1 hasta su extinción en el año 2009 tras la aparición del nuevo subtipo pandémico A/H1N1pdm09.

Debido a que no existen muchas publicaciones en la literatura científica que evalúen la presencia de Acs en población humana frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas derivadas de la Gripe Española de 1918, este es uno de los primeros trabajos científicos en presentar datos sobre la prevalencia de Acs frente a cepas de gripe A/H1N1 no circulantes desde hace más de 60 años.

Estudio de los Acs pre-vacunales frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas en la población ≥ 65 años

En este trabajo, pese a la ausencia de circulación de ambas cepas de gripe A/H1N1 antiguas desde la década de 1940, se observó la presencia de Acs pre-vacunales protectores en casi el 45% de la población mayor de 65 años frente a la cepa A/Weiss/43 y en el 20% frente a la cepa A/FM/1/47. Los datos aquí presentados muestran que la población estudiada posee una moderada inmunización frente a dichas cepas de gripe A/H1N1 antiguas, siendo mayor frente a la cepa A/Weiss/43. Es probable que la presencia de estos Acs previos a la vacunación se deba a la memoria inmunológica que poseen los individuos analizados por haber estado en contacto con estas cepas durante su circulación epidémica en la década de 1940 (264,265). Los Acs generados por la respuesta humoral ante el contacto de estas personas con cepas tan antiguas se han mantenido hasta nuestros días. Esto indica que los Acs generados ante un estímulo antigénico frente a un virus de la gripe pueden perdurar más de 60 años en el mismo individuo, incluso a los títulos considerados como protectores ($\geq 1/40$).

La detección de Acs pre-vacunales protectores frente a estos dos virus después de un periodo de tiempo tan amplio tiene relevancia. Esta presencia de Acs demuestra que la protección frente a los virus de la gripe persiste mucho tiempo, y por tanto las infecciones pasadas protegen a gran parte de la población durante toda su vida, evitando la re-emergencia de virus de la gripe antiguos no circulantes. En este sentido cabe recordar que la re-emergencia del subtipo A/H1N1 en el año 1977 (cepa A/USSR/90/77) se ha hipotetizado que fue fruto de un accidente de laboratorio en la que se diseminó una cepa de gripe del subtipo A/H1N1 antigénicamente similar a la cepa A/FM/1/47 (96,97), por lo que la población no está exenta de volver a estar en contacto con cepas ya extintas o similares a estas y por tanto podría estar protegida en un gran porcentaje frente a ellas, ejerciendo un efecto de inmunidad de grupo que podría proteger al resto de la población (242,243).



Otra posible causa que explica la presencia de Acs pre-vacunales a títulos protectores frente a ambas cepas de gripe A/H1N1 antiguas, es que los Acs circulantes observados sean fruto de reacciones heterotípicas como resultado de vacunaciones en los años anteriores al reclutamiento, o por infecciones naturales por virus de la gripe emparentados con los A/H1N1 antiguos que se han analizado en este trabajo. La primo-infección por cepas de gripe muy antiguas como las descritas en este trabajo puede haber provocado que ante la infección o vacunación con una cepa de gripe A/H1N1 más actual, el sistema inmune de estos individuos haya generado una respuesta cruzada con Acs capaces de reconocer los antígenos de virus más antiguos. En este sentido, es importante recordar que la población reclutada para este estudio tiene una edad mayor a 65 años. Por tanto, todos estos individuos nacieron antes del año 1946, por lo que todos han sido susceptibles de haber estado en contacto o haber sido infectados por alguna de estas cepas de gripe en la infancia, o en las edades más tempranas de su vida. Sin embargo, ya que no se conoce el historial de vacunación de este grupo poblacional ni las infecciones por gripe sufridas durante su vida, no es posible saber si la presencia de estos Acs es debida a fenómenos de tipo *booster* por vacunaciones previas con vacunas trivalentes anteriores o infecciones anteriores al reclutamiento, o si por el contrario estos Acs derivan directamente de la exposición natural a las cepas A/H1N1 antiguas aquí mencionadas y los Acs observados en este trabajo han perdurado en estos individuos desde hace más de 60 años.

Es probable que los individuos de este grupo poblacional se vacunen en cada campaña vacunal ya que pertenecen a un grupo de riesgo (182), por lo que el número de exposiciones a virus de la gripe ha sido seguramente muy elevado en la mayoría de estas personas. En un caso o en otro, es de nuevo evidente la importancia de las primo-infecciones con virus de la gripe, lo que refuerza la hipótesis del Pecado Original Antigénico (187,249–251,253), y explica la importancia de la presencia de Acs en los individuos como motor de la evolución y de la deriva antigénica de los virus de la gripe.

No se han encontrado trabajos científicos que estudien la presencia de Acs pre-vacunales en sueros humanos frente a la cepa A/Weiss/43, por lo que resulta imposible realizar una valoración comparativa sobre los resultados de esta tesis. Sin embargo, pese a tan limitada información, en el caso de la cepa A/FM/1/47 el propio NIC de Valladolid posee un artículo científico publicado en la década de 1970 que evalúa la presencia de Acs en sueros de individuos de diversos grupos etarios frente a varios virus de gripe del subtipo A/H1N1, como A/FM/1/47 y A/USSR/90/77 (266). Los datos de este trabajo, comparados con los de la presente tesis, pueden ofrecer una idea de cómo disminuye el título de Acs desde que la

población deja de estar en contacto con un determinado virus de la gripe. En este trabajo del año 1978, Ortiz de Lejarazu y colaboradores observaron la presencia de Acs pre-vacunales protectores en una serie de 157 individuos de edades comprendidas entre los 0 años hasta más de 50 años. Dichos autores mostraron que el mayor porcentaje de Acs protectores se observó en los grupos etarios de 30-39 años, 40-46 años y más de 50 años, donde observaron estos Acs en el 72,7%, 33,3% y 29,7% de los individuos respectivamente, lo que mostró que el 45% de los individuos mayores de 30 años poseían Acs protectores frente a A/FM/1/47. Todos los individuos de estos grupos etarios nacieron antes del año 1948, y por tanto los resultados de este trabajo pueden ser comparados con los de la presente tesis ya que todos los individuos reclutados en el presente trabajo nacieron también antes del año 1948. Al comparar el trabajo de Ortiz de Lejarazu y colaboradores (266) con la presente tesis, se observó que el porcentaje de individuos con títulos protectores de Acs frente a la cepa A/FM/1/47 paso de ser del 45% en el año 1978 (266) al 20% durante los años 2006 al 2011 (datos del presente trabajo), lo que supone un descenso del 25% en el porcentaje de individuos con títulos protectores de Acs en un periodo de 30 años.

El porcentaje de individuos con títulos protectores pre-vacunales frente a la cepa A/Weiss/43 fue mayor en todas las cohortes en comparación con la cepa A/FM/1/47. Se observó que el porcentaje de Acs protectores aumento y disminuyó en cada cohorte de forma similar frente a ambas cepas, observándose el porcentaje de individuos con títulos protectores pre-vacunales más bajos frente a ambos virus en la cohorte de la temporada 2008-09, que fue la cohorte que mostró una media de edad significativamente más elevada que el resto. En esta tesis la presencia de Acs protectores fue más elevada en individuos que nacieron en el entorno de la década de 1940, y que pudieron ser primo-infectados por cepas muy similares a las A/H1N1 antiguas utilizadas en el presente trabajo. Por otro lado, los individuos que nacieron antes de esa década, como por ejemplo los de la cohorte 2008-09, mostraron un porcentaje menor de estos Acs protectores, debido fundamentalmente a que fueron primo-infectados por otras cepas de gripe A/H1N1 anteriores y su respuesta frente a cepas posteriores puede no ser tan elevada. Esto también se corroboró en el trabajo de R. Ortiz de Lejarazu y colaboradores frente a la cepa A/FM/1/47 (266), ya que el mayor porcentaje de individuos con Acs pre-vacunales protectores se observó en las personas nacidas justo entre los años 1940 y 1950. Esto profundiza en la importancia de las primeras exposiciones a la gripe en un individuo, ya que estas parecen estar patentes en la memoria inmunológica durante toda la vida de una persona.



El hecho de que la presencia de Acs protectores haya sido mayor frente a la cepa A/Weiss/43 en todas las cohortes analizadas puede ser debido a las condiciones en las que la cepa A/FM/1/47 emergió en el año 1947. La aparición de este virus aconteció como una rápida diseminación en dicho año de una nueva cepa del subtipo A/H1N1, que se postula que emergió debido a un *drift* antigénico intrasubtipo más intenso que el de años anteriores (91). Sin embargo, según otras fuentes este virus apareció por la re-emergencia de una cepa del subtipo A/H1N1 que se habría desligado como un linaje antigénicamente distinto al principio de la década de 1940 pero que no llegó a producir epidemias (92). En cualquiera de los dos casos, según algún trabajo científico en el campo de la serología con sueros obtenidos en los últimos años de la década de 1940 se observó una gran ausencia de Acs protectores frente a la cepa A/FM/1/47, lo que también pudo favorecer la rápida diseminación de esta cepa (267). La aparición súbita de una nueva cepa de este tipo pudo provocar un brote con el subsiguiente aumento de casos graves (268).

Aunque existe diferencia antigénica entre las cepas A/Weiss/43 y A/FM/1/47 esta es pequeña, ya que los datos filogenéticos aportados en esta tesis muestran diferencias menores al 5% en la secuencia de la HA. Siguiendo la idea descrita anteriormente sobre la aparición de la cepa A/FM/1/47 por Nakajima S. y colaboradores (92), en la que estos autores sugieren que A/FM/1/47 surgió de cepas del subtipo A/H1N1 del principio de los años 1940 debido a una deriva genética más acuciada de los mismos, esta distancia genética parece que fue suficiente para que la cepa A/FM/1/47 pudiera provocar un evento epidémico que algunos autores denominaron como la pseudo-pandemia de 1947 (78). Como se ha expuesto anteriormente, la diferencia genética entre estas dos cepas es muy baja, sin embargo la dispersión de la cepa A/FM/1/47 fue mucho más elevada que en una epidemia normal (78).

En referencia a la aparición de esta nueva cepa A/FM/1/47, ED. Kilbourne y colaboradores (91) sugirieron que “es posible (y también probable) que en la población que tenía experiencia previa con virus del subtipo A/H1N1, no importa cuán diferentes sean las proteínas HA y NA entre unos virus y otros, en el año 1947 existió un grado de inmunización suficientemente elevado en la población como para provocar que la epidemia generada por la cepa A/FM/1/47 fuera moderada, pero insuficiente como para generar una buena respuesta heterovariante de la población hacia esa cepa tras la infección”. Este postulado se puede traducir tal que la inmunidad de la población en el año 1947 frente a A/FM/1/47 fue suficiente como para impedir que este virus produjera una pandemia, pero insuficiente como para que circulara de una forma epidémica.

Siguiendo el mencionado postulado (91), es probable que la pequeña distancia genética entre los virus de principios de los años 1940 y la cepa A/FM/1/47 haya impedido que se genere una respuesta humoral con Acs lo suficientemente diferentes como para reconocer específicamente a A/FM/1/47 en los individuos infectados durante la década de 1940. Esto parece haber permitido la diseminación pseudo-pandémica de esta cepa y que también exista un porcentaje menor de individuos con títulos protectores de Acs en las temporadas analizadas con respecto a cepas A/H1N1 anteriores como A/Weiss/43.

Las infecciones repetidas por variantes menores de un mismo subtipo de gripe produce una disminución de la respuesta humoral frente a nuevas cepas filogenéticamente relacionadas (269). Esto parece explicar el menor porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores frente a la cepa A/FM/1/47 en comparación con la cepa A/Weiss/43. Por otra parte, es probable que el fallo de inmunización que ocurrió por este mismo motivo tras la vacunación administrada en 1947 haya tenido también cierta representación en este menor porcentaje de Acs frente al subtipo A/FM/1/47 (91). Sin embargo, ya que la vacunación en la época de la Segunda Guerra Mundial se administró fundamentalmente a soldados o personal del ejército (91), este evento no parece ser tan relevante en el menor porcentaje de Acs pre-vacunales frente a A/FM/1/47.

En conclusión, entre dos y cuatro de cada diez individuos ≥ 65 años poseen títulos de Acs pre-vacunales protectores frente a cepas antiguas de gripe del subtipo A/H1N1. Esta proporción de individuos fue más elevada frente a A/Weiss/43 que frente a A/FM/1/47, en relación con la distancia genética entre ambas cepas de gripe

Respuesta heterotípica frente a virus de la gripe A/H1N1 antiguos tras la vacunación trivalente anual de gripe en la población ≥ 65 años

Los datos de este trabajo muestran como la vacunación frente a la gripe con vacuna trivalente induce una seroconversión heterotípica leve pero significativa frente a cepas gripe A/H1N1 antiguas, siendo la tasa de seroconversión global más elevada frente a la cepa A/Weiss/43 (16,1%) que frente a la cepa A/FM/1/47 (13,2%). El análisis por cohortes mostró que la seroconversión frente a la cepa A/Weiss/43 fue significativa en las tres primeras cohortes del estudio con porcentajes de seroconversión similares entre sí (15-25%), mientras que frente a la cepa A/FM/1/47 la seroconversión solo fue significativa en la cohorte de la

temporada 2010-11, que fue la única cohorte vacunada frente al subtipo A/H1N1pdm09 en este estudio, observándose seroconversión en el 30% de los individuos.

La población mayor de 65 años de este estudio no fue vacunada con las cepas de gripe A/H1N1 antiguas utilizadas en este estudio. Por tanto, la seroconversión heterotípica observada debe ser fruto de un efecto tipo *booster* debido a las cepas vacunales de gripe A/H1N1 anteriores a la aparición del nuevo subtipo pandémico del año 2009, las cuales están antigénicamente relacionadas con las cepas A/H1N1 antiguas. Pese a que la seroconversión fue significativa en muchas de las cohortes analizadas, el porcentaje de individuos que seroconvirtieron fue bajo o moderado en función de cada cepa, por lo que se puede decir que la protección heterotípica inducida por cepas A/H1N1 más actuales es limitada frente a las cepas A/H1N1 más antiguas. En el caso de la cepa A/Weiss/43 en total seroconvirtieron de forma global 28 individuos de un total de 174, mientras que frente a la cepa A/FM/1/47 seroconvirtieron un total 23 individuos, habiéndose observado en este caso la mayoría de ellos en la cohorte de la temporada 2010-11.

Por otra parte, es relevante y no se encuentra explicación que en las cohortes vacunadas frente al subtipo A/H1N1 la seroconversión heterotípica solo fue significativa frente a la cepa A/Weiss/43, mientras que en la cohorte de la temporada 2010-11 que fue la primera vacunada frente al subtipo A/H1N1pdm09, la seroconversión solo fue significativa frente a la cepa A/FM/1/47. El árbol filogenético del gen de la HA creado en este trabajo mostró que la distancia genética entre las cepas del subtipo A/H1N1 circulantes en la década de 1940 es menor al 6% entre ellas, y que ambas están estrechamente emparentadas con las cepas A/H1N1 circulantes durante la década de los años 2000, ya que mostraron diferencias menores al 12%. Sin embargo, la distancia genética de las cepas A/H1N1 de los años 1940 con respecto al subtipo A/H1N1pdm09 es más elevada ya que se sitúa en torno al 22-25%, siendo del 23,7% en el caso concreto de la cepa A/FM/1/47. Debido a esto no parece razonable que la vacunación con el subtipo pandémico en la cohorte del año 2010-11 haya inducido una mayor seroconversión heterotípica frente a la cepa A/FM/1/47, aun valorando como factor la deriva antigénica sufrida por la cepa A/FM/1/47 con respecto al resto de cepas de los años 1940 (270).

Algunos autores han sugerido mediante modelos murinos que los animales previamente expuestos a cepas del subtipo A/H1N1 que circularon antes de 1950 fueron capaces de generar Acs con la habilidad de neutralizar el subtipo A/H1N1pdm09 (271), lo que

también podría ser otro de los factores relacionados con la menor incidencia del subtipo pandémico en los individuos ancianos durante la pandemia del año 2009 (210,212,213,271). Sin embargo, este trabajo (271) no sugiere que este efecto pueda ser específico para la cepa A/FM/1/47. Por otro lado, en algunos trabajos científicos se han observado respuestas heterotípicas entre la cepa A/FM/1/47 y cepas del subtipo A/H1N1 que aparecieron posteriormente, como la cepa A/USSR/90/1977 (272), por lo que estos autores se inclinan a pensar que esta cepa puede ser una re-emergencia del virus de 1947. Existen sin embargo otros trabajos científicos en los que se utilizaron vacunas frente a la cepa A/USSR/90/77 que no mostraron inducción de una respuesta de Acs frente a la cepa A/FM/1/47 (273). Debido a esto, con los datos observados en este trabajo no se ha podido encontrar ningún razonamiento capaz de ofrecer una explicación plausible sobre la peculiaridad descrita, por lo que se decidió que fuera objeto de estudio para futuras investigaciones.

Por otra parte, si la vacunación frente al subtipo A/H1N1pdm09 consiguió inducir una seroconversión heterotípica frente a la cepa A/FM/1/4 en el 30% de la población mayor de 65, sería interesante comprobar si la infección natural por el subtipo pandémico A/H1N1pdm09 produce una respuesta heteróloga mucho mayor frente a la cepa A/FM/1/47. Eso demostraría que gente que tiene mucha edad y que ha sido infectada por la cepa A/FM/1/47 en la década de 1940 y que ahora genera una respuesta elevada cuando se infecta frente al subtipo A/H1N1pdm09, pueden evitar que vuelvan a re-emergir virus similares a los extintos A/H1N1.

En conclusión, la vacunación con vacuna trivalente anual en población que ha estado potencialmente expuesta a linajes A/H1N1 de la Gripe Española de 1918, indujo una seroconversión leve pero significativa frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas. Esta respuesta heterotípica fue mayor frente a A/Weiss/43 en las cohortes vacunadas con el subtipo A/H1N1 anterior a 2009, y mayor frente a A/FM/1/47 en la cohorte vacunada con el virus pandémico del 2009, aspecto que requiere mayor trabajo de investigación.

Eficacia de la respuesta homóloga y heteróloga a la vacuna trivalente anual frente a los virus de gripe A y B estacionales

Los estudios de evaluación de la eficacia de las vacunas que actualmente se realizan se centran fundamentalmente en dos aspectos, la eficacia frente a virus de gripe A y B estacionales, como los anteriormente comentados, cuyo objetivo es valorar el funcionamiento



de la vacuna trivalente estacional; y por otro lado la eficacia de las vacunas frente a subtipos de gripe aviar, cuyo objetivo es la monitorización de la respuesta inmune en la población como preparación frente a un evento pandémico (274,275). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, el peligro de re-emergencia de subtipos de gripe ya extintos como el anteriormente comentado A/H1N1 o incluso el A/H2N2, es real, y el descenso continuado de la protección de la población debido a la ausencia de circulación de estos virus puede poner en riesgo a la población humana. En este sentido, ya se ha documentado anteriormente en esta tesis que las pandemias por virus de la gripe A que han acaecido durante el pasado siglo XX han atacado a población que en su mayoría no habían tenido contacto con estos subtipos de gripe u otros similares. La aparición de un nuevo virus capaz de generar una pandemia no es debido solo la acumulación de mutaciones que generen un subtipo diferente, sino también la ausencia de Acs protectores en grandes grupos de población expuesta frente a este nuevo virus (76). La lectura que se puede sacar de esta idea es que la exposición recurrente por la vacunación puede permitir que la población esté siempre preparada frente a la aparición de un nuevo subtipo, sobre todo si esta vacuna induce una respuesta heterotípica frente a muchos subtipos y linajes de gripe A y B, lo que sería el objetivo de la vacuna universal (126–128).

La realización de estudios de eficacia vacunal frente a subtipos de gripe ya extintos no es muy común. Sin embargo puede ofrecer una información extremadamente valiosa sobre la capacidad de una vacuna en preparar a una población frente a la aparición de un determinado virus de la gripe. El presente trabajo evaluó la eficacia serológica de la vacuna frente a dos subtipos de gripe A/H1N1 antiguos, que si bien están extintos, la ausencia de Acs en la población podría no evitar la expansión de estos virus si ocurriera un evento como el documentado en 1977 (96,97).

Como se ha comentado anteriormente en el epígrafe de la evaluación de la eficacia vacunal frente a los virus de la gripe A y B estacionales, pese a que el documento de la EMA (159) indica que la valoración de dicha la eficacia vacunal ha de realizarse atendiendo al cumplimiento de uno solo de los criterios EMA, en el presente trabajo y en otros artículos científicos se ha comentado la necesidad de evaluar de forma conjunta los valores obtenidos de los tres criterios para poder extraer una conclusión razonable acerca de la eficacia vacunal (105). Siguiendo esta premisa, de forma global frente a la cepa A/Weiss/43 tras la vacunación con vacuna trivalente anual se cumplieron dos de los tres criterios EMA (tasa de seroprotección y razón de incremento), mientras que frente a la cepa A/FM/1/47 no se cumplió ninguno de ellos.

Pese a que frente a la cepa A/Weiss/43 la seroconversión heterotípica observada fue baja, la razón de incremento supero el *cut-off* EMA, y la presencia de un título elevado de Acs pre-vacunales permitió que frente a esta cepa se obtuviera una tasa de seroprotección del 63,2% tras la vacunación. Si bien la vacuna no parece inducir de forma global un gran efecto protector en esta población, sí que se obtuvo una tasa de seroprotección bastante elevada, por lo que la memoria inmunológica de la población mayor de 65 años frente a esta cepa (Acs pre-vacunales protectores) junto con la leve seroconversión producida por la vacuna trivalente anual generaron una protección eficaz frente a A/Weiss/43. No es el caso de la cepa A/FM/1/47 frente a la que parece que la vacuna trivalente anual no es serológicamente eficaz de forma global en la población.

Los datos de eficacia vacunal analizados en cada cohorte mostraron que frente a la cepa A/Weiss/43 la tasa de seroconversión no fue superior en ninguno de los casos al 30%, por lo que en ninguna cohorte se cumplieron los tres criterios EMA. Sin embargo, si se cumplió el criterio de la razón de incremento en todas las cohortes y la tasa de seroprotección en las cohortes de las temporadas 2006-07 y 2009-10. Al igual que el análisis global, la vacuna por sí sola no parece inducir una respuesta heteróloga suficientemente elevada como para considerar que la vacuna trivalente anual ha sido eficaz frente a esta cepa. Sin embargo, si esta respuesta se suma a la moderada presencia de Acs pre-vacunales existentes en dichas cohortes, si se puede decir que la vacuna indujo una respuesta heteróloga eficaz al menos en las temporadas 2006-07 y 2009-10. Es un dato muy relevante que en la cohorte de la temporada 2006-07 la tasa de seroprotección fue del 84,4% tras la administración de la vacuna, por lo que 8 de cada 10 personas de este grupo están protegidas frente a la cepa A/Weiss/43 más de 60 años después de su circulación epidémica.

Frente a la cepa A/FM/1/47 la vacuna trivalente anual no fue eficaz en ninguna de las tres primeras temporadas analizadas. La razón de incremento y la tasa de seroconversión, sin embargo, sí que fueron superiores al *cut-off* EMA en la cohorte que fue vacunada frente al subtipo pandémico A/H1N1pdm09 (2010-11), aunque la tasa de seroprotección no fue superior al 44%. Pese a no cumplirse los tres criterios en esta cohorte, la vacuna trivalente anual sí que indujo una respuesta heterotípica eficaz aunque limitada en la temporada 2010-11 frente a la cepa A/FM/1/47. La ausencia de Acs pre-vacunales protectores en gran parte de los individuos de esta cohorte no permitió alcanzar un buen nivel de seroprotección de grupo. Estos datos complementan la anteriormente mencionada reacción cruzada entre la cepa A/FM/1/47 y el subtipo pandémico A/H1N1pdm09, ya que lo esperable tras la vacunación

hubiera sido una reacción humoral heterotípica similar a la obtenida frente a la cepa A/Weiss/43 debido a la cercanía filogenética entre las dos cepas de la década de 1940. Ya que estos son los resultados obtenidos en la primera cohorte de ancianos vacunados frente al nuevo subtipo pandémico, sería muy interesante comprobar el efecto que provocan las vacunaciones sucesivas en esta y otras poblaciones en la respuesta heterotípica frente a la cepa A/FM/1/47, lo que será objeto de próximos trabajos científicos.

Con los datos de este trabajo se ha observado que la vacunación por sí misma no es eficaz en ninguna de las cohortes analizadas frente a las cepas A/H1N1 antiguas analizadas. Sin embargo estas vacunas sí que provocan que la población mayor de 65 años obtenga niveles de seroprotección moderados, por lo que la vacunación con vacuna trivalente anual estaría indicada para la protección frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas en la población anciana en el caso de la re-aparición de alguna de ellas, o también como método para evitar que reaparezcan.

En conclusión, la vacuna trivalente anual administrada a la población mayor de 65 años no indujo una respuesta heteróloga eficaz frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas. Sin embargo, en algunas de las temporadas estudiadas, la presencia de individuos con Acs previos protectores frente a aquellas cepas permitió que tras la vacunación se alcanzaran tasas de seroprotección por encima de los valores de corte de la EMA.

Análisis de los Acs pre-vacunales y del efecto de la vacunación frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas en función de la edad y el sexo en la población ≥ 65 años

Como se ha comentado anteriormente, la edad es un factor muy importante en la inmunidad frente a los virus de la gripe. En este aspecto no solo tienen importancia los fenómenos de inmunosenescencia de la población anciana (134–136,183), sino también como se ha visto en este capítulo, la memoria inmunológica frente a las cepas de gripe con las que se ha tenido contacto en la vida de un individuo (264). En el análisis de las diferencias en la presencia de Acs pre-vacunales y en la respuesta humoral heteróloga frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas tras la vacunación con vacuna trivalente anual, cobra especial importancia la Doctrina del Pecado Original Antigénico (187,249–251,253), ya que en la población estudiada existen individuos que cuando fueron reclutados tenían entre 65 y más de 90 años. Los

individuos más mayores no solo han estado en contacto muchas más veces frente a virus de la gripe, sino que además fueron primo-infectados por cepas A/H1N1 muy diferentes a las de los individuos más cercanos a 65 años. Como en el caso del estudio de los virus de la gripe A y B estacionales anteriormente analizados, se evaluaron las diferencias entre la media geométrica del título de Acs pre-vacunales y también de la razón de incremento entre los títulos pre y post-vacunales en los mismos grupos etarios establecidos anteriormente.

Las diferencias en la media geométrica de los títulos pre-vacunales fueron significativas entre los individuos mayores de 85 años y aquellos de menor edad frente a la cepa A/Weiss/43, siendo esta media geométrica mucho mayor en los individuos más jóvenes. Estos resultados indican, por una parte, que la senescencia del sistema inmune es mucho más acuciada en los individuos más ancianos, provocando que el título de Acs pre-vacunales frente a esta cepa caiga dramáticamente en los mayores de 85 años. La inmunosenescencia ha sido ya ampliamente comentada en este trabajo, y además se encuentra muy documentada también en otros trabajos científicos que demuestran una caída en el título de Acs a medida que los individuos aumentan su edad (134–136,183). Por otra parte, este alto título de Acs pre-vacunales en los individuos más jóvenes parece también estar influenciado por que la cepa A/Weiss/43 fue una de las que primo-infectó a estos individuos, mientras que los más ancianos estuvieron primero en contacto con cepas mucho más antiguas y cercanas filogenéticamente a la Gripe Española de 1918, retornando una vez más al concepto de Pecado Original Antigénico.

Ocurre de forma similar frente a la cepa A/FM/1/47, frente a la que también se observó una media geométrica de los títulos de Acs pre-vacunales significativamente mayor en los individuos más jóvenes. A diferencia de la cepa A/Weiss/43, frente a A/FM/1/47 también se observaron diferencias entre el grupo más joven con respecto a los individuos de edades comprendidas entre los 75 y 84 años, siendo el título de Acs pre-vacunales más elevado entre los individuos que tiene entre 65 y 74 años. Esto puede ser debido a que la cepa A/FM/1/47 apareció cinco años más tarde que la cepa A/Weiss/43, y por tanto los individuos que se primo-infectaron por esta cepa son aún más jóvenes que en el anterior caso. Por otra parte, el *drift* antigénico de la cepa A/FM/1/47 fue mayor al esperado entre dos virus de epidemias casi consecutivas (91,92), por lo que la distancia genética de A/FM/1/47 con las cepas del subtipo A/H1N1 de la década de 1930 que primo-infectaron a los individuos de entre 75 y 84 años es ligeramente mayor, como ya se ha demostrado mediante la construcción en este trabajo de un árbol filogenético con el gen de la HA. Esto parece haber provocado que A/FM/1/47 se parezca menos a las cepas que primo-infectaron a los individuos de entre 75 y 84 años que la cepa

A/Weiss/43 a estas. Al igual que en anteriores apartados, los datos de esta tesis parecen corroborar que el entorno de los 85 años supone una barrera en el sistema inmune del individuo a partir de la cual la inmunosenescencia sufre un acusado aumento, con la consiguiente peor respuesta por parte de estos individuos. Esto indica que se debería primar la prevención de los individuos mayores de 85 ya que parecen ser los más vulnerables ante las infecciones por los virus de la gripe.

Por su parte, la vacuna trivalente anual no parece haber inducido una respuesta heterotípica diferente entre los diferentes grupos etarios del estudio frente a la cepa A/Weiss/43, ya que la razón de incremento no fue significativamente diferente entre ninguno de los grupos etarios analizados. Sin embargo, en el caso de la cepa A/FM/1/47 la razón de incremento fue significativamente diferente entre todos los grupos de edad, siendo más elevada en el caso de los individuos más jóvenes. Detrás de estas diferencias se encuentra el mismo efecto que el descrito para A/FM/1/47 en las diferencias de la media geométrica de los títulos de Acs pre-vacunales. Es reseñable que pese a que la inmunización heterotípica de la vacuna trivalente anual frente a la cepa A/FM/1/47 fue bastante limitada en general (aunque especialmente interesante cuando se vacunó frente al subtipo pandémico), sí que se demuestran diferencias en función de la edad. Esto remarca la importancia de las primoinfecciones en los individuos, ya que a la vista de estos resultados la primera exposición a un virus de la gripe parece determinar que la respuesta inmune sea significativamente mejor frente a virus muy concretos, incluso aunque estén muy cercanos genéticamente con otros del mismo subtipo.

El sexo, al igual que en el caso de los virus de gripe A y B estacionales, no parece ser relevante en la respuesta inmune frente a cepas A/H1N1 antiguas en los individuos mayores de 65 años, pese a la existencia de publicaciones científicas que si demuestran diferencias en este aspecto (255,256).

En conclusión, los individuos ≥ 85 años poseen MGTs de Acs pre-vacunales menores que los más jóvenes, y muestran una peor respuesta heterotípica frente a virus de gripe A/H1N1 antiguos tras la vacunación anual, efecto muy evidente frente al virus A/FM/1/47. La edad ≥ 85 años es determinante en la presencia de Acs pre-vacunales y en la respuesta humoral a la vacunación de gripe anual.

Estudio de la respuesta humoral heterotípica frente a cepas de gripe A/H1N1 antiguas en función del tipo de vacuna administrada

Pese al limitado efecto inmunizante heterotípico que la vacuna trivalente anual provocó frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas, los datos de este trabajo mostraron un efecto significativamente mayor de las vacunas de tipo fraccionado con respecto a las adyuvadas frente a la cepa A/FM/1/47, mientras que no se encontraron diferencias entre ambos tipos de vacunas frente a la cepa A/Weiss/43. Dichas diferencias fueron encontradas tanto en el análisis de la seroconversión como en el caso de la razón de incremento.

Las vacunas de tipo adyuvado ya han sido comentadas en este trabajo como un buen medio para la mejora de la respuesta inmune en individuos ancianos, debido fundamentalmente al modo de presentación de los antígenos hacia el sistema inmune asociado a este tipo de vacunas (226,227,231,261). Sin embargo, este efecto no solo no parece observarse en esta población frente a la cepa A/FM/1/47, sino que se observó el efecto contrario, no pudiéndose conocer el mecanismo por el cual las vacunas fraccionadas hicieron más efecto frente a esta cepa en esta población.

Es también importante reseñar la ausencia de diferencias entre ambos tipos de vacunas frente a la cepa A/Weiss/43, ya que junto con el subtipo A/H1N1pdm09 y los dos linajes de gripe B son ya cuatro virus diferentes frente a los que la vacuna adyuvada no generó una mejor respuesta inmune con respecto a las antiguas vacunas fraccionadas. Debido a esto, es imprescindible la exploración de otros métodos que mejoren la inmunogenicidad de las vacunas en la población mayor de 65 años, de la que cabe recordar es uno de los grupos de más riesgo ante la infección por virus de la gripe (182), como las anteriormente comentadas vacunas de tipo "High Dose", en cuya composición se encuentra una mayor cantidad del antígeno hemaglutinina para favorecer su reconocimiento por parte del sistema inmune del individuo (153,154,276).

ANÁLISIS FRENTE A SUBTIPOS DE VIRUS DE LA GRIPE AVIAR EN POBLACIÓN MAYOR DE 65 AÑOS

Los virus de la gripe de origen aviar suponen un continuo reto de la vigilancia de la gripe por parte de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y de la OMS. Las características de estos virus pueden permitir que se dispersen de forma pandémica. Esto, sumado a la elevada morbi-mortalidad asociada a las infecciones esporádicas por estos virus en humanos, con tasas de mortalidad de entre el 60% para el subtipo A/H5N1 al 20% para el subtipo A/H7N9 (277,278), supone un riesgo para la salud humana. Las aves son el reservorio natural de los virus de la gripe (278), y estos animales poseen la particularidad de que su sistema inmune no genera una respuesta adaptativa tan avanzada como la de mamíferos, lo que provoca que un ave pueda ser infectada por varios virus de la gripe o por el mismo virus varias veces al año (279–284). Esta característica permite que las aves puedan transmitir varias veces un virus de la gripe en un determinado espacio de tiempo, extendiendo estos virus a otras zonas donde exista nidificación o escala de aves debido a los fenómenos migratorios (285,286). Por otro lado, los virus de la gripe que tienen como hospedadores las aves sufren un *drift* antigénico muy lento ya que el sistema inmune ejerce una presión selectiva muy débil sobre los mismos, a diferencia del sistema inmune de los mamíferos (279–284).

Para los programas de control de estos virus, la OIE en colaboración con la OMS realiza controles preventivos en los que muchas veces millones de aves de corral son sacrificadas tras la confirmación de un brote de gripe aviar, y se realiza un seguimiento estrecho de los casos que suceden en humanos (101). Existen desde el año 2008 vacunas aprobadas por la FDA frente a virus aviáres que se administran a la población en ensayos clínicos, que pueden ser muy útiles en el caso de la dispersión global de un virus de tipo aviar (287). Sin embargo, ante una pandemia de un virus de este tipo es importante conocer aspectos sobre la inmunidad en los distintos grupos de individuos de zonas que nunca han tenido casos humanos, ya que esto puede ofrecer una idea sobre la presencia de inmunidad cruzada o heteróloga y antecedentes de vacunación o enfermedad en la población.

En el presente trabajo, se han seleccionado tres subtipos de virus de gripe aviar, A/H5N1, A/H7N3 y A/H9N2. Estos tres subtipos han sido los protagonistas durante los últimos 20 años de los mayores brotes de gripe aviar en humanos en el sureste asiático, y por tanto podría suceder que estuvieran implicados en alguna futura pandemia.

El análisis de la presencia de Acs protectores previos a la vacunación, así como los generados tras de la administración de la vacuna trivalente anual, permitió conocer el estado de inmunización de la población mayor de 65 años y la respuesta humoral heteróloga a la vacuna en este grupo poblacional frente a los virus de la gripe aviar utilizados en este trabajo.

Estudio de los Acs pre-vacunales frente a virus de gripe aviar en la población ≥ 65 años

Los datos aportados por este trabajo demostraron la existencia de Acs a títulos protectores frente a virus de gripe aviar en un porcentaje mínimo de individuos de la población mayor de 65, con valores entre el 0,6% frente a los subtipos A/H7N3 y A/H9N2 y el 1,1% frente al subtipo A/H5N1. A pesar de que el número de individuos con Acs a títulos protectores fue muy bajo, sí que se observaron Acs a títulos menores a 1/40 en un porcentaje mayor de individuos, ya que frente al subtipo A/H9N2 se encontraron 39 individuos con Acs con títulos entre 1/10 y 1/20, en 3 individuos frente al subtipo A/H5N1 y solo en un individuo frente al subtipo A/H7N3. De acuerdo con estos datos, los individuos con títulos protectores no están en suficiente número como para generar una buena inmunidad de grupo frente a estos virus de gripe aviar.

Al examinar de forma individualizada la presencia de Acs pre-vacunales frente a los diferentes virus estudiados en esta tesis, no se encontraron individuos que poseyeran Acs frente a todos los subtipos de virus de la gripe a excepción de una persona. En caso de existir este tipo de individuos se les podría denominar como grandes respondedores a los virus de la gripe. Por otra parte tampoco se encontró ningún individuo que no respondiera a todos los virus de la gripe A y B analizados. De haber existido podrían haberse asociado a alguna condición demográfica en concreto, como la edad o el sexo. El único individuo que presentó Acs pre-vacunales frente a todos los virus A y B analizados en esta tesis fue un varón de 76 años, el cual mostró títulos entre 1/20 y 1/80 frente a los tres virus aviares, títulos de 1/1280 frente a las cepas A/H1N1 antiguas y más actuales y títulos mayores a 1/10 frente al resto de virus de gripe A y B estacionales analizados.

Los datos de esta tesis demuestran que pese a que los subtipos de gripe aviar utilizados en el análisis nunca habían circulado en España ni de forma epidémica ni en brotes, la población mayor de 65 años posee títulos de Acs mínimos frente a estos virus, estando más

presentes frente a los subtipos A/H9N2 y A/H5N2, y de forma anecdótica frente al subtipo A/H7N3. A excepción del individuo de varón de 76 años anteriormente mencionado, ningún otro mostró Acs pre-vacunales protectores frente a más de un virus aviar.

El origen de estos Acs es incierto, aunque probablemente se deban a una respuesta humoral heterotípica entre los virus aviares y los subtipos de gripe A que hayan infectado a la población estudiada o los presentes en las formulaciones vacunales de las vacunas que les fueron administradas. El estudio del árbol filogenético del gen de la HA que se construyó en este trabajo muestra que la distancia genética de los subtipos de gripe A/H5N1 y A/H9N2, pertenecientes al Clado 1 (25,288–291), con respecto a los virus del subtipo A/H1N1 es elevada, observándose diferencias genéticas entre los virus A/H1N1 y A/H5N1 del 50% y entre los subtipos A/H1N1 y A/H9N2 del 65% en la secuencia de la hemaglutinina. La diferencia genética estudiada fue mayor frente al subtipo A/H9N2 a pesar de que frente a este virus se encontró un número mayor de individuos con Acs pre-vacunales. Por su parte, la distancia genética entre el subtipo A/H7N3 y los virus del subtipo A/H3N2, pertenecientes al Clado 2 (288–292), es también elevada (65%) y muy similar a la existente entre el subtipo A/H9N2 y los subtipos A/H1N1. Sin embargo el número de individuos con Acs pre-vacunales fue mucho menor frente a A/H7N3 que frente al subtipo A/H9N2, a pesar de que la distancia genética con otros subtipos de gripe A circulantes es similar. Estos datos muestran que la distancia genética parece estar relacionada con la distancia antigénica entre dos virus de gripe pero que se necesita un enfoque múltiple para realizar el estudio de las reacciones cruzadas.

En relación con esto, en la respuesta humoral heterotípica antes mencionada puede también estar involucrado el subtipo A/H2N2, frente al cual existe menor distancia genética con el subtipo A/H5N1 (38%). El subtipo A/H2N2 apareció en el año 1957, haciendo desaparecer al subtipo A/H1N1 que procede de las cepas A/H1N1 de 1918 (78). Por la media de edad de la población de este estudio, estos individuos pudieron estar en contacto con el subtipo A/H2N2 durante los 10 años que este estuvo circulando hasta su extinción en el año 1968 (78). Si bien no es el virus que probablemente primo-infectó a dicha población, su infección puede haber sido también responsable, al menos en parte, de la presencia de Acs pre-vacunales capaces de reconocer los virus aviares del Clado 1 que se han observado en este trabajo. Esta menor distancia genética entre los subtipos A/H5N1 y A/H2N2 no se ha observado entre A/H9N2 y A/H2N2, ya que entre estos dos subtipos se observó una diferencia similar a la observada entre los subtipos A/H1N1 y A/H9N2 (65%). Pese a que el análisis de la presencia de Acs pre-vacunales y post-vacunales frente al subtipo A/H2N2 en esta población

hubiera aportado una información muy valiosa, se desestimó el uso de este subtipo por razones obvias.

La aparición de brotes de gripe aviar tanto en el continente Europeo como en España en los años anteriores al reclutamiento de los individuos ≥ 65 años ha sido recurrente, fundamentalmente en granjas avícolas o en fauna aviar salvaje (293–298). A pesar de esto, los datos de este trabajo demuestran que ninguna de las tres cepas de gripe aviar analizadas ha circulado de forma clínica o subclínica entre la población mayor de 65 años en España. Este hecho que si se ha documentado en otras localizaciones diferentes como el sureste asiático, donde estos virus causan brotes ocasionales que producen casos de transmisión zoonótica en personas que trabajan con el cuidado o cría de aves de corral (299–304).

Los artículos científicos publicados sobre la existencia de Acs frente a virus de gripe aviar en individuos no vacunados de países asiáticos demuestran que estos virus circulan de forma esporádica, sobre todo en trabajadores de granjas avícolas (300,302–305). Sin embargo, no existen en la actualidad trabajos científicos que hagan evaluaciones similares sobre la presencia de Acs en población Europea, por lo que este es uno de los primeros trabajos científicos que determinan la presencia de Acs frente a virus aviares en la población que por su edad ha tenido más oportunidades de haber estado en contacto con ellos.

En resumen, el porcentaje de individuos ≥ 65 años con Acs pre-vacunales protectores frente a subtipos de gripe aviar A/H5N1, A/H7N3 y A/H9N2 es mínimo. Por consiguiente la población anciana no está protegida frente a estos subtipos de gripe aviar en razón a una inmunidad heteróloga.

Respuesta heterotípica frente a virus de la gripe aviar tras la vacunación trivalente anual de gripe en la población ≥ 65 años

Es probable que la población mayor de 65 años analizada en este trabajo haya sido vacunada frente a la gripe varias veces en su vida, y que también haya sufrido varias infecciones naturales por los distintos virus de la gripe estacionales. Por esto, es importante evaluar la posible protección que puede inducir la vacuna trivalente anual frente a subtipos de gripe aviar por si pudiera generar una respuesta heterotípica. Cabe recordar que la vacuna trivalente utilizada en las cohortes analizadas solo poseía virus de gripe A y B estacionales.

Los datos de este trabajo mostraron que globalmente tras la vacunación trivalente anual la seroconversión heterotípica fue significativa frente a los subtipos A/H5N1 y A/H9N2, siendo superior frente a A/H5N1 (14,4%) que frente a A/H9N2 (10,9%), mientras que no se observó seroconversión frente al subtipo A/H7N3. En el análisis por cohortes la seroconversión heterotípica solo fue significativa frente a A/H5N1 en dos de las cohortes analizadas. Una de las cohortes fue vacunada frente al subtipo A/H1N1 (2006-07) mientras que otra frente al subtipo A/H1N1pdm09 (2010-11). Frente al subtipo A/H9N2 la única cohorte en la que la seroconversión fue significativa fue la de la temporada 2006-07, vacunada frente al subtipo A/H1N1.

Estos resultados parecen enfocar las relaciones filogenéticas entre los subtipos de gripe aviar con los virus del grupo A/H1, ya que el subtipo A/H5N1 parece mostrar una reacción heterotípica tanto con el subtipo A/H1N1 como con el subtipo A/H1N1pdm09, mientras que el subtipo A/H9N2 parece solo mostrar relación con el subtipo A/H1N1. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre la seroconversión heterotípica producida por las vacunas de las cohortes de las temporadas 2006-07 y 2010-11 frente al subtipo A/H5N1, el porcentaje de individuos que seroconvirtieron fue mayor en la cohorte 2010-11 (27,9%) con respecto a 2006-07 (17,8%), por lo que parece que la relación del subtipo A/H5N1 es más cercana con el subtipo A/H1N1pdm09 que con el A/H1N1. Esto concuerda con lo observado en el árbol filogenético de la HA creado en este trabajo, ya que la diferencia genética entre el subtipo A/H5N1 es ligeramente menor frente al subtipo A/H1N1pdm09 (48%) que frente a las cepas del subtipo A/H1N1 utilizadas en las vacunas anuales desde la temporada 2006-07 hasta la temporada 2009-10 (51%), lo que determina que las reacciones humorales heterotípicas están directamente influenciadas por la distancia genética entre dos subtipos de virus de la gripe.

La vacuna trivalente anual indujo seroconversión heterotípica en los individuos mayores de 65 años en un porcentaje bajo aunque apreciable frente a los dos virus aviares pertenecientes al Clado 1 (A/H5N1 y A/H9N2) (288–292,306). Esta respuesta heterotípica se debe probablemente a que la estructura tridimensional de la proteína HA comparte epítomos específicos entre varios subtipos de gripe A (120,121,123,124,307), por lo que los Acs generados frente al subtipo A/H1N1 y A/H1N1pdm09 son capaces de reconocer las hemaglutininas de los subtipos A/H5N1 y A/H9N2. De hecho, existen epítomos concretos que incluso están conservados en las HA de tipo HA1, HA2, HA5 y HA6 (121,123). En el caso del subtipo A/H7N3, la vacunación anual trivalente no produjo una respuesta heterotípica

inducida por virus del mismo Clado, como el subtipo A/H3N2, ni del Clado 1 como los anteriormente mencionados. Sin embargo sí que existe algún trabajo científico que demuestra la existencia de epítomos conservados entre virus del Clado 2 que provocan reacciones inmunes cruzadas (119), aunque este hecho no ha sido demostrado en la presente tesis.

La inmunidad cruzada frente a subtipos de gripe aviar ya ha sido observada numerosas veces entre virus con un mismo subtipo de hemaglutinina (por ejemplo, del subtipo A/H5N1 hacia el subtipo A/H5N3) (308,309), así como entre distintos subtipos dentro del mismo Clado (130,131). Sin embargo y hasta donde conocemos, los datos presentados en esta tesis parecen ser el primer trabajo científico que demuestra aumento del título de Acs frente a virus aviares mediante la vacunación estacional anual en población anciana española. Atendiendo a la protección de la población, los resultados de este trabajo son muy interesantes puesto que, según algunos artículos científicos España es uno de los países Europeos con mayor riesgo relativo de diseminación de virus de gripe aviar entre las aves de granja y salvajes, en concreto del subtipo A/H5N1 (298). En este sentido, debido a la larga tradición de cuidado de especies avícolas de corral que existe en la población anciana residente en zonas rurales de España, como las gallinas ponedoras, esta práctica supone un riesgo de contacto directo con especies transmisoras de virus de gripe aviar altamente patogénicas que puedan generar transmisión antrozo-zoonótica.

Pese a que la respuesta heterotípica inducida por la vacuna es baja, los datos observados en este trabajo suponen un punto de apoyo para la indicación de que la vacunación en la población mayor de 65 años debe ser anual, teniendo en cuenta que son uno de los grupos más vulnerables de la población. La respuesta humoral heteróloga frente a distintos virus de la gripe, como la observada en esta tesis frente a varios de los virus de gripe A analizados, apoya el trabajo en el diseño de vacunas universales que puedan proteger frente a los 16 tipos de hemaglutinina y los 9 tipos de neuraminidasa (126–128,229,230).

No se ha observado la existencia de individuos que tras la vacunación hayan generado Acs frente a varios de los subtipos aviares analizados. Debido a esto, no se pudo comprobar la existencia de características demográficas que promuevan una mejor respuesta heterotípica después de la vacunación anual.

En resumen, la vacuna de gripe anual indujo una leve pero significativa seroconversión heterotípica frente a los subtipos de gripe aviar A/H5N1 y A/H9N2 del Clado 1 del gen de la hemaglutinina, y ninguna frente al subtipo A/H7N3 del Clado 2.

Eficacia de la respuesta heteróloga a la vacuna trivalente anual frente a los virus de gripe aviar

La evaluación de la eficacia vacunal puede servir para conocer la capacidad de la vacuna trivalente anual para inducir la creación de Acs heterotípicos frente a determinados subtipos de gripe en población mayor de 65 años, y más concretamente frente a los subtipos A/H5N1, A/H7N3 y A/H9N2. Cabe recordar que uno de los objetivos de valorar la eficacia de la respuesta serológica tras la vacunación frente a virus de gripe aviar es monitorizar la respuesta humoral de la población como preparación frente a un evento pandémico (274,275). Por ello, es muy interesante comprobar cuál es la eficacia serológica de la vacuna trivalente anual en inducir la producción de Acs heterotípicos en una población que se ha visto expuesta a muchas infecciones naturales y vacunaciones anuales.

Al igual que en los anteriores epígrafes en los que se evaluaba la eficacia serológica de la vacuna trivalente anual frente a virus de gripe A y B estacionales y cepas de gripe A/H1N1 antiguas, la eficacia vacunal heterotípica se ha valorado utilizando los tres criterios EMA en conjunto para una correcta interpretación del efecto de la vacuna (105). De forma global tras la vacunación no se cumplieron los tres criterios EMA frente a ninguno de los virus aviares utilizados. Únicamente se alcanzó el valor *cut-off* EMA de la razón de incremento frente a los subtipos A/H5N1 (RIC=3,9) y A/H9N2 (RIC=3,1), debido fundamentalmente a la escasa presencia de Acs pre-vacunales en los individuos anteriormente analizados. Para dichos virus, tanto la tasa de seroprotección como la tasa de seroconversión están bastante lejos de alcanzar el valor requerido para cumplir el criterio EMA de eficacia vacunal, por lo que la vacuna trivalente anual no induce una respuesta heteróloga eficaz de forma global a pesar de producir un incremento significativo del título de Acs.

El análisis por cohortes mostró que frente al subtipo A/H5N1 se cumplió únicamente la razón de incremento en todas las temporadas analizadas. Pese a que la seroconversión heterotípica no fue significativa en las cohortes de las temporadas 2008-09 y 2009-10, la razón de incremento si alcanzó el valor *cut-off* EMA, por lo que queda patente que la eficacia vacunal

no debe ser solo valorada atendiendo al cumplimiento de uno solo de los criterios EMA. En las temporadas 2006-07 y 2010-11 no se cumplió ningún criterio más aparte de la razón de incremento. Sin embargo, la tasa de seroconversión de la cohorte de la temporada 2010-11 se situó muy cerca del valor *cut-off* EMA, por lo que si bien en ninguna de las temporadas la vacuna no indujo una respuesta heterotípica eficaz, si se puede afirmar que en la temporada vacunada frente al subtipo A/H1N1pdm09 la vacuna indujo una respuesta heterotípica muy cerca de ser eficaz frente al subtipo A/H5N1.

En el caso del subtipo A/H9N2 solo se cumplió el criterio de la razón de incremento en las cohortes de las temporadas 2006-07, 2008-09 y 2009-10, siendo mucho más elevada en la temporada 2006-07 (RIC=8,5) que en el resto de temporadas. Cabe recordar que la temporada 2006-07 es la única en la que la seroconversión heterotípica fue significativa. A pesar de este valor, ninguno de los otros criterios EMA alcanzaron los valores requeridos para evidenciar que la respuesta heterotípica inducida por la vacuna trivalente anual fuese serológicamente eficaz frente al subtipo A/H9N2. A pesar de que la respuesta inducida por la vacunación anual es aceptable en términos de seroconversión heterotípica, la vacuna no fue eficaz en ninguna de las cohortes analizadas frente al subtipo A/H9N2. Aunque la presencia de ciertas cepas de gripe del subtipo A/H1N1 parece haber inducido cierta respuesta cruzada frente a A/H9N2, la distancia genética entre A/H1N1 y A/H9N2 es demasiado grande, y no permite que la vacunación frente a subtipos de gripe estacionales promueva una respuesta heterotípica aceptable. Frente al subtipo A/H7N3 no se cumplió ningún criterio EMA en ninguna de las cohortes, por lo que la vacuna trivalente anual no produjo una respuesta heterotípica eficaz frente a A/H7N3 en ninguno de los casos.

En resumen, la vacuna trivalente anual no generó ninguna respuesta heterotípica eficaz frente los virus de gripe aviar, aunque siguiendo criterios EMA, la seroconversión fue significativamente mayor frente al subtipo A/H5N1 cuando se vacunó con el subtipo A/H1N1pdm09, aspecto que es necesario revisar en un mayor número de individuos.

Análisis de los Acs pre-vacunales y del efecto de la vacunación frente a subtipos de gripe aviar en función de la edad y el sexo en la población ≥ 65 años

El análisis de la media geométrica del título de Acs pre-vacunales y de la razón de incremento en función de la edad y del sexo no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos etarios frente a ninguno de los virus aviares analizados, ni tampoco en función del sexo de los individuos. Este bajo título de Acs hemaglutinantes pre-vacunales frente a los virus aviares mostrado por los individuos mayores de 65 años de este estudio no permite conocer si esta ausencia de diferencias es real o es fruto del bajo título de Acs. Existe una falta de evidencia muy grande a este respecto en la literatura científica. Solo se ha encontrado un trabajo científico en el que se demuestra la existencia de un mayor título de Acs pre-vacunales frente a virus aviares en personas mayores de 65 años en comparación con los individuos menores de esa edad (310), pero en ningún caso sostiene que a partir de 65 años exista un mayor o menor título de Acs cuanto más anciano sea el individuo.

En otro orden de cosas, los datos de la razón de incremento que muestran la reacción heterotípica a la vacuna trivalente anual sí pudieron ser valorados en el caso de los subtipos A/H5N1 y A/H9N2. Como se ha comentado anteriormente, frente a estos subtipos no se encontraron diferencias en la razón de incremento entre los diferentes grupos etarios, por lo que la leve respuesta heteróloga tras la vacunación anual no parece verse afectada por la progresiva senescencia del sistema inmune (134–136,183). Aun así, para obtener datos más concluyentes sobre este aspecto sería necesario reclutar un mayor número de individuos.

Análisis de la respuesta humoral heterotípica frente a virus de gripe aviar en función de la vacuna utilizada

Los datos del estudio no mostraron una respuesta heterotípica diferente en función del tipo de vacuna utilizada (adyuvada o fraccionada) frente a ninguno de los virus aviares analizados en la población anciana. Es probable que, aunque la vacunación mostró una inmunización significativa en algunas de las cohortes analizadas frente a los subtipos A/H5N1 y A/H9N2, esta respuesta no fue lo suficientemente elevada como para permitir observar diferencias entre las vacunas adyuvadas y fraccionadas. Para el análisis más detallado de estas diferencias es necesaria la realización de este estudio con un número mayor de sujetos para realizar contrastes estadísticos de mayor potencia.

ESTUDIO DE LOS ACS PREVIOS A LA VACUNACIÓN Y DE LA RESPUESTA A LA VACUNA MONOVALENTE FRENTE AL SUBTIPO A/H1N1PDM09 EN EL GRUPO DE ENFERMOS AUTOINMUNES

ÁMBITO POBLACIONAL DE ESTUDIO

Las enfermedades autoinmunes son uno de los síndromes clínicos que más frecuentemente pueden generar alteraciones en la inmunocompetencia de un individuo en función de la recurrencia con la que sucedan los brotes (140). A este tipo de pacientes crónicos se les suele asociar una mayor frecuencia de sufrir infecciones recurrentes, hecho que es dependiente del tipo concreto de enfermedad autoinmune que sufran y del tipo de tratamiento con corticoides e inmunosupresores asociado (311–313). Los inmunodeprimidos e individuos con enfermedades autoinmunes son uno de los grupos poblacionales en los que la OMS recomienda la administración de la vacuna antigripal (137,182). Es por esto que es de especial interés profundizar en aspectos concretos de los procesos de inmunización frente a agentes etiológicos tales como la gripe, como por ejemplo en la vacunación frente a virus pandémicos frente a los que los individuos no han estado en contacto.

El análisis de estos pacientes se realizó comparándolos con un grupo de controles sanos. En estos dos grupos poblacionales se evaluó la respuesta humoral homóloga y heteróloga inducida por la vacuna monovalente frente al subtipo pandémico A/H1N1pdm09 (*Pandemrix*), además de valorar las diferencias en los Acs pre-vacunales con el fin de comprobar si esta condición clínica también supone un factor diferente antes de la vacunación.

El número de individuos enfermos y controles sanos incluidos en este estudio fue similar, lo que permitió realizar comparaciones estadísticas entre ambos grupos y ofreció robustez a los resultados obtenidos. La media de edad de los pacientes con enfermedades autoinmunes (52,5 años) fue significativamente superior a la edad de los controles sanos (39,8 años). Sin embargo, la media de edad de ambos grupos sitúa a ambos tipos de individuos dentro del grupo etario de 15-64 años, rango de edad que es usado comúnmente dentro de los estudios referidos a la gripe asumiéndolo como el grupo de jóvenes-adultos y adultos, por lo que se aceptó que estos dos grupos eran comparables.

La proporción de mujeres fue mayor en ambos grupos con porcentajes muy similares entre sí (83% en enfermos autoinmunes y 71% en controles sanos). Las enfermedades autoinmunes son mucho más prevalentes en mujeres que en hombres (314–316), por lo que se asumió que el muestreo tanto de los enfermos como de los controles sanos se realizó correctamente, y que las conclusiones obtenidas no sufrieron un *bias* debido a las diferencias de género. Las enfermedades autoinmunes incluidas en este estudio fueron muy variadas y el número total de cada una de ellas en el estudio fue relativamente baja, por lo que estas enfermedades no pudieron ser segregadas por tipos para la realización de test estadísticos complejos que discriminaran entre enfermedades de distinto origen.

ANÁLISIS FRENTE A SUBTIPOS Y LINAJES DE GRIPE A Y B ESTACIONALES EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Estudio de los Acs pre-vacunales frente a virus A y B estacionales en enfermos autoinmunes

El análisis de la presencia de Acs pre-vacunales en enfermos autoinmunes y controles sanos puede ofrecer mucha información acerca del nivel de inmunización que poseen ambos colectivos frente a los virus de gripe A y B estacionales. Los datos de este estudio mostraron que un porcentaje elevado de los individuos con enfermedades autoinmunes poseían Acs pre-vacunales con títulos protectores ($\geq 1/40$) frente a los linajes B/Victoria (48,9%) y B/Yamagata (40,4%) sin observarse diferencias significativas entre ambos linajes. Frente al subtipo A/H3N2 (36,2%) el porcentaje de individuos fue menor aunque sin diferencias significativas con respecto al linaje B/Yamagata. Para el subtipo A/H1N1 este porcentaje (19,1%) fue significativamente más bajo que en los virus B y el subtipo A/H3N2, mientras que frente al subtipo A/H1N1pdm09 se observó el porcentaje de individuos con Acs protectores más bajo de todos los virus analizados (4,3%).

El porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores fue diferente en la cohorte de controles sanos, ya que el virus frente al que se observó un porcentaje significativamente mayor de individuos con Acs protectores fue el linaje B/Yamagata (71,1%), mientras que el porcentaje de individuos con títulos protectores fue del 51,1% tanto para el linaje B/Victoria como en el subtipo A/H3N2. Este porcentaje fue significativamente menor frente al subtipo A/H1N1 (31,1%) que los observados para el linaje B/Victoria y el subtipo

A/H3N2. En los controles sanos no se encontró ningún individuo con títulos protectores frente al subtipo A/H1N1pdm09.

No se conoce el historial de vacunaciones de los enfermos autoinmunes ni de los controles sanos, por lo que no se puede asegurar que la presencia de estos Acs pre-vacunales sea fruto de infecciones naturales. Sin embargo, los controles sanos no pertenecen a ningún grupo de riesgo y es improbable que hayan sido vacunados frente a la gripe alguna vez, por lo que la presencia de esos Acs es probable que se deba a las infecciones naturales por los subtipos de gripe analizados. Los datos de este estudio nos ofrecen una visión bastante realista de las diferencias en la inmunidad pre-vacunal entre individuos sanos y enfermos autoinmunes, además de la circulación de los virus de la gripe en individuos jóvenes-adultos.

A la vista de los resultados de este estudio, en el año 2009 tanto en los enfermos autoinmunes como en los controles sanos el porcentaje de individuos con títulos protectores de Acs frente a los virus de gripe B fue en general más elevado que el observado frente a los virus de la gripe A, especialmente frente al subtipo A/H1N1 y el A/H1N1pdm09. Estos resultados también mostraron que el porcentaje de individuos con títulos protectores pre-vacunales fue significativamente mayor en el grupo de controles sanos que en autoinmunes frente al subtipo A/H3N2 y el linaje B/Yamagata, mientras que frente al linaje B/Victoria, A/H1N1 y A/H1N1pdm09 no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Cabe resaltar que en los enfermos autoinmunes se observó la presencia aunque mínima de individuos con títulos protectores de Acs frente al nuevo subtipo A/H1N1pdm09, mientras que no se encontró ninguno en los controles sanos. A pesar de esto, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos frente al subtipo pandémico.

La presencia de este mínimo número de individuos con Acs pre-vacunales protectores frente al subtipo A/H1N1pdm09 puede deberse a algún tipo de respuesta heterotípica entre el antiguo subtipo A/H1N1 y el nuevo subtipo pandémico por exposiciones anteriores de la población al subtipo A/H1N1. Sin embargo, la extracción de los sueros pre-vacunales en ambos grupos de población se realizó durante la segunda onda pandémica de 2009 en plena circulación pandémica del virus A/H1N1pdm09. Es posible que algunos de los individuos enfermos autoinmunes con títulos protectores frente al subtipo pandémico haya estado expuesto de forma natural al virus previamente a la vacunación, por lo que dichos Acs pre-vacunales pueden ser originarios de una infección natural durante la pandemia.

Es interesante que las diferencias entre estos dos grupos en el porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores solo se observen frente al subtipo A/H3N2 y al linaje B/Yamagata. En este sentido cabe recordar que los individuos con enfermedades autoinmunes son pacientes que sufren enfermedades crónicas que atacan principalmente al sistema inmune del individuo, impidiendo que este desarrolle una correcta respuesta inmune ante una agresión externa por un patógeno como la gripe (140,317). En la mayor parte de las enfermedades de tipo autoinmune, como el lupus, la afectación que impide este buen funcionamiento del sistema inmune no se debe solo a un factor como la presentación de antígenos, maduración de linfocitos o la liberación de Acs por parte de las células plasmáticas, sino que es un proceso multifactorial muy complejo (318,319). Esto indica que las interacciones del sistema inmune de los individuos con enfermedades autoinmunes puede ser completamente distinta frente a los distintos subtipos de virus de la gripe, por lo que los datos sobre la presencia de Acs frente a los distintos virus de la gripe A y B estacionales dependen de una interpretación compleja y probablemente multifactorial.

Por otra parte, es lógico que la presencia de individuos con Acs protectores frente a ciertos virus de la gripe sea menor en los enfermos autoinmunes, puesto que gran parte de estos individuos previamente a ser diagnosticados ya sufren cuadros de inmunodeficiencias, por lo que su capacidad de reconocer a los antígenos y de generar una respuesta humoral correcta está naturalmente debilitada (139,317,320–322). Además, como se ha comentado anteriormente, los pacientes con enfermedades autoinmunes están comúnmente tratados con corticoides y drogas inmunosupresoras para controlar los síntomas de su enfermedad (311–313). Debido a esto, el propio tratamiento influye directamente en la capacidad de estos individuos en el desarrollo de la respuesta humoral ante las infecciones naturales por virus de la gripe o ante las vacunaciones. Esto se traduce en este trabajo en un menor título de Acs pre-vacunales y en un menor porcentaje de individuos con títulos protectores frente a ciertos subtipos y linajes de virus de la gripe.

La comparación de la media geométrica de los títulos pre-vacunales entre los enfermos autoinmunes, controles sanos y las diferentes cohortes de individuos mayores de 65 años previamente analizadas también mostraron diferencias interesantes que merecen ser comentadas. En primer lugar no se encontraron diferencias significativas en la MGTs pre-vacunales frente al subtipo A/H1N1pdm09 entre ninguna de las cohortes de ancianos, enfermos autoinmunes y controles sanos, ni si quiera en las cohortes de ancianos reclutadas durante la pandemia y en la temporada gripal posterior. Esto contrasta con los datos

observados por algunos autores que demuestran la existencia de Acs pre-vacunales protectores en mayor título en ancianos que en individuos jóvenes en Reino Unido, Grecia, Finlandia y Estados Unidos (210,212,323–325), y que sugieren que esta mayor presencia de Acs frente al subtipo A/H1N1pdm09 fue la responsable de la menor afectación de los individuos ancianos durante la pandemia de 2009. Sin embargo, existen otros trabajos científicos que no observan esta particularidad en países como Suecia (326). Con los datos de este trabajo parece que tanto la población sana, enfermos autoinmunes como la población anciana se encontraban muy poco protegidos frente al nuevo subtipo A/H1N1pdm09 antes de su aparición y durante la pandemia.

Por otro lado, sí que se encontraron diferencias en la media geométrica de los títulos pre-vacunales frente a los subtipos A/H1N1 y A/H3N2 entre los enfermos autoinmunes y las cohortes de ancianos reclutadas en las temporadas 2006-07 y 2010-11, siendo esta media geométrica mucho más elevada en ambas cohortes de ancianos. Se observaron también diferencias significativas en la media geométrica de los títulos pre-vacunales frente al linaje B/Yamagata entre los controles sanos y todas las cohortes de ancianos y los enfermos autoinmunes. Para los controles sanos la media geométrica de los títulos pre-vacunales fue mucho más elevada frente a B/Yamagata. Para el linaje B/Victoria la MGTs pre-vacunales fue significativamente inferior en la cohorte de ancianos de la temporada 2009-10 con respecto a los individuos sanos y la cohorte de ancianos de la temporada 2008-09.

De los datos aquí obtenidos se pueden extraer múltiples lecturas. En primer lugar, en la población anciana no parece haberse observado un mayor nivel de Acs pre-vacunales frente al subtipo A/H1N1pdm09 en comparación con grupos más jóvenes. En segundo lugar, los enfermos autoinmunes presentaron un peor título de Acs pre-vacunales frente a los subtipos A/H1N1 y A/H3N2 en comparación con los individuos mayores de 65 años de algunas de las cohortes analizadas. De esto se deduce que la inmunidad basal de los enfermos autoinmunes es menor frente a estos dos subtipos de gripe A en comparación algunos grupos de ancianos, probablemente debido a las enfermedades inmunosupresoras que padecen. También es relevante que frente a A/H1N1 y A/H3N2 no existan diferencias entre jóvenes sanos y ancianos, pese a la senescencia del sistema inmune de los ≥ 65 años. En tercer lugar, la presencia de un mayor título de Acs pre-vacunales en individuos sanos frente al linaje B/Yamagata en comparación con el resto de cohortes de ancianos y enfermos autoinmunes, puede ser debido a que muchos de los individuos sanos fueron primo-infectados por el linaje B/Yamagata que circuló de forma mayoritaria durante la década de 1990 (248). Por un lado, la

primo-infección de este linaje en los individuos sanos puede haber generado un mayor título de Acs en comparación con los ancianos, y por otra parte, la inmunosupresión de los enfermos autoinmunes parece que no ha permitido que este grupo alcance títulos similares a los individuos sanos pese a tener una edad similar.

En resumen, el porcentaje de individuos con Acs protectores fue más elevado en controles que en enfermos autoinmunes frente a A/H3N2 y linaje B/Yamagata, pero no para los restantes virus. La inmunocompetencia puede tener un papel importante en la presencia de Acs pre-vacunales protectores frente a algunos virus de la gripe.

Estudio de la respuesta inmune homóloga y heteróloga frente a virus de la gripe A y B estacionales tras la vacunación monovalente frente al subtipo A/H1N1pmd09 en enfermos autoinmunes

Los datos de este trabajo muestran que la vacunación con vacuna monovalente *Pandemrix* frente al subtipo pandémico A/H1N1pdm09 indujo una seroconversión homóloga significativa frente al subtipo A/H1N1pdm09, tanto en la cohorte de enfermos autoinmunes como en los controles sanos. Sin embargo, la seroconversión heteróloga no fue significativa frente a ninguno de los otros virus de gripe A y B analizados en ninguno de los dos grupos. La respuesta humoral homóloga frente al subtipo A/H1N1pdm09 tras la vacunación monovalente no fue significativamente diferente entre los enfermos autoinmunes y los controles sanos. A pesar de esto, la tasa de seroconversión fue más elevada en los controles sanos, llegando hasta el 82,2%, mientras que en los enfermos autoinmunes solo se observó seroconversión en el 66,0% de los individuos. Esto también se observó en la razón de incremento, que fue más elevada en los controles sanos (RIC=10,1) que en los enfermos autoinmunes (RIC=6,8).

Los datos de este trabajo muestran que la vacunación con vacuna monovalente *Pandemrix* frente al subtipo A/H1N1pdm09 no indujo ninguna respuesta humoral heterotípica frente a los subtipos A/H1N1, A/H3N2, linaje B/Yamagata y B/Victoria ni en enfermos autoinmunes ni en individuos sanos. Esta ausencia de respuesta heterotípica es interesante, sobre todo frente al subtipo A/H1N1. Como se ha comprobado en este trabajo en la población mayor de 65 años, la vacunación con los subtipos A/H1N1pdm09 y A/H1N1 indujeron respuestas humorales heterólogas en los individuos ancianos. Sin embargo, esta respuesta humoral heteróloga claramente no se observa en los individuos con enfermedades

autoinmunes y en los sanos. Esto puede ser debido a que la media de edad de los enfermos autoinmunes (52,5 años) y controles sanos (39,8 años) es mucho menor que la de los ancianos analizados en este trabajo (75,9 años). Cabe recordar que todos los individuos ancianos analizados nacieron antes del año 1950, por lo que tuvieron altas probabilidades de ser primoinfectados por cepas A/H1N1 variantes menores de la Gripe Española de 1918. Este aspecto ya ha sido comentado en este trabajo, y es muy importante para las reacciones humorales heterotípicas entre subtipos de gripe diferentes pero relacionados filogenética y antigénicamente.

Tanto los individuos con enfermedades autoinmunes como los individuos sanos en su mayoría nacieron posteriormente a 1960, por lo que probablemente han sido primoinfectados fundamentalmente por el subtipo A/H2N2 o el subtipo A/H3N2. Sin embargo, aunque ambos grupos también han tenido la oportunidad de estar en contacto con cepas del subtipo A/H1N1 procedentes del virus A/USSR/90/77 emergente en el año 1977 (93,94,96,266), estas cepas poseen una menor relación filogenética con el subtipo A/H1N1pdm09 que las cepas más cercanas a las de 1918. Esto puede explicar la ausencia de respuesta heterotípica frente al subtipo A/H1N1 en enfermos autoinmunes e individuos sanos.

Como también ha sido razonado anteriormente en este trabajo, el virus A/H3N2 es el que ha circulado mayoritariamente desde su aparición en 1968 (194,202), por lo que tanto los enfermos autoinmunes como los sanos han estado más expuestos al subtipo A/H3N2 que al subtipo A/H1N1 re-emergente en 1977. Por otra parte, también ha sido razonado en este trabajo la ausencia de reacciones heterotípicas entre virus de distinto Clado, como es en este caso entre el subtipo A/H1N1pdm09 y A/H3N2 (Clado 1 y Clado 2 respectivamente), lo que también explica la ausencia de respuesta heterotípica frente a A/H3N2. Los resultados de este trabajo apuntan a que los primeros contactos con virus de la gripe en un individuo determinan las interacciones con el resto de virus de la gripe con los que esté en contacto durante toda su vida, lo que se ha mencionado en este trabajo como Doctrina del Pecado Original Antigénico (187,249–251,253).

En otro orden de cosas, aunque los datos de este estudio no demostraron la existencia de diferencias significativas entre enfermos autoinmunes y controles sanos en la seroconversión homóloga ni en la razón de incremento tras la vacunación con vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09, sí que se observó una mayor seroconversión y razón de incremento en los individuos sanos (tasa de seroconversión=82,2%; RIC=10,1) que en

los enfermos autoinmunes (tasa de seroconversión=66,0%; RIC=6,8). Como se ha comentado anteriormente, los enfermos autoinmunes son individuos inmunodeprimidos debido a su enfermedad y al tratamiento asociado a esta (311–313), por lo que la respuesta de su sistema inmune a las infecciones o a las vacunaciones se ve disminuida en muchos casos (140,317). Es sorprendente que no se hayan encontrado diferencias significativas tras la vacunación con vacuna monovalente entre ambos tipos de individuos. Sin embargo, aunque la vacuna indujo una respuesta humoral homóloga muy fuerte en ambos grupos frente al subtipo pandémico, las diferencias en esta respuesta entre ambos tipos de individuos si han de ser tenidas en cuenta, ya que la inmunidad de grupo generada es diferente entre ambos grupos y por lo que parece tras la vacunación queda más protegido el grupo de controles sanos.

En resumen, la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 indujo porcentajes de seroconversión mayores en los controles que en enfermos autoinmunes, aunque la diferencia no fue significativa. No se observó respuesta heterotípica entre los subtipos A/H1N1pdm09 y A/H1N1, a diferencia de lo ocurrido en ≥ 65 años con vacuna estacional.

Eficacia de la respuesta homóloga y heteróloga frente a virus de la gripe A y B estacionales tras la vacunación monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 en enfermos autoinmunes

Para el estudio de la eficacia vacunal en los enfermos autoinmunes y controles sanos se utilizaron los criterios EMA específicos para individuos menores de 60 años (159). Pese a que en el grupo de enfermos autoinmunes había individuos que superaban los 60 años, su número era muy reducido, por lo que se decidió que los criterios EMA establecidos para los individuos menores de 60 años eran los más adecuados para la evaluación de la eficacia vacunal en estas dos cohortes de población. En este sentido cabe apuntar que los criterios EMA para evaluar la eficacia vacunal en los menores de 60 años son más restrictivos que los de ≥ 60 años, ya que exigen una tasa de seroprotección $\geq 70\%$ (TS en ≥ 60 años=60%), una tasa de seroconversión del $\geq 40\%$ (TSC en ≥ 60 años=30%), y una razón de incremento de 2,5 (RIC en ≥ 60 años=2,0) (159).

Los resultados de este estudio mostraron que tras la vacunación con el subtipo A/H1N1pdm09 en los enfermos autoinmunes se cumplieron dos de los criterios EMA frente al

subtipo pandémico (tasa de seroconversión=66,0%; razón de incremento=6,8), mientras que no se cumplió ninguno frente al resto de subtipos de gripe A y B analizados. La tasa de seroprotección obtuvo un valor del 68,1%, muy cercano al valor *cut-off* EMA señalado para individuos menores de 60 años. En el caso de los controles sanos, tras la vacunación con el subtipo pandémico se cumplieron los tres criterios EMA frente al subtipo A/H1N1pdm09. No se cumplió ningún criterio frente a ninguno de los otros virus de gripe A y B analizados salvo la tasa de seroprotección frente al linaje B/Yamagata (71,1%). Sin embargo, se debe recordar que este valor de la tasa de seroprotección es el mismo al obtenido cuando se evaluó el porcentaje de individuos con títulos pre-vacunales protectores, por lo que en este caso la vacuna no ha mostrado ninguna actividad.

La vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 indujo una respuesta humoral homóloga eficaz frente al subtipo pandémico tanto en enfermos autoinmunes como en individuos sanos, mientras que no generó ninguna respuesta heteróloga eficaz frente al resto de subtipos de gripe A y B. Tras la vacunación monovalente con el subtipo A/H1N1pdm09 se obtuvo una inmunización más elevada en los individuos sanos (tasa de seroprotección=82,2%) que en los enfermos (tasa de seroprotección=68,1%). La inmunidad de grupo frente al subtipo A/H1N1pdm09 es muy elevada para ambos grupos de población tras la vacunación, aunque la protección inducida por la vacuna monovalente es bastante más elevada en sanos que en enfermos. Por ello, la vacunación sistemática de la población con vacuna monovalente frente al subtipo pandémico generaría una inmunidad de grupo que dificultaría la circulación del virus A/H1N1pdm09 en los colectivos de riesgo. Los datos de este trabajo muestran que la extensión de la vacunación hacia una indicación universal, como ya se realiza en otros países como EE.UU y Canadá (156,327), es la mejor forma de prevención de la transmisión de la gripe.

A la vista de los resultados de este trabajo, la eficacia de las vacunas de gripe administradas a los individuos con enfermedades autoinmunes puede ser evaluada siguiendo los criterios EMA para individuos ≥ 60 años. Aunque muchos de los individuos autoinmunes sean menores a esta edad, su inmunodepresión condiciona que la respuesta a la vacuna pueda ser asimilable a como sucede la de los individuos mayores de 65 años.

En conclusión, la vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 es eficaz frente a este subtipo pandémico tanto en individuos con enfermedades autoinmunes como en controles sanos, no generando ninguna respuesta heteróloga eficaz frente a ningún otro subtipo de gripe A y B estacionales.

Análisis de los Acs pre-vacunales y del efecto de la vacunación frente a virus de la gripe A y B estacionales en función de la edad y el sexo en enfermos autoinmunes

Al igual que en los individuos sanos, en los individuos con patologías crónicas, incluidos los enfermos autoinmunes, la edad puede ser un condicionante que influya negativamente en la incapacidad del sistema inmune para eliminar la infección por virus de la gripe (134–136,183). La edad puede ser también un condicionante que impida que la vacunación induzca una respuesta eficaz, y de ahí el énfasis que tiene la vacunación de gripe en mayores de 65 años con enfermedades crónicas. Las enfermedades autoinmunes son mucho más prevalentes en mujeres que en hombres (314–316) como se ha observado en los resultados de este trabajo, por lo que puede ser esperable algún tipo de diferencia entre ambos sexos en la actividad de la vacuna.

El análisis de los resultados de este trabajo en el grupo de enfermos autoinmunes se realizó segregando esta población en dos grupos etarios siguiendo los grupos clásicos utilizados para los estudios en el campo de la gripe, uno de individuos entre 18 y 64 años y otro de individuos mayores de 65 años. Los datos del estudio no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos etarios en la media geométrica de los títulos pre-vacunales frente a ninguno de los virus de gripe A y B estacionales en los enfermos autoinmunes. Sin embargo sí que se observó un valor significativamente más elevado de la razón de incremento en el grupo más joven frente al subtipo A/H1N1pdm09 tras la administración de la vacuna monovalente. Esto indica que la inmunosenescencia del individuo afecta de forma significativa a los enfermos autoinmunes, sumándose a la inmunosupresión de base que ya sufre este tipo de personas. Debido a esto, estamos hablando de un colectivo que por una parte posee una inmunodeficiencia que reduce su capacidad de lucha frente a las infecciones (139,317,320–322), al que se le administran fármacos para aliviar los síntomas de su enfermedad y que provocan una inmunosupresión mayor (311–313), y que además sufren procesos de inmunosenescencia a medida que va aumentando la edad del individuo (134–136,183). Esto significa que los individuos con enfermedades autoinmunes son uno de los grupos que mayor riesgo tienen de sufrir complicaciones derivadas de las infecciones por virus de la gripe

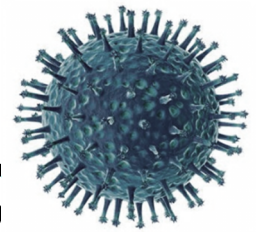
Los datos aportados por este trabajo demuestran la eficacia de la vacunación antigripal monovalente frente al subtipo pandémico en inmunocomprometidos, aspecto que ha de ser tenido en cuenta cuando se fijan las prioridades de vacunación en los distintos colectivos de

riesgo. Por su parte, no se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos en la media geométrica de los títulos pre-vacunales ni en la razón de incremento en el caso de los enfermos autoinmunes.

No se han encontrado diferencias significativas en los Acs pre-vacunales y en la razón de incremento que estén relacionadas con la edad en el grupo de controles sanos, ya que la edad de estos estuvo comprendida entre los 18 y los 59 años. Este rango de edad pertenece a lo que en los estudios de gripe se denomina como jóvenes-adultos, y la ausencia de individuos mayores de 65 años ha impedido poder segregar dos grupos etarios diferentes como si se realizó en el grupo de enfermos autoinmunes. Los datos obtenidos en este estudio no mostraron diferencias ni en la media geométrica de los títulos pre-vacunales ni en la razón de incremento en función del sexo en el grupo de individuos sanos, del mismo modo a lo observado en los enfermos autoinmunes. Pese a que existen artículos científicos que sugieren la existencia de diferencias en el funcionamiento del sistema inmune de hombres y mujeres (255–257), este aspecto no queda documentado frente a la gripe ni en enfermos ni en sanos en este trabajo.

En conclusión, a pesar de la mayor prevalencia de las enfermedades autoinmunes en mujeres, el sexo de los enfermos autoinmunes no predispone a una peor respuesta a la vacunación antigripal. La edad en los enfermos autoinmunes es un factor adicional de peor respuesta frente a la vacunación de gripe.

CONCLUSIONES



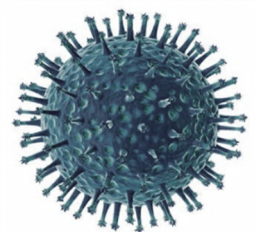
1. Los individuos ≥ 65 años poseen Acs pre-vacunales frente a gripe con títulos protectores ($\geq 1/40$) en una gran proporción. Este porcentaje es mayor frente al subtipo A/H3N2, seguido de los virus de gripe B y el subtipo A/H1N1. Dicho porcentaje guarda relación directa con el tiempo mayor de circulación de A/H3N2 y los virus B.
2. Solo un 3% de los individuos ≥ 65 años mostró títulos protectores de Acs frente al subtipo A/H1N1pdm09 en temporadas previas a la aparición de este virus. Esto contrasta con lo observado en la temporada 2010-2011, en la que esos Acs cuadruplicaron los porcentajes previos, factor a tener en cuenta para explicar la desaparición del subtipo A/H1N1 antiguo.
3. La seroconversión tras la vacunación de los ≥ 65 años fue mayor frente a los virus de la gripe A que frente a los virus B. Esta respuesta fue mayor frente al subtipo A/H3N2 en todas las temporadas a excepción de la primera temporada post-pandémica, que fue mayor frente al subtipo A/H1N1pdm09. La vacunación indujo una leve seroconversión heteróloga entre los subtipos A/H1N1 y A/H1N1pdm09 y viceversa, y también entre los linajes B/Victoria y B/Yamagata, que se corresponde con la distancia genética entre linajes B y subtipos de gripe A.
4. Aplicando los criterios EMA para ≥ 60 años, todas las vacunaciones frente a la gripe en los ≥ 65 años fueron serológicamente más eficaces frente a los subtipos de gripe A que frente a los subtipos de gripe B. La mayor eficacia vacunal se observó frente al subtipo A/H3N2, solo superada por el nuevo subtipo A/H1N1pdm09. La inmunización frente al linaje B/Victoria no cumplió los criterios EMA en dos de las temporadas sin *mismatch* frente a este linaje.
5. Las MGTs de Acs pre-vacunales frente al subtipo A/H1N1pdm09 y al linaje B/Victoria fueron mayores en los ≥ 85 años, en consonancia con su año de nacimiento y la circulación del subtipo A/H1N1 de la Gripe Española. La razón de incremento frente al linaje B/Yamagata fue mayor en los individuos < 85 años, por lo que esta edad fija un punto de inflexión importante en la edad de respuesta a la vacunación trivalente antigripal.



6. Las vacunas adyuvadas generan en la población ≥ 65 años una respuesta humoral significativamente mayor frente a los subtipos A/H1N1 y A/H3N2 en comparación con las fraccionadas. Sin embargo, no existen diferencias entre ambos tipos de vacuna frente al subtipo A/H1N1pdm09 y los linajes B/Yamagata y B/Victoria.
7. Entre dos y cuatro de cada diez individuos ≥ 65 años poseen títulos de Acs pre-vacunales protectores frente a cepas antiguas de gripe del subtipo A/H1N1. Esta proporción de individuos fue más elevada frente a A/Weiss/43 que frente a A/FM/1/47, en relación con la distancia genética entre ambas cepas de gripe.
8. La vacunación con vacuna trivalente anual en población que ha estado potencialmente expuesta a linajes A/H1N1 de la Gripe Española de 1918, indujo una seroconversión leve pero significativa frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas. Esta respuesta heterotípica fue mayor frente a A/Weiss/43 en las cohortes vacunadas con el subtipo A/H1N1 anterior a 2009, y mayor frente a A/FM/1/47 en la cohorte vacunada con el virus pandémico del 2009, aspecto que requiere mayor trabajo de investigación.
9. La vacuna trivalente anual administrada a la población mayor de 65 años no indujo una respuesta heteróloga eficaz frente a las cepas de gripe A/H1N1 antiguas. Sin embargo, en algunas de las temporadas estudiadas, la presencia de individuos con Acs previos protectores frente a aquellas cepas permitió que tras la vacunación se alcanzaran tasas de seroprotección por encima de los valores de corte de la EMA.
10. Los individuos ≥ 85 años poseen MGTs de Acs pre-vacunales menores que los más jóvenes, y muestran una peor respuesta heterotípica frente a virus de gripe A/H1N1 antiguos tras la vacunación anual, efecto muy evidente frente al virus A/FM/1/47. La edad ≥ 85 años es determinante en la presencia de Acs pre-vacunales y en la respuesta humoral a la vacunación de gripe anual.
11. El porcentaje de individuos ≥ 65 años con Acs pre-vacunales protectores frente a subtipos de gripe aviar A/H5N1, A/H7N3 y A/H9N2 es mínimo. Por consiguiente la población anciana no está protegida frente a estos subtipos de gripe aviar en razón a una inmunidad heteróloga.

12. La vacuna de gripe anual indujo una leve pero significativa seroconversión heterotípica frente a los subtipos de gripe aviar A/H5N1 y A/H9N2 del Clado 1 del gen de la hemaglutinina, y ninguna frente al subtipo A/H7N3 del Clado 2. Tampoco generó ninguna respuesta heterotípica eficaz frente los virus de gripe aviar, aunque siguiendo criterios EMA, la seroconversión fue significativamente mayor frente al subtipo A/H5N1 cuando se vacunó con el subtipo A/H1N1pdm09, aspecto que es necesario revisar en un mayor número de individuos.
13. El porcentaje de individuos con Acs protectores fue más elevado en controles que en enfermos autoinmunes frente a A/H3N2 y linaje B/Yamagata, pero no para los restantes virus. La inmunocompetencia puede tener un papel importante en la presencia de Acs pre-vacunales protectores frente a algunos virus de la gripe.
14. La vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 indujo porcentajes de seroconversión mayores en los controles que en enfermos autoinmunes, aunque la diferencia no fue significativa. No se observó respuesta heterotípica entre los subtipos A/H1N1pdm09 y A/H1N1, a diferencia de lo ocurrido en ≥ 65 años con vacuna estacional. La vacuna monovalente frente al subtipo A/H1N1pdm09 es eficaz frente a este subtipo pandémico tanto en individuos con enfermedades autoinmunes como en controles sanos, no generando ninguna respuesta heteróloga eficaz frente a ningún otro subtipo de gripe A y B estacionales.
15. A pesar de la mayor prevalencia de las enfermedades autoinmunes en mujeres, el sexo de los enfermos autoinmunes no predispone a una peor respuesta a la vacunación antigripal. La edad en los enfermos autoinmunes es un factor adicional de peor respuesta frente a la vacunación de gripe.

RENDIMIENTO CIENTÍFICO





Congresos Internacionales

Título: Differential analysis of the administration of Pandemrix monovalent vaccine against A/H1N1pdm09 flu virus in patients with autoimmune diseases against healthy controls

Sanz I, Rojo S, Tamames S, Rodríguez-Carballeira M, Ortiz de Lejarazu R.

The European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Amsterdam, Netherlands. 9-12 April 2016

Título: Booster effect against old H1N1 influenza strains after flu seasonal vaccination

Sanz I, Rojo S, Eiros JM, Vega T, Tamames S, Ortiz de Lejarazu R

Influenza Vaccines for the World Congress. Albufeira, Portugal. 6-9 October 2015

Título: Heterologous response against avian flu strains after vaccination with trivalent seasonal flu vaccine

Sanz I, Rojo S, Eiros JM, Vega T, Tamames S, Ortiz de Lejarazu R

Influenza Vaccines for the World Congress. Albufeira, Portugal. 6-9 October 2015

Título: Presence of antibodies against the old H1N1 influenza strains A/Weiss/43 and A/FM/1/47 in elderly population in Spain

Sanz I, Rojo S, Eiros JM, Vega T, Tamames S, Ortiz de Lejarazu R

ECDC Annual Influenza Meeting. Stockholm, Sweden. 12 June 2015

Título: Occurrence of antibodies against influenza H1N1 A/Weiss/43 and A/FM/47 strains in an elderly vaccinated cohort in Spain

Sanz I, Rojo S, Eiros JM, Vega T, Tamames S, Ortiz de Lejarazu R

The European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Copenhagen, Denmark. 25-28 April 2015



Congresos Nacionales

Título: Respuesta heteróloga frente a cepas de gripe aviar tras la vacunación con vacuna trivalente estacional de gripe

Sanz, S. Rojo Rello, S. Tamames, J.M. Eiros, R. Ortiz De Lejarazu

Congreso Anual de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sevilla, España. 28-30 Mayo 2015



ANEXO 1

Consentimiento informado para la extracción de una muestra de suero prevacunal y otra postvacunal con destino al Programa de Vigilancia Integrada de la Gripe

La Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León realiza anualmente el seguimiento y control de la gripe en nuestra Comunidad Autónoma. Entre los estudios que implica este seguimiento se encuentra la determinación del efecto de la vacunación antigripal en la población, cuyos resultados son de extraordinaria importancia para mejorar la eficacia de las campañas de vacunación de cada temporada.

Para ello, se seleccionan voluntarios entre aquellas personas que van a ser vacunadas, en las que se extrae una muestra de suero inmediatamente antes de vacunarse y otra entre cuatro y seis semanas después de la vacunación con el fin de medir el efecto alcanzado.

Los análisis de sangre, que requerirán su participación voluntaria y que será realizado por personal sanitario en el Centro de Salud, Consultorio Local o el Centro de Residencia, no conllevan ningún tipo de riesgo ni incomodidad para Ud., salvo la toma de la muestra (dolor durante el procedimiento de extracción, pequeña pérdida de sangre y posible aparición de hematoma en el lugar de la punción).

Se adoptarán las medidas oportunas para garantizar la intimidad y confidencialidad de todos los datos personales que se obtengan para la realización de este estudio, sometiéndose al régimen de protección establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de datos de carácter personal y demás normas reglamentarias que la desarrollan. Una vez realizados los análisis en el Centro de Gripe de Valladolid, la muestra sobrante será eliminada.

Usted podrá solicitar y obtener gratuitamente información sobre sus datos de carácter personal sometidos a tratamiento, mediante petición o solicitud dirigida a la Dirección General de Salud Pública de la Consejería de Sanidad, formulada por cualquier medio que garantice su identificación y el fichero a consultar. Del mismo modo podrá solicitar la rectificación o cancelación de datos cuando estos fueran inexactos, incompletos, inadecuados o excesivos.

.....ade.....de 2013

D/Dña:.....declaro que he recibido y comprendido la información que me ha sido facilitada sobre el examen clínico que se me va a realizar y los objetivos del mismo, que conozco la posibilidad de revocar en cualquier momento mi consentimiento y que he recibido copia de este documento.

Estando de acuerdo con todo lo que se me ha informado y con lo expuesto en este documento, CONSIENTO en la realización del examen y el estudio a realizar.

Firma del seleccionado

Legislación aplicable: Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, BOE nº 298 de 14-12-1999; Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, BOE nº 274 de 15-11-2002; Ley 8/2003, de 8 de abril, sobre derechos y deberes de las personas en relación con la salud, BOCYL nº 71 de 14-04-2003; Orden SBS/1325/2003, de 3 de septiembre, por la que se publican las Guías de información al usuario, BOCYL nº 205 de 22-10-2003.

Anexo 2

Consentimiento informado para la extracción de muestras sanguíneas en enfermos autoinmunes y controles sanos



ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA TRAS LA ADMINISTRACION DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIRUS INFLUENZA N1H1

Yo , _____ doy mi consentimiento para participar en este estudio destinado a valorar la respuesta a la vacuna frente al virus Influenza N1H1. Acepto que se me efectúe una analítica de sangre previa a la administración de la vacuna y otra tras varias semanas. Sé que puedo renunciar a la participación en el estudio en cualquier momento.

Firmado:

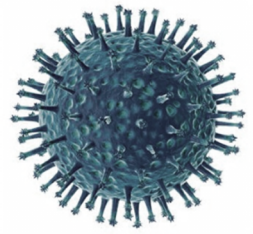


Participante en el estudio

Dra. M. Rodríguez Carballeira
Responsable de este estudio

Terrassa, 23 de noviembre de 2009

BIBLIOGRAFÍA



1. Rojo, S. Detección de gripe y otros virus respiratorios durante un periodo pandémico y postpandémico de nueva variante de gripe. Universidad de Valladolid; 2013.
2. Nakajima K. History of influenza virus research. *Jpn J Clin Med.* 2006;64(10):1774-80.
3. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. *Lancet.* 1933;2:66-8.
4. Francis Jr T. A new type of virus from epidemic influenza. *Science.* 1940;92:405-8.
5. Taylor RM. A further note on 1233 influenza C virus. *Arch Für Gesamte Virusforsch.* 1951;4(4):485-500.
6. Margaret Hunt. Microbiology and Immunology On-Line [Internet]. University of South Carolina School of Medicine; 2009 [citado 11 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/flu.htm>
7. Manuguerra JC, Hannoun C, Sáenz M del C, Villar E, Cabezas JA. Sero-epidemiological survey of influenza C virus infection in Spain. *Eur J Epidemiol.* 1994;10(1):91-4.
8. Gracia Ahufinger, I. Evaluación de la respuesta humoral frente a la vacuna de la gripe estacional en Castilla y León. Campañas de vacunación gripal 1995 a 2005. Universidad de Valladolid; 2009.
9. Hirst GK. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science.* 1941;94(2427):22-3.
10. Robert L. Atmar, Stephen E. Lindstrom. Influenza viruses. En: *Manual of clinical Microbiology.* 10.^a ed. ASM Press, Washington, DC; 2011. p. 1333-46.
11. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio.* 2014;5(2):e00031-14.
12. Bodewes R, Morick D, de Mutsert G, Osinga N, Bestebroer T, van der Vliet S, et al. Recurring Influenza B Virus Infections in Seals. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(3):511-2.
13. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science.* 12 de mayo de 2000;288(5468):1051-3.
14. Blanc A, Ruchansky D, Clara M, Achaval F, Le Bas A, Arbiza J. Serologic evidence of influenza A and B viruses in South American fur seals (*Arctocephalus australis*). *J Wildl Dis.* 2009;45(2):519-21.
15. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology.* 1999;258(1):1-20.
16. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ.* 1980;58(4):585-91.
17. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):152-79.



18. Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(3):397-401.
19. Horne RW, Waterson AP, Wildy P, Farnham AE. The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. *Virology.* 1960;11:79-98.
20. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* 2009;143(2):147-61.
21. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.* 2007;8(3):196-205.
22. Shaw ML, Palese P. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. En: *Fields Virology.* 6.^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: Knipe DM, Howley PM; 2013. p. 1691–1740.
23. Zhang J, Pekosz A, Lamb RA. Influenza Virus Assembly and Lipid Raft Microdomains: a Role for the Cytoplasmic Tails of the Spike Glycoproteins. *J Virol.* 2000;74(10):4634-44.
24. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature.* 1988;333(6172):426-31.
25. Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, et al. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(46):17736-41.
26. Reina J. Factors affecting the virulence and pathogenicity of avian and human viral strains (influenza virus type A). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(7):346-53.
27. Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, et al. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(50):19123-7.
28. Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature.* 1983;303(5912):35-40.
29. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature.* 1983;303(5912):41-4.
30. Huang I-C, Li W, Sui J, Marasco W, Choe H, Farzan M. Influenza A Virus Neuraminidase Limits Viral Superinfection. *J Virol.* 2008;82(10):4834-43.
31. O'Neill RE, Talon J, Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 1998;17(1):288-96.
32. Richardson JC, Akkina RK. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol.* 1991;116(1-4):69-80.
33. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell.* 1992;69(3):517-28.

34. Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J.* 1997;16(6):1248-57.
35. Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, et al. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature.* 2006;439(7075):490-2.
36. Almansa, R. Inmunopatogénesis de la gripe pandémica de 2009. Universidad de Valladolid; 2012.
37. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med.* 2001;7(12):1306-12.
38. Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog.* 2005;1(1):e4.
39. Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(7):4170-4.
40. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science.* 1982;215(4540):1577-85.
41. Steinhauer DA, Holland JJ. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:409-33.
42. Batschelet E, Domingo E, Weissmann C. The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene.* 1976;1(1):27-32.
43. Quiñones-Mateu ME, Arts EJ. Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;299:83-140.
44. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses. *J Virol.* 2006;80(7):3675-8.
45. Lauring AS, Frydman J, Andino R. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(5):327-36.
46. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):e1001005.
47. Pumarola T, Marcos MA, Jiménez de Anta MT. Variaciones antigénicas del virus de la influenza como determinante epidemiológico clave. *Vacunas.* 2002;3(Supl.1):1-4.
48. Both GW, Sleight MJ. Conservation and variation in the hemagglutinins of Hong Kong subtype influenza viruses during antigenic drift. *J Virol.* septiembre de 1981;39(3):663-72.
49. Antigenic shift and drift. *Nature.* 1980;283(5747):524-5.



50. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*. 1998;72(9):7367-73.
51. Scholtissek C. Molecular epidemiology of influenza. *Arch Virol Suppl*. 1997;13:99-103.
52. Steinhauer DA, Skehel JJ. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet*. 2002;36:305-32.
53. Webster RG, Laver WG, Air GM, Ward C, Gerhard W, van Wyke KL. The mechanism of antigenic drift in influenza viruses: analysis of Hong Kong (H3N2) variants with monoclonal antibodies to the hemagglutinin molecule. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;354:142-61.
54. Sandbulte MR, Spickler AR, Zaabel PK, Roth JA. Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines*. 2015;3(1):22-73.
55. Uyeki TM, Chong Y-H, Katz JM, Lim W, Ho Y-Y, Wang SS, et al. Lack of Evidence for Human-to-Human Transmission of Avian Influenza A (H9N2) Viruses in Hong Kong, China 1999. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(2):154-9.
56. Scalera NM, Mossad SB. The first pandemic of the 21st century: a review of the 2009 pandemic variant influenza A (H1N1) virus. *Postgrad Med*. 2009;121(5):43-7.
57. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:531-69.
58. Pinto LH, Lamb RA. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem*. 2006;281(14):8997-9000.
59. Samji T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale J Biol Med*. 2009;82(4):153-9.
60. Bouloy M, Morgan MA, Shatkin AJ, Krug RM. Cap and internal nucleotides of reovirus mRNA primers are incorporated into influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *J Virol*. 1979;32(3):895-904.
61. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009;459(7249):931-9.
62. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol*. 2000;74(18):8709-19.
63. Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol*. 1995;69(2):1099-106.
64. Last J. *A dictionary of epidemiology*. 4th Edition. USA: Oxford University Press; 2001. 377 p.

65. ECDC. Definition of a Pandemic [Internet]. [citado 11 de abril de 2015]. Disponible en: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/pandemic_preparedness/basic_facts/Pages/definition_of_pandemic.aspx?preview=yes&pdf=yes
66. Peter Doshi. The elusive definition of pandemic influenza [Internet]. 2011 [citado 14 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/89/7/11-086173.pdf>
67. Johnson NPAS, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 «Spanish» influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 2002;76(1):105-15.
68. Frost WH. Statistics of influenza morbidity. *Public Health Reports.* 1920;35:584-97.
69. Kaplan MW, Webster RG. La epidemiología de la gripe. *Invest Ciencia.* 1978;17:52-63.
70. Smith GJD, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LLM, Chen H, et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(28):11709-12.
71. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(1):15-22.
72. Jordan E. *Epidemic Influenza: a survey.* Chicago, USA: American Medical Association; 1927.
73. Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(11):909-14.
74. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature.* 6 de octubre de 2005;437(7060):889-93.
75. Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, et al. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe.* 11 de junio de 2014;15(6):692-705.
76. Worobey M, Han G-Z, Rambaut A. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(22):8107-12.
77. Beveridge WI. The start of pandemics: site, season and spread. *Dev Biol Stand.* 1977;39:443-4.
78. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(1):9-14.
79. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol.* 1989;63(11):4603-8.
80. Jernigan DB et al. *Textbook of Influenza.* 2.^a ed. Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, UK: Wiley Blackwell; 2013.
81. Cockburn WC, Delon PJ, Ferreira W. Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic. *Bull World Health Organ.* 1969;41(3-4-5):343-8.



82. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation. *Cell Host Microbe*. 2010;7(6):440-51.
83. Tscherne DM, García-Sastre A. Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *J Clin Invest*. 2011;121(1):6-13.
84. Brauer R, Chen P. Influenza Virus Propagation in Embryonated Chicken Eggs. *J Vis Exp*. 2015;(97):52421.
85. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009;325(5937):197-201.
86. Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009;459(7250):1122-5.
87. Del Rio C, Guarner J. The 2009 influenza A (H1N1) pandemic: what have we learned in the past 6 months. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2010;121:128-40.
88. Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Kerkhove MDV, Hollingsworth TD, et al. Pandemic Potential of a Strain of Influenza A (H1N1): Early Findings. *Science*. 2009;324(5934):1557-61.
89. Vaqué J. Epidemiology of influenza A (H1N1) worldwide and in Spain. *Arch Bronconeumol*. 2010;46 Suppl 2:3-12.
90. Jaber S, Conseil M, Coisel Y, Jung B, Chanques G. ARDS and influenza A (H1N1): patients' characteristics and management in intensive care unit. A literature review. *Ann Fr Anesthésie Réanimation*. 2010;29(2):117-25.
91. Kilbourne ED, Smith C, Brett I, Pokorny BA, Johansson B, Cox N. The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-World War II epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10748-52.
92. Nakajima S, Nishikawa F, Nakajima K. Comparison of the evolution of recent and late phase of old influenza A (H1N1) viruses. *Microbiol Immunol*. 2000;44(10):841-7.
93. Scholtissek C, von Hoyningen V, Rott R. Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1). *Virology*. 1978;89(2):613-7.
94. Kendal AP, Noble GR, Skehel JJ, Dowdle WR. Antigenic similarity of influenza A (H1N1) viruses from epidemics in 1977-1978 to «Scandinavian» strains isolated in epidemics of 1950-1951. *Virology*. 1978;89(2):632-6.
95. Nakajima K, Desselberger U, Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*. 1978;274(5669):334-9.
96. Kozlov JV, Gorbulev VG, Kurmanova AG, Bayev AA, Shilov AA, Zhdanov VM. On the origin of the H1N1 (A/USSR/90/77) influenza virus. *J Gen Virol*. 1981;56:437-40.

97. Furmanski M. The 1977 H1N1 Influenza Virus Reemergence Demonstrated Gain-of-Function Hazards. *mBio*. 2015;6(5).
98. WHO. Avian Influenza Weekly Update Number 509 [Internet]. 2015 [citado 24 de noviembre de 2015]. Disponible en:
http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/AvianInfluenza/en/
99. Treanor JJ. Virus de la gripe, incluidos los virus de la gripe aviar y porcina. En: *Enfermedades infecciosas Principios y práctica*. 7.^a ed. Elsevier; 2012. p. 2272-96.
100. Katz JM, Lim W, Bridges CB, Rowe T, Hu-Primmer J, Lu X, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis*. 1999;180(6):1763-70.
101. WHO. Influenza at the human animal interface - Monthly Risk Assessment [Internet]. 2016 [citado 16 de junio de 2016]. Disponible en:
http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_05_09_2016.pdf?ua=1
102. Pu J, Wang S, Yin Y, Zhang G, Carter RA, Wang J, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(2):548-53.
103. Peiris JS, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster RG, Shortridge KF. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary «human» H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J Virol*. 2001;75(20):9679-86.
104. Kim JA, Cho SH, Kim HS, Seo SH. H9N2 influenza viruses isolated from poultry in Korean live bird markets continuously evolve and cause the severe clinical signs in layers. *Vet Microbiol*. 2006;118(3-4):169-76.
105. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. 2007;25(30):5637-44.
106. Huang R, Wang A-R, Liu Z-H, Liang W, Li X-X, Tang Y-J, et al. Seroprevalence of avian influenza H9N2 among poultry workers in Shandong Province, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(10):1347-51.
107. Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology*. 2001;281(2):156-62.
108. Gao H-N, Lu H-Z, Cao B, Du B, Shang H, Gan J-H, et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N Engl J Med*. 2013;368(24):2277-85.
109. Su S, Bi Y, Wong G, Gray GC, Gao GF, Li S. Epidemiology, Evolution, and Recent Outbreaks of Avian Influenza Virus in China. *J Virol*. 2015;89(17):8671-6.
110. Chen Y, Liang W, Yang S, Wu N, Gao H, Sheng J, et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. *Lancet*. 2013;381(9881):1916-25.
111. Wu Y, Gao GF. Lessons learnt from the human infections of avian-origin influenza A H7N9 virus: live free markets and human health. *Sci China Life Sci*. 2013;56(6):493-4.



112. Monto AS, Kioumeh F. The Tecumseh Study of Respiratory Illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966-1971. *Am J Epidemiol.* 1975;102(6):553-63.
113. Glezen WP, Couch RB. Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-76. *N Engl J Med.* 1978;298(11):587-92.
114. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2013-2014 [Internet]. [citado 29 de octubre de 2015]. Disponible en: http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20132014/InformesAnuales/Informe_Vigilancia_GRIPE_2013-2014_v19022015.pdf
115. Glezen WP, Keitel WA, Taber LH, Piedra PA, Clover RD, Couch RB. Age distribution of patients with medically-attended illnesses caused by sequential variants of influenza A/H1N1: comparison to age-specific infection rates, 1978-1989. *Am J Epidemiol.* 1991;133(3):296-304.
116. Singh N, Agrawal S, Rastogi AK. Infectious diseases and immunity: special reference to major histocompatibility complex. *Emerg Infect Dis.* 1997;3(1):41-9.
117. Holly H. Birdsall. Anticuerpos. En: *Enfermedades infecciosas Principios y práctica.* 7.^a ed. Barcelona: Elsevier; 2012. p. 58-75.
118. Gerhard W, Mozdzanowska K, Furchner M, Washko G, Maiese K. Role of the B-cell response in recovery of mice from primary influenza virus infection. *Immunol Rev.* 1997;159:95-103.
119. Ekiert DC, Friesen RHE, Bhabha G, Kwaks T, Jongeneelen M, Yu W, et al. A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses. *Science.* 2011;333(6044):843-50.
120. Lara-Ramírez EE, Segura-Cabrera A, Salazar MI, Rodríguez-Pérez MA, Guo X. Large scale genome analysis shows that the epitopes for broadly cross-reactive antibodies are predominant in the pandemic 2009 influenza virus A H1N1 strain. *Viruses.* 2013;5(11):2796-802.
121. Smirnov YA, Lipatov AS, Gitelman AK, Okuno Y, Van Beek R, Osterhaus AD, et al. An epitope shared by the hemagglutinins of H1, H2, H5, and H6 subtypes of influenza A virus. *Acta Virol.* 1999;43(4):237-44.
122. Terajima M, Babon JAB, Co MDT, Ennis FA. Cross-reactive human B cell and T cell epitopes between influenza A and B viruses. *Virol J.* 2013;10:244.
123. Wyrzucki A, Dreyfus C, Kohler I, Steck M, Wilson IA, Hangartner L. Alternative recognition of the conserved stem epitope in influenza A virus hemagglutinin by a VH3-30-encoded heterosubtypic antibody. *J Virol.* 2014;88(12):7083-92.
124. Yamashita A, Kawashita N, Kubota-Koketsu R, Inoue Y, Watanabe Y, Ibrahim MS, et al. Highly conserved sequences for human neutralization epitope on hemagglutinin of influenza A viruses H3N2, H1N1 and H5N1: Implication for human monoclonal antibody recognition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393(4):614-8.

125. Zhao R, Cui S, Guo L, Wu C, Gonzalez R, Paranhos-Baccalà G, et al. Identification of a highly conserved H1 subtype-specific epitope with diagnostic potential in the hemagglutinin protein of influenza A virus. *PLoS One*. 2011;6(8):e23374.
126. De Vries RD, Altenburg AF, Rimmelzwaan GF. Universal influenza vaccines, science fiction or soon reality? *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(10):1299-301.
127. Wiersma LCM, Rimmelzwaan GF, de Vries RD. Developing Universal Influenza Vaccines: Hitting the Nail, Not Just on the Head. *Vaccines*. 2015;3(2):239-62.
128. Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Tamames Gómez S. La gripe y las vacunas frente a la gripe: presente y futuro. *Pediatría Aten Primaria*. 2014;16(63):253-8.
129. Monsalvo AC, Batalle JP, Lopez MF, Krause JC, Klemenc J, Hernandez JZ, et al. Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes. *Nat Med*. 2011;17(2):195-9.
130. Jang YH, Byun YH, Lee YJ, Lee YH, Lee K-H, Seong BL. Cold-adapted pandemic 2009 H1N1 influenza virus live vaccine elicits cross-reactive immune responses against seasonal and H5 influenza A viruses. *J Virol*. 2012;86(10):5953-8.
131. Imai K, Nakamura K, Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Yamaguchi S. Partial protection against challenge with the highly pathogenic H5N1 influenza virus isolated in Japan in chickens infected with the H9N2 influenza virus. *Arch Virol*. 2007;152(7):1395-400.
132. Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J Hyg (Lond)*. 1972;70(4):767-77.
133. Trombetta CM, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. *Vaccines*. 2014;2(4):707-34.
134. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol*. 2007;211(2):144-56.
135. Haralambieva IH, Painter SD, Kennedy RB, Ovsyannikova IG, Lambert ND, Goergen KM, et al. The impact of immunosenescence on humoral immune response variation after influenza A/H1N1 vaccination in older subjects. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122282.
136. Haq K, McElhaney JE. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. *Curr Opin Immunol*. 2014;29:38-42.
137. Lavanchy D, Osterhaus AD. Recommendations for the use of inactivated influenza vaccines and other preventive measures. *Vaccine*. 2001;19(15-16):1849-53.
138. Jan Wilschut, Janet McElhaney, Abraham Palache. *Rapid reference to influenza*. 2.^a ed. Elsevier Health Sciences; 2006. 248 p.
139. Arason GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR. Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol*. 2010;71(5):317-28.
140. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001;345(5):340-50.



141. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(34):12283-7.
142. Dawson JR. Ernest William Goodpasture. *Am J Pathol*. 1961;38(2):127a-127a.3.
143. Plotkin, S.L, Plotkin, S.A. A short history of vaccination.
144. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(9):1085-94.
145. Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. *N Engl J Med*. 2005;352(18):1839-42.
146. WHO. List of National Influenza Centres [Internet]. 2015 [citado 12 de febrero de 2015]. Disponible en:
http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centres/national_influenza_centres.pdf
147. CDC. Selecting Viruses for the Seasonal Influenza Vaccine | Seasonal Influenza (Flu) [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.cdc.gov/flu/about/season/vaccine-selection.htm>
148. CDC. How Influenza (Flu) Vaccines Are Made | Seasonal Influenza (Flu) [Internet]. [citado 4 de diciembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/how-fluvaccine-made.htm>
149. FDA. FDA approves first seasonal influenza vaccine manufactured using cell culture technology [Internet]. 2012 [citado 24 de junio de 2016]. Disponible en:
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm328982.htm>
150. Chambers BS, Li Y, Hodinka RL, Hensley SE. Recent H3N2 Influenza Virus Clinical Isolates Rapidly Acquire Hemagglutinin or Neuraminidase Mutations When Propagated for Antigenic Analyses. *J Virol*. 2014;88(18):10986-9.
151. FDA. FDA approves new seasonal influenza vaccine made using novel technology [Internet]. 2013 [citado 24 de junio de 2016]. Disponible en:
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm335891.htm>
152. NIH. Influenza Vaccine Technologies [Internet]. [citado 9 de diciembre de 2015]. Disponible en:
<https://www.niaid.nih.gov/topics/Flu/Research/vaccineResearch/Pages/Technologies.aspx#dna>
153. FDA. FDA Approves A High Dose Seasonal Influenza Vaccine Specifically Intended for People Ages 65 and Older [Internet]. [citado 4 de diciembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm195483.htm>
154. FDA. FDA Package Insert - Fluzone - High Dose [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM305079.pdf>
155. CDC. Prevention and Control of Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2015–16 Influenza Season [Internet]. [citado 7 de diciembre de 2015]. Disponible en:

- http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6430a3.htm#Groups_Recommended_Vaccination_Timing_Vaccination
156. Public Health Agency of Canada. An Advisory Committee Statement (ACS) National Advisory Committee on Immunization (NACI) - Statement on Seasonal Influenza Vaccine for 2014 - 2015 [Internet]. 2014 [citado 15 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.phac-aspc.gc.ca/naci-ccni/assets/pdf/flu-grippe-eng.pdf>
 157. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Enfermedades Transmisibles - Gripe [Internet]. [citado 7 de diciembre de 2015]. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/gripe/gripe.htm>
 158. Borràs E, Domínguez A, Salleras L. Assessing the effectiveness of vaccination programs. *Gac Sanit.* 2011;25:49-55.
 159. EMA. Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96) [Internet]. 1997 [citado 12 de septiembre de 2015]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003945.pdf
 160. Petrie JG, Ohmit SE, Johnson E, Cross RT, Monto AS. Efficacy studies of influenza vaccines: effect of end points used and characteristics of vaccine failures. *J Infect Dis.* 2011;203(9):1309-15.
 161. Falsey AR, Walsh EE. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis.* 2006;42(4):518-24.
 162. Bernstein E, Kaye D, Abrutyn E, Gross P, Dorfman M, Murasko DM. Immune response to influenza vaccination in a large healthy elderly population. *Vaccine.* 1999;17(1):82-94.
 163. Ortiz de Lejarazu, R. Vacunas de la gripe obtenidas de cultivos celulares. En IX Jornadas de vacunas en Atención Primaria, Valencia; 2008.
 164. SVGE. Guía de procedimientos para la vigilancia de gripe en España [Internet]. 2014 [citado 24 de junio de 2016]. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/Guia_procedimientos_vigilancia_gripe_8octubre2014.pdf
 165. Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León. Procedimientos y documentación de la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León [Internet]. 2011 [citado 14 de diciembre de 2015]. Disponible en: www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/centinelas/red-centinela-sanitaria-castilla-leon.ficheros/84419-Procedimientos%20y%20documentaci%C3%B3n%20de%20la%20Red%20Centinela%20Sanitaria%20de%20Castilla%20y%20Le%C3%B3n%20v%203_.pdf
 166. Instituto de Salud Carlos III. Informe semanal de vigilancia de la gripe en España. Semana 06/2015 (2-8 Febrero 2015) [Internet]. 2015 [citado 14 de diciembre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20142015/boletines/grn062015.pdf>
 167. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2014-2015 [Internet]. [citado 29 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/inicio.do>



168. Dirección General de Salud Pública, Red Centinela Sanitaria de Castilla y León, Centro de Gripe de Valladolid. Programa de Vigilancia de la gripe RCSCyL. Semana 49. [Internet]. 2015 [citado 14 de diciembre de 2015]. Disponible en: www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/centinelas/informacion-semanal-gripe.ficheros/341115-PVIG_Informe_WEB_2015-49.pdf
169. WHO. TOR for NICs [Internet]. [citado 21 de octubre de 2015]. Disponible en: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centres/terms_of_reference_for_national_influenza_centres.pdf
170. WHO. Pandemic influenza preparedness Framework [Internet]. 2011 [citado 24 de junio de 2016]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44796/1/9789241503082_eng.pdf
171. CNRL, ECDC. Key Tasks for CNRL Member Laboratories [Internet]. 2011 [citado 14 de diciembre de 2015]. Disponible en: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/influenza/laboratory_network/Pages/key_tasks.aspx
172. OMS. Selection of clinical specimens for virus isolation and of viruses for shipment from National Influenza Centres to WHO Collaborating Centres [Internet]. 2010 [citado 16 de diciembre de 2015]. Disponible en: www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centres/20101206_specimens_selected_for_virus_isolation_and_shipment.pdf
173. ORDEN SAN/1593/2006, 13 de Octubre 2006. Regulación, organización y funcionamiento de la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León. 2006.
174. WHO. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. 2002.
175. Cohen A, Belyavin G. The influenza virus hemagglutination inhibitors of normal rabbit serum. 1. Separation of the inhibitory components. *Virology*. 1961;13:58-67.
176. WHO. How to become a National Influenza Centre [Internet]. [citado 21 de octubre de 2015]. Disponible en: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centres/how_to_become_a_national_influenza_centre_21_09_2005.pdf
177. ECDC. European Reference Laboratory Network for Human Influenza (ERLI-Net) [Internet]. [citado 21 de octubre de 2015]. Disponible en: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/influenza/laboratory_network/Pages/laboratory_network.aspx
178. ECDC. Influenza Monitoring Vaccine Effectiveness in Europe (I-MOVE) [Internet]. [citado 29 de octubre de 2015]. Disponible en: http://www.who.int/immunization/research/meetings_workshops/4_Valenciano_I_MOVE.pdf
179. Valenciano M, Ciancio B, I-MOVE study team. I-MOVE: a European network to measure the effectiveness of influenza vaccines. *Euro Surveill*. 2012;17(39).
180. ECDC. Protocol for cohort database studies to measure influenza vaccine effectiveness in the European Union and European Economic Area Member States [Internet]. [citado

- 29 de octubre de 2015]. Disponible en:
http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0907_TER_Influenza_AH1N1_Measuring_Influenza_Vaccine_Effectiveness_Protocol_Cohort_Database_Studies.pdf
181. Ortiz de Lejarazu, R., Rodríguez-Torres, A. En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ausina Ruiz V, Moreno Gillén Editores; 2006. p. 855-72.
 182. ECDC. Priority risk groups for Influenza vaccination [Internet]. [citado 15 de octubre de 2015]. Disponible en:
http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/seasonal_influenza/vaccines/Pages/influenza_vaccination.aspx#riskgroups
 183. Pera A, Campos C, López N, Hassouneh F, Alonso C, Tarazona R, et al. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas*. 2015;82(1):50-5.
 184. Dorrington MG, Bowdish DME. Immunosenescence and Novel Vaccination Strategies for the Elderly. *Front Immunol*. 2013;4:171.
 185. Lelic A, Verschoor CP, Ventresca M, Parsons R, Eveleigh C, Bowdish D, et al. The polyfunctionality of human memory CD8+ T cells elicited by acute and chronic virus infections is not influenced by age. *PLoS Pathog*. 2012;8(12):e1003076.
 186. Olivieri F, Rippo MR, Prattichizzo F, Babini L, Graciotti L, Recchioni R, et al. Toll like receptor signaling in «inflammaging»: microRNA as new players. *Immun Ageing A*. 2013;10(1):11.
 187. Thomas Francis, Jr. On the Doctrine of Original Antigenic Sin. *Proc Am Philos Soc*. 1960;104(6):572-8.
 188. Smith DJ, Forrest S, Ackley DH, Perelson AS. Variable efficacy of repeated annual influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):14001-6.
 189. Hoskins TW, Davies JR, Smith AJ, Miller CL, Allchin A. Assessment of inactivated influenza-A vaccine after three outbreaks of influenza A at Christ's Hospital. *Lancet*. 1979;1(8106):33-5.
 190. Keitel WA, Cate TR, Couch RB, Huggins LL, Hess KR. Efficacy of repeated annual immunization with inactivated influenza virus vaccines over a five year period. *Vaccine*. 1997;15(10):1114-22.
 191. Wikramaratna PS, Rambaut A. Relationship between haemagglutination inhibition titre and immunity to influenza in ferrets. *Vaccine*. 2015;33(41):5380-5.
 192. Fox JP, Cooney MK, Hall CE, Foy HM. Influenzavirus infections in Seattle families, 1975-1979. II. Pattern of infection in invaded households and relation of age and prior antibody to occurrence of infection and related illness. *Am J Epidemiol*. 1982;116(2):228-42.
 193. Ng S, Fang VJ, Ip DKM, Chan K-H, Leung GM, Peiris JSM, et al. Estimation of the association between antibody titers and protection against confirmed influenza virus infection in children. *J Infect Dis*. 2013;208(8):1320-4.



194. Chen Y, Zheng Q, Yang K, Zeng F, Lau S-Y, Wu WL, et al. Serological survey of antibodies to influenza A viruses in a group of people without a history of influenza vaccination. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(9):1347-9.
195. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2003-2004 [Internet]. [citado 21 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20032004/InformesAnuales/Informe%20temporada%202003-04.pdf>
196. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2004-2005 [Internet]. [citado 21 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20042005/InformesAnuales/gripe0405.pdf>
197. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2005-2006 [Internet]. [citado 21 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20052006/InformesAnuales/Gripe0506.pdf>
198. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2006-2007 [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/inicio.do>
199. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2007-2008 [Internet]. [citado 21 de octubre de 2015]. Disponible en: http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20072008/InformesAnuales/Informe%20temporada_Vigilancia%20de%20la%20Gripe%20en%20Espa%C3%B1a.%202007-2008.pdf
200. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2008-2009 [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/inicio.do>
201. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2009-2010 [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/inicio.do>
202. Perez DR, Sorrell E, Angel M, Ye J, Hickman D, Pena L, et al. Fitness of Pandemic H1N1 and Seasonal influenza A viruses during Co-infection. *PLoS Curr.* 2009;1.
203. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2010-2011 [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe/inicio.do>
204. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2012-2013 [Internet]. [citado 29 de octubre de 2015]. Disponible en: http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20122013/InformesAnuales/Informe_Vigilancia_GRIPE_2012-13_18sep2013.pdf
205. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de la Gripe en España. Sistema centinela. Temporada 2011-2012 [Internet]. Disponible en: http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20112012/InformesAnuales/Informe_GRIPE_Temporada_2011-12_v.3septiembre2012.pdf
206. Biere B, Bauer B, Schweiger B. Differentiation of Influenza B Virus Lineages Yamagata and Victoria by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* abril de 2010;48(4):1425-7.

207. Chen H, Wang Y, Liu W, Zhang J, Dong B, Fan X, et al. Serologic survey of pandemic (H1N1) 2009 virus, Guangxi Province, China. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(11):1849-50.
208. Chi CY, Liu CC, Lin CC, Wang HC, Cheng YT, Chang CM, et al. Preexisting antibody response against 2009 pandemic influenza H1N1 viruses in the Taiwanese population. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(12):1958-62.
209. Lemaitre M, Leruez-Ville M, De Lamballerie XN, Salez N, Garrone P, Fluckiger A-C, et al. Seasonal H1N1 2007 influenza virus infection is associated with elevated pre-exposure antibody titers to the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(5):732-7.
210. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med.* 2009;361(20):1945-52.
211. Laurie KL, Carolan LA, Middleton D, Lowther S, Kelso A, Barr IG. Multiple Infections with Seasonal Influenza A Virus Induce Cross-Protective Immunity against A(H1N1) Pandemic Influenza Virus in a Ferret Model. *J Infect Dis.* 2010;202(7):1011-20.
212. Miller E, Hoschler K, Hardelid P, Stanford E, Andrews N, Zambon M. Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet.* 2010;375(9720):1100-8.
213. Skowronski DM, Hottes TS, McElhaney JE, Janjua NZ, Sabaiduc S, Chan T, et al. Immunologic Correlates of Pandemic H1N1 Surveillance Observations: Higher Antibody and Lower Cell-Mediated Immune Responses with Advanced Age. *J Infect Dis.* 2011;203(2):158-67.
214. Landolt GA, Karasin AI, Schutten MM, Olsen CW. Restricted Infectivity of a Human-Lineage H3N2 Influenza A Virus in Pigs Is Hemagglutinin and Neuraminidase Gene Dependent. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):297-301.
215. Oh DY, Barr IG, Mosse JA, Laurie KL. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2189-94.
216. Thompson CI, Barclay WS, Zambon MC. Changes in in vitro susceptibility of influenza A H3N2 viruses to a neuraminidase inhibitor drug during evolution in the human host. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(5):759-65.
217. Ito T, Suzuki Y, Mitnaul L, Vines A, Kida H, Kawaoka Y. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology.* 1997;227(2):493-9.
218. Oxford JS, Corcoran T, Knott R, Bates J, Bartolomei O, Major D, et al. Serological studies with influenza A(H1N1) viruses cultivated in eggs or in a canine kidney cell line (MDCK). *Bull World Health Organ.* 1987;65(2):181-7.
219. Van Valen L. A new evolutionary law. *Evol Theory.* 1973;1:1-30.
220. Suarez D. L. Evolution of avian influenza viruses. *Vet Microbiol.* 2000;74:1-27.



221. Ludwig S, Haustein A, Kaleta EF, Scholtissek C. Recent influenza A (H1N1) infections of pigs and turkeys in northern Europe. *Virology*. 1994;202(1):281-6.
222. Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, Webster RG. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol*. 1991;65(7):3704-14.
223. Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Webster RG. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol*. 1990;64(4):1487-97.
224. Bedford T, Suchard MA, Lemey P, Dudas G, Gregory V, Hay AJ, et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *eLife*. 2014;3:e01914.
225. Skowronski DM, Chambers C, Sabaiduc S, De Serres G, Dickinson JA, Winter AL, et al. Interim estimates of 2014/15 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance Network, January 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(4).
226. Atmar RL, Keitel WA. Adjuvants for pandemic influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;333:323-44.
227. Mannino S, Villa M, Apolone G, Weiss NS, Groth N, Aquino I, et al. Effectiveness of adjuvanted influenza vaccination in elderly subjects in northern Italy. *Am J Epidemiol*. 2012;176(6):527-33.
228. Even-Or O, Samira S, Ellis R, Kedar E, Barenholz Y. Adjuvanted influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(9):1095-108.
229. Epstein SL, Price GE. Cross-protective immunity to influenza A viruses. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(11):1325-41.
230. Palese P, García-Sastre A. Influenza vaccines: present and future. *J Clin Invest*. 2002;110(1):9-13.
231. Camilloni B, Neri M, Lepri E, Iorio AM. Cross-reactive antibodies in middle-aged and elderly volunteers after MF59-adjuvanted subunit trivalent influenza vaccine against B viruses of the B/Victoria or B/Yamagata lineages. *Vaccine*. 2009;27(31):4099-103.
232. Van de Sandt CE, Dou Y, Vogelzang-van Trierum SE, Westgeest KB, Pronk MR, Osterhaus ADME, et al. Influenza B virus-specific CD8+ T-lymphocytes strongly cross-react with viruses of the opposing influenza B lineage. *J Gen Virol*. 2015;96(8):2061-73.
233. Levandowski RA, Gross PA, Weksler M, Staton E, Williams MS, Bonelli J. Cross-reactive antibodies induced by a monovalent influenza B virus vaccine. *J Clin Microbiol*. 1991;29(7):1530-2.
234. Eiros-Bouza JM, Pérez-Rubio A. Burden of influenza virus type B and mismatch with the flu vaccine in Spain. *Rev Esp Quimioter*. 2015;28(1):39-46.
235. Ambrose CS, Levin MJ. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Hum Vaccines Immunother*. 2012;8(1):81-8.

236. Ortiz de Lejarazu R, Tamames S. Influenza vaccination. Effectiveness of current vaccines and future challenges. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(7):480-90.
237. Quadrivalent Influenza Vaccine | Seasonal Influenza (Flu) | CDC [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/quadrivalent.htm>
238. Belshe RB. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine*. 2010;28 Suppl 4:45-53.
239. Barr IG, Jelley LL. The coming era of quadrivalent human influenza vaccines: who will benefit? *Drugs*. 2012;72(17):2177-85.
240. Karve S, Meier G, Davis KL, Misurski DA, Wang C-CE. Influenza-related health care utilization and productivity losses during seasons with and without a match between the seasonal and vaccine virus B lineage. *Vaccine*. 2013;31(33):3370-88.
241. FDA. Guidance for Industry: Clinical Data Needed to Support the Licensure of Seasonal Inactivated Influenza Vaccines [Internet]. 2007 [citado 24 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.
242. Plans-Rubió P. The vaccination coverage required to establish herd immunity against influenza viruses. *Prev Med*. 2012;55(1):72-7.
243. Mooring EQ, Bansal S. Increasing herd immunity with influenza revaccination. *Epidemiol Infect*. 2016;144(6):1267-77.
244. Nerome R, Hiromoto Y, Sugita S, Tanabe N, Ishida M, Matsumoto M, et al. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. *Arch Virol*. 1998;143(8):1569-83.
245. Tramuto F, Orsi A, Maida CM, Costantino C, Trucchi C, Alicino C, et al. The Molecular Epidemiology and Evolutionary Dynamics of Influenza B Virus in Two Italian Regions during 2010–2015: The Experience of Sicily and Liguria. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4).
246. Heikkinen T, Ikonen N, Ziegler T. Impact of influenza B lineage-level mismatch between trivalent seasonal influenza vaccines and circulating viruses, 1999-2012. *Clin Infect Dis*. 2014;59(11):1519-24.
247. Beyer WEP, Palache AM, Lüchters G, Nauta J, Osterhaus ADME. Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? *Virus Res*. 2004;103(1-2):125-32.
248. Kanegae Y, Sugita S, Endo A, Ishida M, Senya S, Osako K, et al. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J Virol*. junio de 1990;64(6):2860-5.
249. Haaheim LR. Original antigenic sin. A confounding issue? *Dev Biol*. 2003;115:49-53.
250. Kim JH, Skountzou I, Compans R, Jacob J. Original antigenic sin responses to influenza viruses. *J Immunol*. 2009;183(5):3294-301.



251. Kim JH, Davis WG, Sambhara S, Jacob J. Strategies to alleviate original antigenic sin responses to influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(34):13751-6.
252. Davenport FM, Hennessy AV, Francis T. Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus. *J Exp Med.* 1953;98(6):641-56.
253. Morens DM, Burke DS, Halstead SB. The Wages of Original Antigenic Sin. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):1023-4.
254. Iorio AM, Camilloni B, Basileo M, Neri M, Lepri E, Spighi M. Effects of repeated annual influenza vaccination on antibody responses against unchanged vaccine antigens in elderly frail institutionalized volunteers. *Gerontology.* 2007;53(6):411-8.
255. Klein SL, Pekosz A. Sex-based biology and the rational design of influenza vaccination strategies. *J Infect Dis.* 2014;209 Suppl 3:S114-119.
256. Flanagan KL, Klein SL, Skakkebaek NE, Marriott I, Marchant A, Selin L, et al. Sex differences in the vaccine-specific and non-targeted effects of vaccines. *Vaccine.* 2011;29(13):2349-54.
257. Furman D, Hejblum BP, Simon N, Jojic V, Dekker CL, Thiébaud R, et al. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(2):869-74.
258. McElhaney JE, Coler RN, Baldwin SL. Immunologic correlates of protection and potential role for adjuvants to improve influenza vaccines in older adults. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(7):759-66.
259. Hannoun C, Megas F, Piercy J. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination. *Virus Res.* 2004;103(1-2):133-8.
260. Durando P, Icardi G, Ansaldi F. MF59-adjuvanted vaccine: a safe and useful tool to enhance and broaden protection against seasonal influenza viruses in subjects at risk. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(4):639-51.
261. Van Buynder PG, Konrad S, Van Buynder JL, Brodtkin E, Kraiden M, Ramler G, et al. The comparative effectiveness of adjuvanted and unadjuvanted trivalent inactivated influenza vaccine (TIV) in the elderly. *Vaccine.* 9 de diciembre de 2013;31(51):6122-8.
262. Zhu L, Li Y, Li S, Li H, Qiu Z, Lee C, et al. Inhibition of Influenza A Virus (H1N1) Fusion by Benzenesulfonamide Derivatives Targeting Viral Hemagglutinin. *PLoS One.* 2011;6(12).
263. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK. Characterization of the 1918 «Spanish» influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(12):6785-90.
264. Dou Y, Fu B, Sun R, Li W, Hu W, Tian Z, et al. Influenza vaccine induces intracellular immune memory of human NK cells. *PloS One.* 2015;10(3):e0121258.
265. Bonduelle O, Carrat F, Luyt C-E, Leport C, Mosnier A, Benhabiles N, et al. Characterization of pandemic influenza immune memory signature after vaccination or infection. *J Clin Invest.* 2014;124(7):3129-36.

266. Ortiz de Lejarazu, R., Landínez, R. Importancia epidemiológica de la nueva variante de virus gripal A/USSR/90/77. *Laboratorio*. 1978;66(394):339-50.
267. Rasmussen AF, Stokes JC, Smadel JE. The Army experience with influenza, 1946-1947; laboratory aspects. *Am J Hyg*. 1948;47(2):142-9.
268. Kilbourne ED, Loge JP. Influenza A prime: a clinical study of an epidemic caused by a new strain of virus. *Ann Intern Med*. 1950;33(2):371-9.
269. Davenport FM, Hennessy AV. A serologic recapitulation of past experiences with influenza A; antibody response to monovalent vaccine. *J Exp Med*. 1956;104(1):85-97.
270. Schild GC, Oxford JS, de Jong JC, Webster RG. Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature*. 1983;303(5919):706-9.
271. Skountzou I, Koutsonanos DG, Kim JH, Powers R, Satyabhama L, Masseoud F, et al. Immunity to pre-1950 H1N1 influenza viruses confers cross-protection against the pandemic swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus. *J Immunol*. 2010;185(3):1642-9.
272. Huang SSH, Lin Z, Banner D, León AJ, Paquette SG, Rubin B, et al. Immunity toward H1N1 influenza hemagglutinin of historical and contemporary strains suggests protection and vaccine failure. *Sci Rep*. 2013;3:1698.
273. Feery BJ, Evered MG, Hayes K. Homologous and heterologous antibody responses to subunit influenza virus vaccine. *J Hyg*. 1978;81(3):331-6.
274. Gioia C, Agrati C, Castilletti C, Capobianchi MR, Martini F. Influenza Pandemics, Immune Cross-Reactivity, and Pandemic Control Strategies. *J Infect Dis*. 2008;198(2):294-5.
275. DiMenna LJ, Ertl HCJ. Pandemic influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;333:291-321.
276. Chit A, Roiz J, Briquet B, Greenberg DP. Expected cost effectiveness of high-dose trivalent influenza vaccine in US seniors. *Vaccine*. 2015;33(5):734-41.
277. Li FCK, Choi BCK, Sly T, Pak AWP. Finding the real case-fatality rate of H5N1 avian influenza. *J Epidemiol Community Health*. 2008;62(6):555-9.
278. Poovorawan Y, Pyungporn S, Prachayangprecha S, Makkoch J. Global alert to avian influenza virus infection: From H5N1 to H7N9. *Pathog Glob Health*. 2013;107(5):217-23.
279. Causey D, Edwards SV. Ecology of avian influenza virus in birds. *J Infect Dis*. 2008;197 Suppl 1:S29-33.
280. Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature*. 2003;422(6930):428-33.
281. Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol Lett*. 2006;9(4):467-84.
282. Dowell SF. Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):369-74.



283. Nelson RJ, Demas GE. Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol.* 1996;71(4):511-48.
284. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* 2003;24(8):444-8.
285. Gilbert M, Xiao X, Domenech J, Lubroth J, Martin V, Slingenbergh J. Anatidae migration in the western Palearctic and spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1650-6.
286. Tian H, Zhou S, Dong L, Van Boeckel TP, Cui Y, Newman SH, et al. Avian influenza H5N1 viral and bird migration networks in Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(1):172-7.
287. FDA. FDA Approves First U.S. Vaccine for Humans Against the Avian Influenza Virus H5N1 [Internet]. 2007 [citado 22 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108892.htm>
288. Air GM. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7639-43.
289. Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology.* 1991;182(2):475-85.
290. Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. *J Biol Chem.* 2010;285(37):28403-9.
291. Ellebedy AH, Ahmed R. Re-Engaging Cross-Reactive Memory B Cells: The Influenza Puzzle. *Front Immunol.* 2012;3:53.
292. Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, et al. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(46):17736-41.
293. Pérez-Ramírez E, Gerrikagoitia X, Barral M, Höfle U. Detection of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds in Castilla-La Mancha (south central Spain). *Vet Microbiol.* 2010;146(3-4):200-8.
294. Iglesias I, Perez AM, Sánchez-Vizcaíno JM, Muñoz MJ, Martínez M, de la Torre A. Reproductive ratio for the local spread of highly pathogenic avian influenza in wild bird populations of Europe, 2005-2008. *Epidemiol Infect.* 2011;139(1):99-104.
295. Iglesias I, Martínez M, Muñoz MJ, de la Torre A, Sánchez-Vizcaíno JM. First case of highly pathogenic avian influenza in poultry in Spain. *Transbound Emerg Dis.* 2010;57(4):282-5.
296. Hesterberg U, Harris K, Stroud D, Guberti V, Busani L, Pittman M, et al. Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006. *Influenza Other Respir Viruses.* 2009;3(1):1-14.

297. Martínez M, Muñoz MJ, De la Torre A, Martínez B, Iglesias I, Sánchez-Vizcaíno JM. Risk assessment applied to Spain's prevention strategy against highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Avian Dis.* 2007;51(1 Suppl):507-11.
298. Si Y, de Boer WF, Gong P. Different Environmental Drivers of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Outbreaks in Poultry and Wild Birds. *PLoS ONE* [Internet]. 7 de enero de 2013 [citado 7 de octubre de 2015];8(1). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3538778/>
299. Huang SY, Yang JR, Lin YJ, Yang CH, Cheng MC, Liu MT, et al. Serological comparison of antibodies to avian influenza viruses, subtypes H5N2, H6N1, H7N3 and H7N9 between poultry workers and non-poultry workers in Taiwan in 2012. *Epidemiol Infect.* 2015;143(14):2965-74.
300. Dung TC, Dinh PN, Nam VS, Tan LM, Hang NLK, Thanh LT, et al. Seroprevalence survey of avian influenza A(H5N1) among live poultry market workers in northern Viet Nam, 2011. *Western Pac Surveill Response J.* 2014;5(4):21-6.
301. Gomaa MR, Kayed AS, Elabd MA, Zeid DA, Zaki SA, El Rifay AS, et al. Avian influenza A(H5N1) and A(H9N2) seroprevalence and risk factors for infection among Egyptians: a prospective, controlled seroepidemiological study. *J Infect Dis.* 2015;211(9):1399-407.
302. Wang X, Fang S, Lu X, Xu C, Cowling BJ, Tang X, et al. Seroprevalence to avian influenza A(H7N9) virus among poultry workers and the general population in southern China: a longitudinal study. *Clin Infect Dis.* 2014;59(6):e76-83.
303. Okoye JO, Eze DC, Krueger WS, Heil GL, White SK, Merrill HR, et al. Evidence for subclinical H5N1 avian influenza infections among Nigerian poultry workers. *J Med Virol.* 2014;86(12):2070-5.
304. Zhou P, Zhu W, Gu H, Fu X, Wang L, Zheng Y, et al. Avian influenza H9N2 seroprevalence among swine farm residents in China. *J Med Virol.* 2014;86(4):597-600.
305. Heidari A, Mancin M, Nili H, Pourghanbari GH, Lankarani KB, Leardini S, et al. Serological evidence of H9N2 avian influenza virus exposure among poultry workers from Fars province of Iran. *Virol J.* 2016;13:16.
306. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(8):590-603.
307. Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen L, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(3):265-73.
308. Stephenson I, Bugarini R, Nicholson KG, Podda A, Wood JM, Zambon MC, et al. Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *J Infect Dis.* 2005;191(8):1210-5.
309. Forrest HL, Khalenkov AM, Govorkova EA, Kim J-K, Giudice GD, Webster RG. Single- and multiple-clade influenza A H5N1 vaccines induce cross protection in ferrets. *Vaccine.* 2009;27(31):4187-95.



310. Nachbagauer R, Choi A, Izikson R, Cox MM, Palese P, Krammer F. Age Dependence and Isotype Specificity of Influenza Virus Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies in Humans. *mBio*. 2016;7(1).
311. Milanovic M, Stojanovich L, Djokovic A, Kontic M, Gvozdenovic E. Influenza vaccination in autoimmune rheumatic disease patients. *Tohoku J Exp Med*. 2013;229(1):29-34.
312. Touma Z, Gladman DD, Urowitz MB. Vaccination and auto-immune rheumatic diseases: lessons learnt from the 2009 H1N1 influenza virus vaccination campaign. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(2):164-70.
313. Westra J, Rondaan C, van Assen S, Bijl M. Vaccination of patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(3):135-45.
314. Voskuhl R. Sex differences in autoimmune diseases. *Biol Sex Differ*. 2011;2:1.
315. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(3):347-69.
316. Oliver JE, Silman AJ. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):252.
317. Etzioni A. Immune deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2003;2(6):364-9.
318. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2011;365(17):1612-23.
319. Goris A, Liston A. The immunogenetic architecture of autoimmune disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(3).
320. Sleasman JW. The association between immunodeficiency and the development of autoimmune disease. *Adv Dent Res*. 1996;10(1):57-61.
321. Arkwright PD, Abinun M, Cant AJ. Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases. *Blood*. 2002;99(8):2694-702.
322. Zbinden D, Manuel O. Influenza vaccination in immunocompromised patients: efficacy and safety. *Immunotherapy*. 2014;6(2):131-9.
323. Maltezou HC, Katerelos P, Mavrouli M, Lourida A, Routsias JG, Spanakis N, et al. Seroepidemiological study of pandemic influenza H1N1 following the 2009-2010 wave in Greece. *Vaccine*. 2 de septiembre de 2011;29(38):6664-9.
324. CDC. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58(19):521-4.
325. Ikonen N, Strengell M, Kinnunen L, Osterlund P, Pirhonen J, Broman M, et al. High frequency of cross-reacting antibodies against 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus among the elderly in Finland. *Euro Surveill*. 2010;15(5).

326. Ariza-Mejía MC, García-García L, González-Escalada A, Álvaro-Meca A, Gil-de-Miguel Á, Gil-Prieto R. Epidemiology of gonorrhoea-related hospitalisations in Spain between 1997 and 2006. *Sex Reprod Healthc.* junio de 2012;3(2):89-92.
327. CDC. Prevention and Control of Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2015–16 Influenza Season [Internet]. 2015 [citado 15 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6430a3.htm>