



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**RESPUESTA HUMORAL ESPECÍFICA Y EFICACIA
SEROLÓGICA DE LA VACUNA FRENTE A VIRUS DE
LA GRIPE A (H1N1)**

Presentada por:

JOSE MANUEL MÉNDEZ LEGAZA

para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

**Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo e Iván Sanz
Muñoz**

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. Iván Sanz Muñoz, Licenciado en Biología y Doctor en Medicina, Responsable del Centro Nacional de Gripe de Valladolid. Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y área de Microbiología de la Facultad de Medicina.

CERTIFICAN QUE:

D. Jose Manuel Méndez Legaza ha realizado bajo su dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

**“RESPUESTA HUMORAL ESPECÍFICA Y EFICACIA SEROLÓGICA DE LA VACUNA FRENTE
A VIRUS DE LA GRIPE A (H1N1)”**

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 Junio de 2019.

Fdo. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo

Fdo. Iván Sanz Muñoz

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría empezar mencionando a mis directores, el Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo y el Dr. Iván Sanz Muñoz. Agradecerles profundamente el tesón, la paciencia, la ilusión y el ánimo que me han transmitido desde que iniciamos este proyecto de investigación. A parte de su sabiduría, tienen un don para saber enseñar y fomentar ese interés investigador y científico. Gracias a ambos por guiarme, inspirarme y mostrarme el camino correcto.

Dentro del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico, son tantas las personas a las me gustaría agradecerles que se hayan interesado porque me fuera bien en este proyecto que no puedo mencionar a todas. No obstante, me gustaría hacer una mención especial tal y como se merecen a mis compañeros Irene, Mario, Silvia y Begoña por estar ahí siempre que lo necesitaba. Siempre estaré en deuda con vosotros. No menos merecido mi agradecimiento a mi “segunda madre” Rosa en estos años difíciles, a Ana Montoya, y como no, gracias a Rocío por ese enorme aguante y grata convivencia que me has dedicado durante las largas tardes de experimentación en el laboratorio. No sabes cómo te lo agradezco. No puedo dejar sin mencionar a la Dra. Mari Fe Muñoz por su ayuda con la estadística.

La vida es un camino lleno de obstáculos, pero si te rodeas de la mejor compañía puede ser una gran aventura. Estos últimos años no niego que hayan sido difíciles, pero se han llevado siempre con el mejor de los ánimos gracias a mis fieles compañer@s Cristina, Rebeca, Raquel, Pilar, Belén y Javito. Vosotr@s habéis sabido sacar lo mejor de mí y lo más importante, sé que habéis estado y estaréis siempre ahí.

Muchas gracias a mis padres Pepe y Paqui, y a mi hermana Marta, que siempre me animaron a estudiar, que me dieron la libertad de elegir y me han apoyado en cada uno de mis objetivos. Muchas gracias a mi fiel compañero Guille, que has sabido llevado llevarme y me has aguantado tanto en los buenos y malos momentos. Muchas gracias a mis tías y abuelos, en especial a mi abuela Paquita por su apoyo desde el inicio en mi última y nueva etapa. Espero que os sintáis tan orgullosos de esto como yo porque ha sido un esfuerzo común el que ha hecho posible esta tesis. Sin vosotros no hubiese sido posible.

He de reconocer que, a pesar de haber requerido mucho esfuerzo y tiempo, ha tenido gran contribución el haber estado rodeado de personas maravillosas, emprendedoras y con ganas de seguir hacia delante. Por todo ello, mi enorme agradecimiento a todos y todas los que en algún momento de esta trayectoria me habéis dado vuestro apoyo.

Gracias a todos y todas por ayudarme a convertirme en quién soy ahora.

“Ognuno di noi ha un paio di ali ma solo chi sogna impara a volare”.

James Douglas Morrison.

Índice

ÍNDICE	9
ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	19
Características de los virus de la gripe	21
Evolución histórica de los virus de la gripe A	27
Evolución histórica de los virus de la gripe A(H1N1)	29
Epidemiología de los virus de la gripe	34
Respuesta inmune frente a los virus de la gripe	35
Importancia de la respuesta humoral mediada por Anticuerpos inhibidores de Neuraminidasa (Acs anti-NA)	37
Pecado original antigénico	38
Vacunación frente a la gripe y tipos de vacunas	39
Importancia de la Neuraminidasa (NA) como antígeno vacunal	46
Efectividad y eficacia de las vacunas antigripales	48
Técnicas serológicas para evaluar la eficacia vacunal	49
Análisis y parámetros de la eficacia vacunal	52
Sistema de Vigilancia de la Gripe en España (SVGE)	54
Interés del proyecto	56
OBJETIVOS	59
MATERIAL Y MÉTODOS	63
Diseño del estudio	65
Material	65
Procedencia de las muestras	65

Población del estudio _____	66
Recogida y almacenamiento de muestras _____	67
Recogida de datos demográficos _____	67
Vacunas administradas a la población de estudio _____	68
Cepas gripales A(H1N1) utilizadas en el estudio _____	70
Métodos _____	71
Propagación de virus en cultivo en embrión de pollo _____	71
Análisis filogenético de los cepas gripales A(H1N1) incluidas en el estudio __	74
Análisis serológicos para evaluar la presencia de anticuerpos frente a la gripe y de la respuesta humoral a las vacunas estacionales. Ensayo ELLA y RIH ____	77
Análisis de los resultados _____	99
RESULTADOS _____	103
Características demográficas de la población _____	105
Análisis de la respuesta mediada por Acs anti-NA _____	112
Análisis de Acs anti-NA previos a la vacunación _____	112
Análisis de Acs anti-NA tras la vacunación _____	125
Análisis filogenético del gen de la Neuraminidasa(N1) de las cepas gripales_	152
Análisis de la respuesta mediada por Acs anti-HA _____	156
Análisis de Acs anti-HA previos a la vacunación _____	156
Análisis de Acs anti-HA tras la vacunación _____	165
Análisis filogenético del gen de la Hemaglutinina(H1) de las cepas gripales _	188
Análisis comparativo de la respuesta mediada por Acs anti-NA y Acs anti-HA __	192
Análisis comparativo entre los Acs pre-vacunales anti-NA y anti-HA _____	192

Análisis comparativo entre los Acs post-vacunales anti-NA y anti-HA _____	207
DISCUSIÓN _____	213
Ámbito poblacional del estudio _____	217
Estudio de la respuesta serológica mediada por Acs anti-NA _____	219
Estudio de Acs anti-NA previos a la vacunación _____	219
Estudio de Acs anti-NA tras la vacunación _____	226
Estudio de la respuesta serológica mediada por Acs anti-HA _____	239
Estudio de Acs anti-HA previos a la vacunación _____	239
Estudio de Acs anti-HA tras la vacunación _____	244
Estudio comparativo de la respuesta mediada por Acs anti-NA y Acs anti-HA _	253
Limitaciones del estudio _____	260
CONCLUSIONES _____	265
RENDIMIENTO CIENTÍFICO _____	271
ANEXOS _____	293
BIBLIOGRAFÍA _____	297

Abreviaturas

Abreviaturas

Acs Anticuerpos

Acs anti-HA Anticuerpos inhibidores de hemaglutinina

Acs anti-NA Anticuerpos inhibidores de neuraminidasa

CDC Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

CPMP Comité de especialidades farmacéuticas

DE Desviación estándar

ELLA Ensayo enzimático ligado a lectina (*Enzyme-Linked Lectin Assay*)

EMA Agencia Europea del Medicamento

GISRS *Global Influenza Surveillance and Response System*

HA Hemaglutinina

HAI Anticuerpos inhibidores de hemaglutinina

IgA Inmunoglobulinas de tipo IgA

IgG Inmunoglobulinas de tipo IgG

LAIV Vacunas con virus vivos atenuados de la gripe

LAL Líquido alantoideo

LAM Líquido amniótico

MGT Media geométrica de los títulos de anticuerpos

- NA** Neuraminidasa
- NAI** Anticuerpos inhibidores de neuraminidasa
- NDEV** Número de días entre la administración de la vacuna y la extracción del suero post-vacunal
- NGIV** Nueva generación de vacunas (*Next Generation Influenza Vaccines*)
- NIC** Centro Nacional de Gripe (*National Influenza Centre*)
- OMS** Organización Mundial de la Salud
- OPS** Organización Panamericana de la Salud
- PBS** Buffer salino fosfato
- PNT** Protocolo Normalizado de Trabajo
- 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
- TIV** Vacunas inactivadas trivalentes
- TPV** Tasa de seroprotección conferida por la vacuna
- TS o TSP** Tasa de seroprotección
- TSC** Tasa de seroconversión
- χ^2** Chi-cuadrado de Pearson

Introducción

Introducción

Características de los virus de la gripe

Los virus gripales se incluyen en la familia *Orthomixoviridae*, que en la actualidad agrupa cinco géneros (1). Estos cinco géneros comprenden: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Isavirus* y *Thogotovirus*. Son virus con ARN monocatenario, de tamaño medio y provistos de una envoltura que adopta una forma esférica o filamentosa. Sólo los tres primeros géneros anteriormente citados son causantes de la gripe. El cuarto género está integrado por los *Isavirus*, de interés veterinario. El quinto género, de descripción más reciente, se ha denominado “virus Togoto”, con un interés reducido en el ámbito clínico.

Los virus de la gripe de los tipos B y C (*Influenzavirus B* e y C) tienen como reservorio exclusivamente el ser humano, habiéndose registrado casos esporádicos por transmisión del hombre a ciertos animales como las focas, perros y cerdos (2–4). Sin embargo, los virus de la gripe A circulan entre un amplio rango de hospedadores salvajes, la mayoría de ellos aves y algunos mamíferos, además del hombre (5). Los virus gripales de tipo A y B constituyen los géneros más importantes. El virus gripal de tipo C constituye un género de escaso interés en patología humana y difiere en determinadas características estructurales y biológicas de los dos géneros anteriores.

Principales características de los virus gripales A y B

Los virus presentan un diámetro entre los 20 y los 80 nanómetros con una forma esférica o a veces filamentosa (6). Su material genético es ARN monocatenario de polaridad negativa. El genoma de los virus gripales no está formado por un único fragmento de ácido nucleico, sino que en el interior de este virión existen ocho segmentos génicos diferenciados que codifican diez proteínas distintas (7). Entre ellas se encuentran: la nucleoproteína viral (NP), las dos glucoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), tres polimerasas virales RNA dependientes (PB1, PB2 y PA), las proteínas de matriz (M1 y M2) y dos proteínas virales denominadas

no estructurales (NS1 y NS2) aunque la NS2 se encuentra representada con pocas moléculas en la partícula vírica. En la **figura 1** se muestra la estructura modelo de un virus de la gripe.

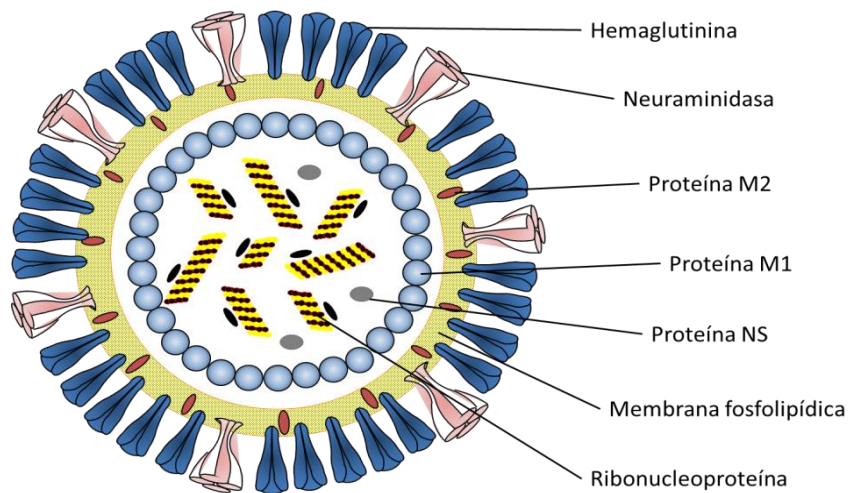


Figura 1. Estructura de un virus de la gripe A. Fuente: Ortiz de Lejarazu R. *et al.* *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(7):480-490 (8).

En el interior del virión se encuentra la nucleocápside formada por los ocho fragmentos de ARN monocatenario, la NP y el complejo ARN-polimerasa (9). En el exterior de la nucleocápside y por debajo de la membrana de envoltura se sitúa la proteína matriz M1 que confiere estabilidad a la partícula vírica. Los distintos tipos de virus de la gripe tienen proteínas matriz y NP antigénicamente diferentes (10). La nomenclatura de las cepas de virus de la gripe tiene en cuenta el tipo (A, B y C), seguido del lugar de aislamiento, número de referencia del laboratorio, año, y en el caso de virus del tipo A, el tipo de HA y NA que posee (ej: A/California/07/2009 (H1N1pdm), en este caso se añade la acotación “pdm” para diferenciarla de los subtipos clásicos anteriores a éste). La envoltura de virus de la gripe A presenta proyecciones superficiales de glucoproteínas HA y NA. La HA se presenta como un homotrímero compuesto de tres monómeros idénticos (11,12) en forma de espícula, con una cabeza globular que constituye la región HA1 y un tallo (región HA2) (**Figura 2**). Por otra parte, la NA viral se trata de una prolongación que adopta una forma más

achata o con “forma de seta” compuesta por una proteína tetramérica formada por un conjunto de 4 monómeros idénticos (13–16) (**Figura 3**). Tanto en la HA como en la NA, los epítomos antigénicos están situados en la parte más externa de la proteína.

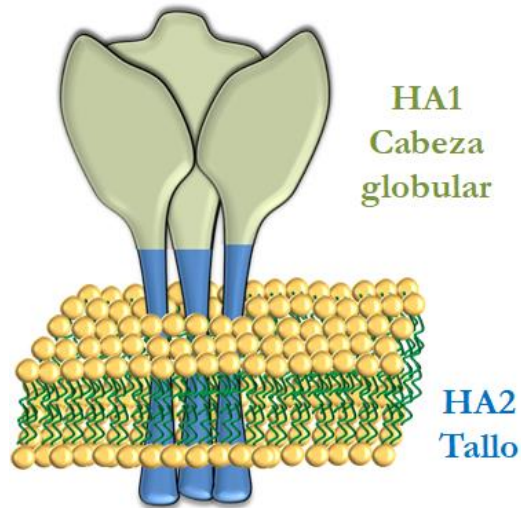


Figura 2. Esquema de la estructura tridimensional de los dominios membrana y transmembrana de la proteína hemaglutinina (HA). Extraído y modificado de: Ortiz de Lejarazu R. *et al. Los virus de la gripe. Pandemias, epidemias y vacunas.* 2019 (17).

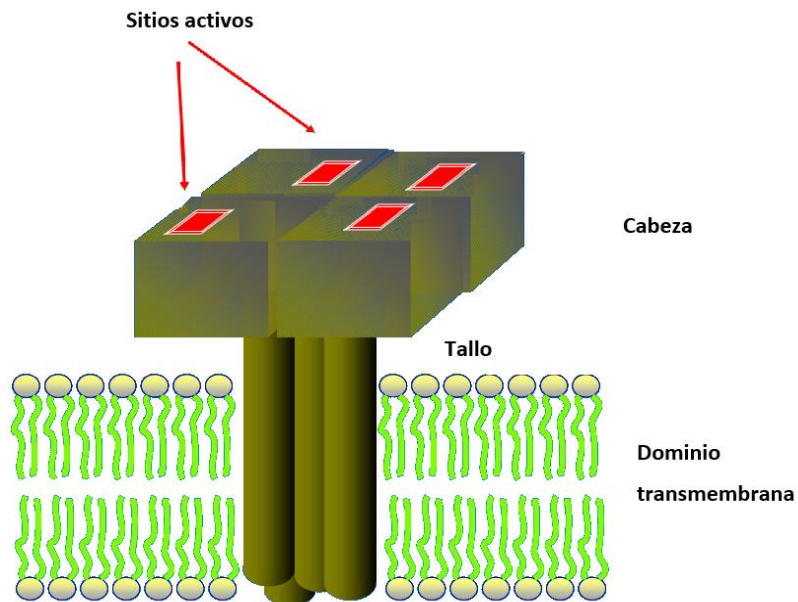


Figura 3. Esquema de la estructura tridimensional de los dominios membrana y transmembrana de la proteína neuraminidasa. Extraído y modificado de: Ortiz de Lejarazu R. *Vacunas de la gripe y vacunación gripal. Perspectivas actuales.* 2006 (18).

La HA es el principal antígeno de los virus de la gripe, constituyendo en torno al 25% de las proteínas víricas (19) y ocupando una situación de inmunodominancia en la partícula vírica, por lo que este componente es uno de los mayores responsables de la respuesta del sistema inmune (20). La función principal de la HA vírica es la fijación del virión a los receptores de ácido siálico de las glucoproteínas de membrana de las células epiteliales del tracto respiratorio. Esto permite el inicio de la infección gripal de las células huésped (5,11,12). 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.

La NA es una proteína homotetramérica que representa el 5% de todas las proteínas del virus (19). La NA es uno de los antígenos principales superficiales del virus de la gripe, aunque su dominancia es algo menor que la de la HA al estar en menor número y relativamente enmascarada por la HA. La función principal de la NA es la liberación del virión de la superficie de las células infectadas. Esto sucede mediante la escisión de los terminales de ácido siálico una vez que se ha formado la progenie de viriones en el interior de la célula huésped (16). No obstante, además de la acción sialidasa de la NA, esta glucoproteína es relevante en diferentes etapas de la infección. En primer lugar, esta proteína es esencial para que el virus pueda llegar a las células del tracto respiratorio, ya que separa los ácidos siálicos de las mucinas de las vías respiratorias para facilitar la entrada del virus gripal a la célula huésped (21,22). En segundo lugar, participa en la fusión de las membranas víricas y celulares (23). En tercer lugar, facilita la salida de los nuevos viriones impidiendo su agregación (23). Además, hay datos que sugieren que la NA amplifica la actividad hemaglutinante de la HA mediante la separación de los residuos de ácido neuramínico terminal de los oligosacáridos que rodean el sitio de unión de los receptores de la HA (24). En definitiva, mediante la acción conjunta de las dos glucoproteínas de superficie, la HA y la NA, el virus de la gripe puede completar su ciclo infeccioso.

Variación antigénica del virus de la gripe A

La variación antigénica del virus de la gripe A ocurre por dos mecanismos que se describen a continuación, la variación antigénica menor o deriva antigénica, y la variación antigénica mayor o salto antigénico.

Una particularidad de los virus de la gripe A es que presentan una gran variabilidad debida fundamentalmente a que las ARN-polimerasas virales tienen poca fidelidad transcriptora y su tasa de introducción de errores al replicar el genoma vírico es elevada (9,10). Además, las ARN-polimerasas de los virus de la gripe no tienen actividad 3'-exonucleasa, por lo que no pueden corregir los errores introducidos (9,10). La acumulación puntual de mutaciones en sus genes puede tener traducción antigénica en ocasiones y la selección de variantes con más *fitness* replicativa en individuos previamente inmunizados hace que se produzca una deriva antigénica con el tiempo y de lugar a las variaciones menores del virus. Esta deriva antigénica (*antigenic drift*) sucede sobre todo en las glucoproteínas de superficie HA y NA (25,26), dando lugar a 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. Estas variaciones menores son las responsables de las epidemias estacionales (27).

Por otra parte, la segmentación del material genético de los virus de la gripe permite la aparición de variantes antigénicas mayores (*antigenic shift*) que suceden por fenómenos de reordenamiento genético en un mismo huésped infectado por virus diferentes. En las variaciones mayores, los cambios antigénicos son consecuencia del reordenamiento de genes de distintos virus de la gripe, especialmente el de la HA, que infectan un único hospedador dando lugar a un subtipo de virus de gripe nuevo frente al cual la población no posee inmunidad protectora en una proporción significativa que no produzca inmunidad de grupo (25,28). Las pandemias gripales ocurren como consecuencia de una variación mayor, con la aparición en un nuevo subtipo de virus gripal A (29,30).

Los virus de la gripe B experimentan deriva antigénica que da lugar a variantes menores e incluso linajes distintos, pero no tienen potencial pandémico ya que el ser

humano es el único hospedador y no existe introducción de genes de virus de gripe B procedentes de otras especies distintas al hombre.

Entre los virus de la gripe A se han descrito hasta 18 subtipos de HA con diferencias antigénicas y genéticas, denominados desde la H1 a la H18, y al menos 11 NA distintas (N1 a N11), tal y como se representa en la **Figura 4** (31). Las HA se pueden agrupar filogenéticamente en dos grupos (1 y 2) en relación con la composición del tallo. El grupo 1 incluye a la H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 y H16. Las hemaglutininas H17 y H18, recientemente descubiertas en virus de gripe que infectan a murciélagos, pertenecen también al grupo 1. El grupo 2 de la HA incluye las restantes.

Por otro parte, las NA conocidas también pueden ser agrupadas en dos grupos (1 y 2). El grupo 1 incluye la N1, N4, N5 y N8. El grupo 2 incluye la N2, N3, N6, N7 y N9. Las neuraminidasas N10 y N11 fueron también recientemente descubiertas en virus de murciélagos y no pertenecen a ninguno de los dos grupos, sino que filogenéticamente forman un grupo separado del resto. Se ha propuesto recientemente que se clasifiquen estas dos últimas dentro un nuevo grupo denominado “*Influenza A-like group 3*” (18).

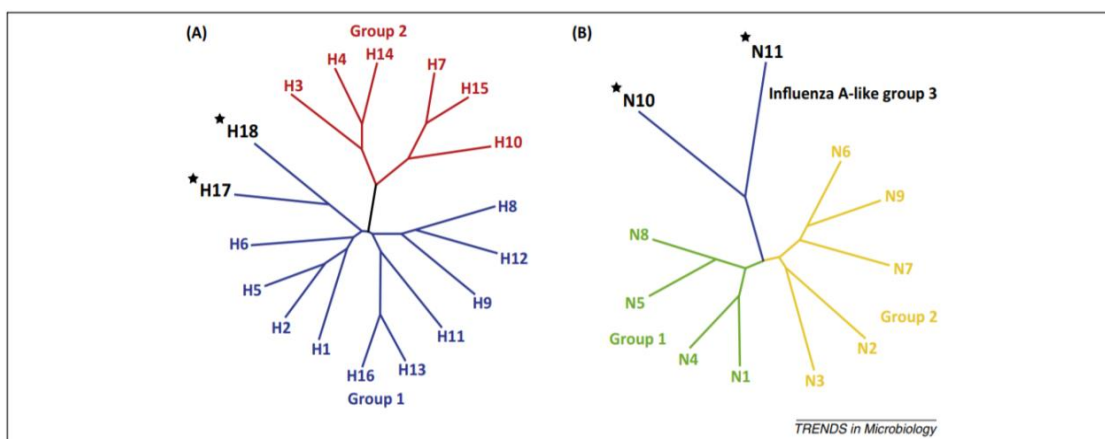


Figura 4. Árboles filogenéticos de los genes hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de todos los subtipos conocidos del virus de la gripe A. Fuente: Wu Y. *et al. Trends Microbiol.* 2014, 22(4):183-91 (31).

Evolución histórica de los virus de la gripe A

Los virus de la gripe A causan epidemias anuales y pandemias mundiales con periodicidad desconocida. Las pandemias son causadas por la aparición de un virus de gripe del tipo A con una configuración de genes nueva, frente al cual la especie humana no posee inmunidad protectora. Los responsables de la aparición de estos nuevos virus son, por un lado, el salto de barrera de especie que permite la transmisión de virus de gripe entre diferentes especies animales fundamentalmente aves y cerdos, además del hombre, y por otro lado, el reordenamiento de sus genes dando lugar a una nueva progenie viral.

Desde el descubrimiento de los virus de la gripe A en 1933 (32), sólo cuatro subtipos (H1N1, H2N2, H3N2 y H1N1pdm09) han tenido una circulación sostenida y continua en la población humana, durante periodos largos de tiempo, ocasionando pandemias que coincidían con su emergencia en 1918, 1957, 1968 y 2009 respectivamente (**Figura 5**). Tras su aparición como pandemia, a continuación estos virus pasan a formar parte de las gripes estacionales. Las pandemias tienen características comunes: aparición de un nuevo virus gripal del tipo A (en lo que corresponde a los antígenos HA, NA o ambos) que sustituye generalmente al subtipo anterior; existencia de una población mundial sin inmunidad protectora suficiente; y capacidad de transmisión interhumana sostenida y continua.

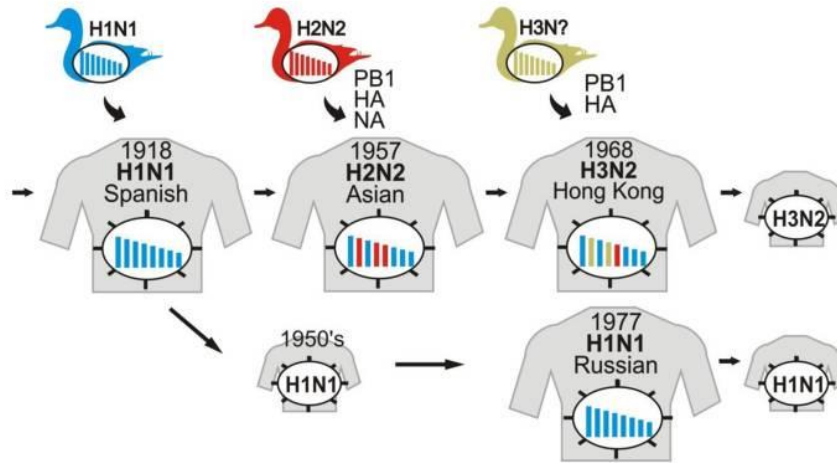
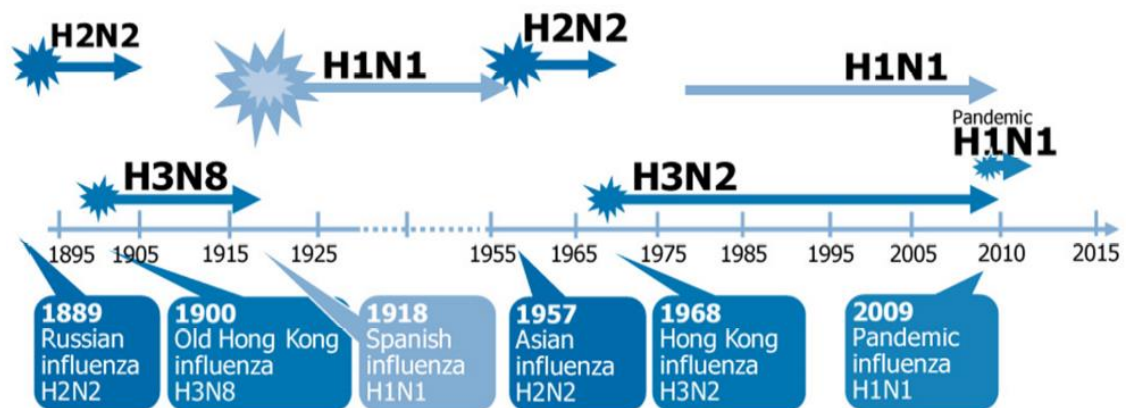


Figura 5. Subtipos pandémicos de virus de gripe A en el siglo XX y genes introducidos en cada nuevo virus desde cepas aviares. Fuente: Neumann G. *et al. Nature* 2009, 459(7249):931-9 (33).

La "Gripe Española" de 1918 fue causada muy probablemente por el salto de barrera de especie de un virus de la gripe aviar a los seres humanos con un periodo de adaptación. En 1957, la introducción de genes H2 de la HA, N2 de la NA y PB1 procedentes de virus aviares en los virus H1N1 que ya infectaban a la población humana, dio lugar al subtipo A (H2N2) responsable de la pandemia de "Gripe Asiática". Del mismo modo, la introducción de los genes H3 de la HA y PB1 de virus aviares en virus H2N2 que infectaban a la población humana en 1968 dio lugar al subtipo H3N2 de la pandemia de "Gripe Hong Kong". En 1977 reaparecieron virus del entonces desaparecido subtipo clásico A(H1N1) que guardaban una elevada relación antigénica y genética con las cepas A(H1N1) que habían estado circulando entre 1947 y 1950 (Figura 6).



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 6. Orden cronológico de aparición de los eventos pandémicos de gripe A durante los siglos XIX, XX y XXI con los respectivos subtipos gripales emergentes en cada una. Fuente: ECDC 2009.

Evolución histórica de los virus de la gripe A (H1N1)

Los virus de la gripe A del subtipo H1N1 han circulado en humanos durante tres periodos diferentes en los últimos cien años y con gran impacto epidemiológico (34). El primer periodo fue entre 1918 y 1957 como consecuencia de las variantes menores de la Gripe Española, el segundo desde 1977 (A/URSS/90/77) hasta el año 2009 como consecuencia de la re-emergencia de un subtipo A (H1N1) muy similar antigénicamente a la cepa A/FM/1/1947. En el año 2009 se extinguió el subtipo A(H1N1) clásico y emergió el nuevo subtipo pandémico o de gripe porcina A(H1N1)pdm09, que circula actualmente en el ser humano (**Figura 7**). El subtipo A(H1N1) clásico es uno de los más relevantes para el ser humano ya que ha circulado de forma global en la población humana durante 71 años si sumamos los dos periodos de su circulación (emergencia como Gripe Española y reemergencia en 1977). El siguiente subtipo en duración de circulación es el subtipo A (H3N2) con 51 años consecutivos infectando al ser humano. (35,36).

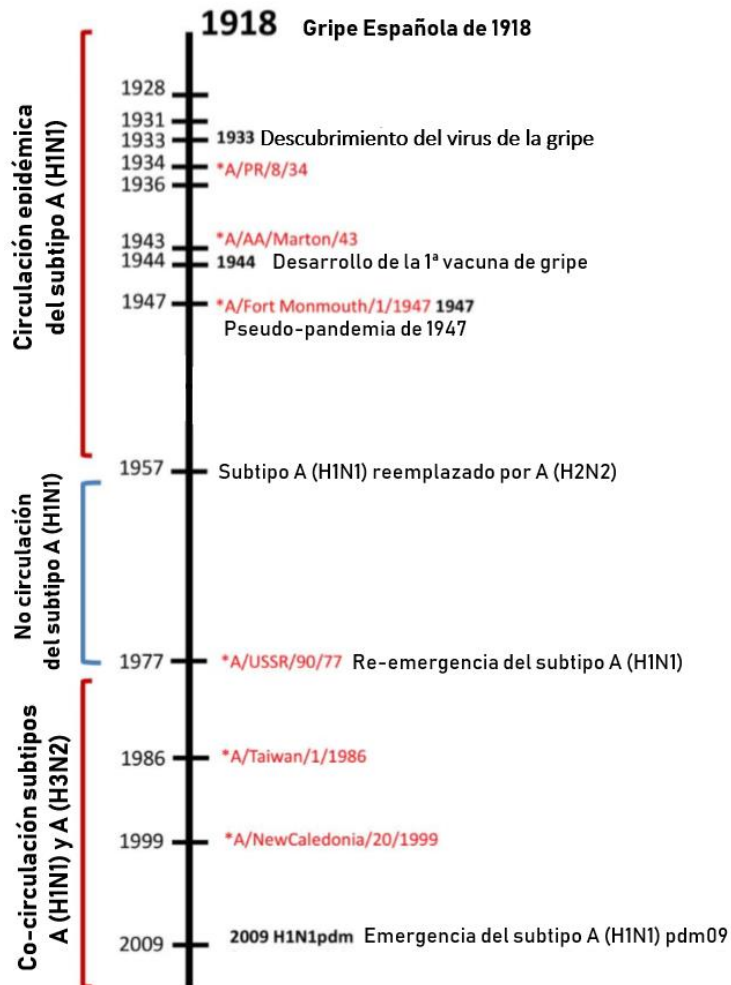


Figura 7. Evolución histórica del subtipo A(H1N1), epidemias y pandemias. Modificado de: Huang S.S. *et al. Sci Rep.* 2013, 3:1698 (34).

Gripe Española de 1918:

A principios del siglo XX, el mundo se vio afectado por una pandemia de gripe que se produjo en tres oleadas, distribuidas entre febrero de 1918 y junio de 1919. La enorme propagación y la gravedad de sus casos caracterizaron a la enfermedad, que fue etiquetada con el nombre de "Gripe Española". El origen de este nombre está en la ausencia de censura mediática en España, un país no contendiente en la Primera Guerra Mundial, lo que llevó a la libre circulación de noticias sobre la pandemia que dio origen a la misma (35). La pandemia puso de manifiesto la ineficacia de los

recursos médicos de la época, a pesar del auge de las nuevas especialidades surgidas en la era bacteriológica.

Se calcula que afectó a un tercio de la población humana (500 millones de personas) de aquella época. Fue tan letal que algunos autores cifran sus víctimas entre 50 y 100 millones; no sin razón se considera que ningún otro acontecimiento, infección, guerra o hambruna ha matado a tantos seres humanos en un periodo de tiempo tan reducido (36).

Periodo entre 1918 y 1957:

Tras la pandemia causada por el subtipo A (H1N1) de 1918, este subtipo se estacionalizó y produjo epidemias estacionales anuales entre los años 1920 y 1957 (37,38), año de su desaparición, sustituido por la emergencia del subtipo H2N2 de la Gripe Asiática y posteriormente por la circulación del subtipo H3N2 en 1968.

Dentro de las epidemias estacionales del subtipo A (H1N1) en este periodo, cabe destacar algunas variantes menores del subtipo que presentaron algunos de los cambios antigénicos más relevantes. Dentro de estas variantes, destacan los virus A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947 (39). En 1947 se produjo un cambio antigénico significativo en el virus A (H1N1) que creó una cepa distinta de los virus anteriores de 1943. La cepa A/FM/1/1947 llegó a provocar una epidemia inusualmente intensa que algunos autores denominaron como la pseudo-pandemia de 1947 (40). Se denominó inicialmente así debido a que la difusión humana del virus fue muy elevada aunque con una mortalidad muy baja (41). El origen de este virus parece ser la evolución paralela de un linaje filogenético de cepas del subtipo A(H1N1) circulantes en los años anteriores, que no habría sido dominante en las epidemias estacionales hasta su emergencia en 1947 (42).

En 1957 el subtipo A (H1N1) desapareció y fue sustituido por el subtipo A (H2N2) tras la pandemia asiática (43). Durante 20 años (desde 1957 a 1977) no circuló el subtipo H1N1 hasta su reaparición en el año 1977 (43).

Periodo a partir de 1977:

En 1977, el subtipo A (H1N1) reapareció después de 20 años de ausencia siendo los sujetos más vulnerables a la enfermedad los niños y jóvenes, mientras que los adultos y mayores de 65 años lo fueron menos, ya que estaban protegidos parcialmente por previas exposiciones al subtipo A(H1N1) antes de 1957 (40). El análisis de secuencias de cepas A(H1N1) mostraron que había una gran similitud genética entre la HA de la cepa que apareció en 1977 (cepa A/USSR/90/77) y la HA de las cepas A/FM/1/1947 y cepas posteriores como A/Fort Warren/50 (44). Por este motivo, se consideró que esta cepa debía proceder directamente de las gripes observadas en la década de 1950. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado la explicación por la que un virus ha permanecido genéticamente invariable durante más de dos décadas. Una de las hipótesis más aceptadas es que esta cepa procedió de un espécimen congelado, que probablemente se propagó por un accidente de laboratorio (45). El subtipo A(H1N1) finalmente se reintegró en la circulación epidémica, provocando epidemias estacionales junto con el subtipo A (H3N2) hasta su desaparición en el año 2009 con la emergencia del nuevo subtipo A(H1N1)pdm09 (33,46).

Emergencia del nuevo subtipo A(H1N1)pdm09

En el año 2009 se produjo el último caso de salto de barrera de especie que provocó la aparición del nuevo subtipo A(H1N1)pdm09, fruto de un reordenamiento genético entre virus de la gripe procedentes de aves, cerdos (linajes clásico y euroasiático) y humanos en hospedadores porcinos (46). En el caso de la pandemia del 2009, el virus es una variante del subtipo A(H1N1) clásico cuyos genes PB2 y PA procedían de un virus aviar, los genes HA, NP y NS de un virus del linaje porcino clásico, los genes M y NA de un virus porcino del linaje euroasiático importado a Norteamérica, y el gen PB1 procedente de un virus humano (**Figura 8**).

Los datos epidemiológicos indican que un brote similar a la gripe comenzó en el pueblo mexicano de La Gloria, Veracruz, a mediados de febrero de 2009 (47). A principios de abril de ese mismo año, las autoridades sanitarias públicas de México se alertaron por el alto número de casos de neumonía y gripe en esa región, e informaron

a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y a la oficina regional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de un posible brote de gripe. En los Estados Unidos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) identificaron cepas gripales distintas a las que circularon anteriormente del subtipo A(H1N1) que habían aparecido en el sur de California a mediados de abril de 2009. El 23 de abril, la Agencia de Salud Pública de Canadá también detectó virus gripales A(H1N1) nuevos en pacientes procedentes de México. El hallazgo de que los casos de México y California fueron causados por virus similares desencadenó la alerta por parte de los CDC y la OMS el 24 de abril de 2009.

La gripe A(H1N1)pdm09 se caracterizó por su afectación sobre todo a la población joven-adulta, produciéndose un menor número de casos de lo esperado en el grupo de población envejecida debido a que alrededor de un tercio de las personas mayores de 60 años tenía anticuerpos contra este virus, probablemente debido a una exposición anterior a un virus A(H1N1) (33,46). Aunque esta pandemia afectó principalmente a niños, jóvenes y adultos de mediana edad, el impacto del virus (H1N1) pdm09 en la población mundial en general, fue menos grave que el impacto de pandemias anteriores (46,47).

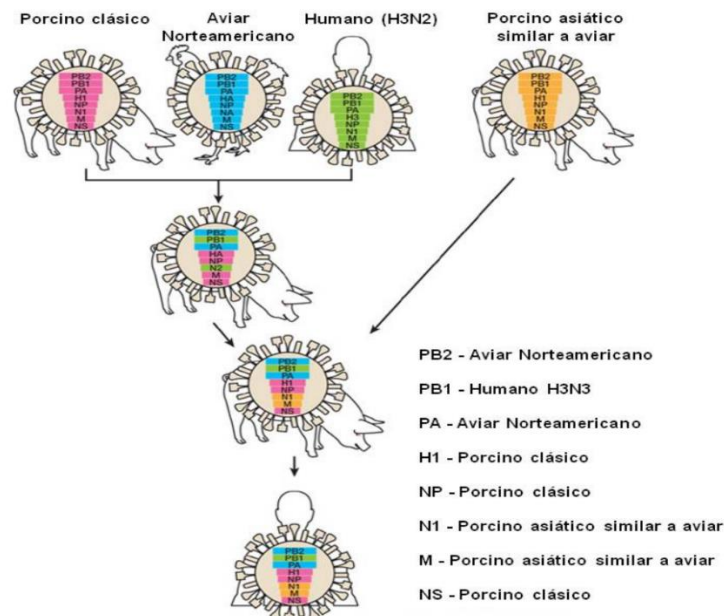


Figura 8. Génesis del virus gripal A(H1N1) pdm09. Extraído y modificado de: Neumann G. *et al. Nature* 2009, 459(7249):931-9 (33).

Epidemiología de los virus de la gripe

Los virus de la gripe circulan en forma de epidemias estacionales que 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 (48). En nuestro entorno, estas ondas epidémicas ocurren fundamentalmente entre los meses de diciembre a febrero-marzo (49,50). El periodo de vigilancia de la gripe en el hemisferio norte comprende desde la semana 40 de un año hasta la semana 20 del siguiente. Durante este periodo se da la circulación más intensa del virus pero también puede circular durante todo el año identificándose casos incluso en época estival (51).

La gripe es una infección de moderada contagiosidad con un periodo de incubación muy corto de 2 a 4 días, por lo que se transmite con rapidez durante las epidemias estacionales, afectando a un porcentaje relativamente importante de la población general. Las epidemias de gripe duran aproximadamente entre 8 y 12 semanas, infectándose por término medio entre el 5 y el 20 % de la población. Las epidemias anuales causan en todo el mundo unos 3 a 5 millones de casos de enfermedad grave y unas 250.000 a 500.000 muertes. La mortalidad de la gripe epidémica oscila por debajo del 1 % de las personas infectadas, aunque depende de la cepa gripal causante de la epidemia, de la edad y de las características de la población (52). La gripe afecta sobre todo a niños y jóvenes, pero es especialmente grave en personas de edad avanzada y aquellas con fragilidad biológica. La mortalidad de la gripe se concentra en las edades extremas de la vida (niños menores de 2 años y sobre todo mayores de 65 años) y en aquellos con comorbilidades (53).

En España, el patrón epidémico típico de la gripe provoca un aumento de casos y de detecciones en laboratorio 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 (54) (**Figura 9**). Los virus de gripe estacional humana del tipo A que circulan en la actualidad son fundamentalmente A(H1N1)pdm09 y A(H3N2). Los virus de tipo B circulantes se separan en dos linajes (B/Yamagata y B/Victoria) (55). Los virus de tipo C se detectan

con mucha menos frecuencia y suelen causar infecciones leves de tipo catarral, por lo que su impacto en la salud pública es menor. Desde el punto de vista epidemiológico, los virus gripales del tipo A son los principales causantes de las epidemias estacionales, en circulación mixta o en solitario, y a veces acompañados por virus de gripe B, sobre todo al final de la epidemia. Sin embargo, cada dos o tres años la epidemia es causada mayoritariamente por alguno de los dos linajes de gripe B (56).

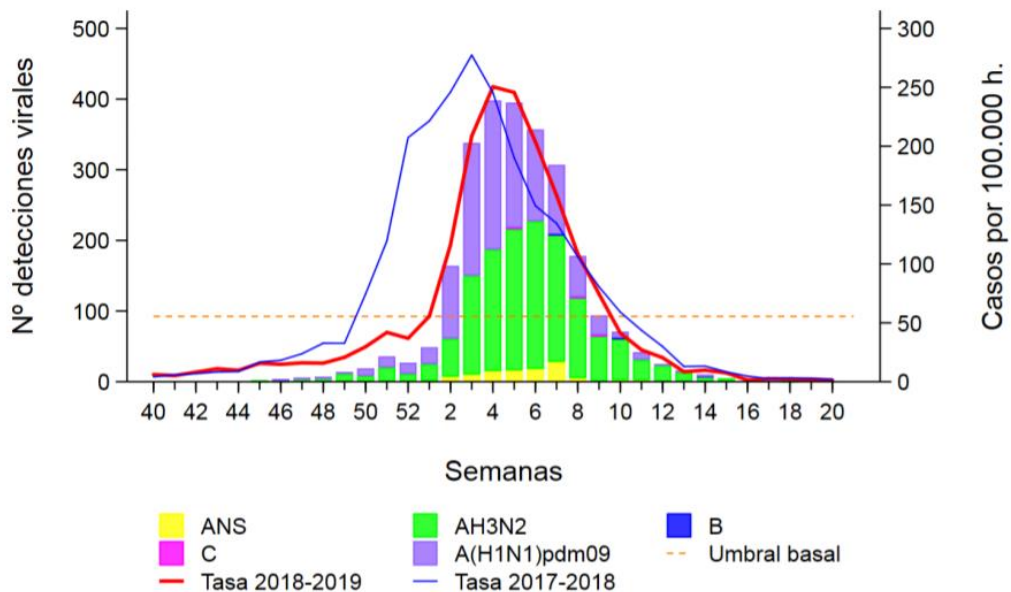


Figura 9. Perfil epidémico del virus de la gripe medido como tasa de incidencia semanal y número de detecciones virales. Temporada 2018-2019. Fuente: CNE-Sistemas de Vigilancia de la gripe en España (54).

Respuesta inmune frente a los virus de la gripe

Los virus de la gripe en los humanos causan una infección sistémica con afectación de las vías respiratorias superiores iniciando una cascada de reacciones inmunes que activan tanto la respuesta humoral como la respuesta celular. Las glucoproteínas de superficie de los virus de la gripe (HA y NA) son las de mayor importancia en la respuesta humoral (21,57) y las proteínas internas predominan en la respuesta celular (58,59). Los anticuerpos (Acs) presentes en las mucosas (fundamentalmente inmunoglobulinas de tipo IgA) y en el suero (IgG) generados frente a la HA neutralizan al virus limitando su infectividad. Estos Acs son la primera barrera para evitar la infección. La respuesta de inmunoglobulinas de tipo IgG frente a la HA es específica de

cepa, ya que la acumulación de mutaciones puntuales por deriva antigénica de la HA limita la neutralización de otras cepas del mismo subtipo por acción de los anticuerpos específicos.

Inmunidad de tipo celular

La respuesta inmunitaria de tipo celular juega un importante papel en la patogenia de la infección gripal y en la curación de la enfermedad. En el curso de la infección se observa un incremento de los mecanismos de la inmunidad innata y de algunos mecanismos de la inmunidad celular. La respuesta inmunitaria celular está mediada por células T, quienes tienen como diana principalmente a las proteínas internas de los virus de la gripe. En el ser humano hay dos tipos de células T efectoras: T-CD4+ y T-CD8+. Ambos tipos de células contribuyen al aclaramiento de la infección causada por el virus de la gripe (60).

La respuesta inmunitaria celular está mediada por células T CD4+, con restricción del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (CMH II) y son fundamentalmente específicas de subtipo. Estas células CD4+ tienen dos propiedades funcionales. En primer lugar, son células T colaboradoras que ayudan a las células B para la producción de Acs y a los linfocitos T de clase I para su proliferación. En segundo lugar, las CD4+ pueden tener actividad citolítica con un rango de especificidad de antígeno parecida a la de los linfocitos T de clase I (60).

Las células T CD8+ con restricción CMH clase I son específicas de tipo, dirigidas preferentemente a los antígenos NP y M. Estos linfocitos T citotóxicos aparecen en individuos infectados o vacunados entre los días 6 y 14 y desaparecen por término medio el día 21 (60).

Las células *natural killer* (células NK) no son específicas frente a los virus, pero en la fase aguda aumenta considerablemente su actividad, incrementándose los niveles de interferón alfa y beta que se correlacionan con la disminución de la carga vírica (61).

Inmunidad de tipo humoral

Tras la primo-infección natural por los virus de la gripe aparecen Acs en el suero de los pacientes frente a la HA y NA, así como frente a otras proteínas internas del virus. Estos últimos son específicos de tipo y la protección que ofrecen es limitada, pero resultan de utilidad para el análisis de la seroprotección a través de métodos serológicos como la fijación de complemento. Los anticuerpos anti-hemaglutinina (Acs anti-HA) son la base de la inmunidad protectora humoral frente a la gripe; neutralizan la infectividad del virus por bloqueo del dominio de adhesión en la subunidad HA1 (cabeza globular de la hemaglutinina) (62). Los Acs anti-HA son específicos de cepa y algo menos de subtipo. Esta especificidad tan estrecha de los principales Acs protectores explica en gran parte la susceptibilidad a la infección por nuevas cepas variantes de virus de la gripe, incluso del mismo subtipo.

Los anticuerpos anti-neuraminidasa (Acs anti-NA) se producen a menor título. El efecto protector de estos Acs se basa en limitar la difusión del virus, ya que bloquean la liberación de los viriones tras el ciclo replicativo del virus en la célula hospedadora. A pesar de que los Acs anti-NA desempeñan un papel importante en la protección frente a la gripe, se ha prestado poca atención al antígeno NA para el diseño de vacunas antigripales. De hecho, la NA viral ha sido recientemente apodada como el "antígeno olvidado" (63).

Importancia de la respuesta humoral mediada por Anticuerpos inhibidores de Neuraminidasa (Acs anti-NA).

El papel de los Acs anti-NA ha sido reconocido como un posible contribuyente a la protección frente a la gripe. Se ha reconocido que los Acs anti-NA reducen la replicación viral (64). No obstante, debido al papel dominante de los Acs frente a la HA en la protección y al hecho de que la infección o la vacunación pueden a menudo producir Acs contra ambos antígenos, la contribución precisa del anticuerpo frente a la NA ha sido relegada generalmente a un segundo plano.

Uno de los principales problemas para analizar la importancia de la respuesta inmune humoral frente a la NA es que los ensayos serológicos frente a este antígeno

eran difíciles de realizar y requerían el uso de reactivos tóxicos, lo que limitaba el número de muestras que se analizaban (65). Sin embargo, recientemente se han puesto a punto nuevos protocolos serológicos estandarizados que permiten analizar la presencia de Acs anti-NA en un gran número de sueros. El método más utilizado actualmente es el ensayo ELLA (*Enzyme-Linked Lectin Assay*) (66–68).

La evidencia científica ha apoyado en numerosas ocasiones que la respuesta inmunológica mediante la producción de Acs anti-NA se ha correlacionado con una reducción en el título viral y una reducción en el desarrollo de los síntomas asociados a la gripe, tanto en modelos animales (69) como en estudios controlados en humanos (70). La correlación entre la reducción en la gravedad de los síntomas de la enfermedad gripal y la presencia de Acs anti-NA está descrita desde 1969 (71), y recientemente se ha demostrado que la presencia de títulos previos de Acs anti-NA en sueros de pacientes se comporta como un factor de protección frente a la infección gripal, independientemente del título de Acs anti-HA en el suero de los mismos (72,73).

La respuesta inmune humoral frente a la NA viral puede ser de particular importancia en aquellos años en los que exista un *mismatch* antigénico de la HA, pero con poca deriva antigénica de la NA (74). De hecho, los resultados de algunos estudios han demostrado que la infección previa frente a la gripe A(H1N1)pdm09 podría proporcionar protección inmunológica contra el virus A(H5N1), ya que la secuencia aminoacídica de la estructura de NA entre estos subtipos está más conservada (75,76). En particular, los Acs dirigidos contra estas regiones conservadas de NA podrían ayudar a proporcionar un nivel significativo de protección frente a la infección gripal (77).

Pecado original antigénico

Las epidemias estacionales de gripe ocurren cada año producidas por variantes menores de los tipos gripales A y B. Las primeras infecciones por virus de la gripe ocurren generalmente en los primeros años de vida de un individuo, induciendo inmunidad protectora específica frente a la cepa de virus que les infectó. Las exposiciones posteriores a otros virus de la gripe, bien sea por infecciones naturales o

por vacunaciones estacionales, producen una respuesta inmune frente a las cepas que han infectado a un individuo, pero también producen un intenso efecto “*booster*” frente a la primera cepa que le infectó. Esta importancia de las primo-infecciones con virus de la gripe se explica mediante la teoría del Pecado Original Antigénico (78–81), donde 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.

Esta teoría fue formulada por Sir Thomas Francis en el año 1960 (78) y ha sido descrita en la respuesta inmune humoral frente a virus de la gripe así como en el estudio de infecciones por otros virus respiratorios (79–82). La “Doctrina del Pecado Original Antigénico” en la gripe explica como un individuo cuando es infectado por una cepa de virus gripal estacional, produce una respuesta específica frente a dicha cepa y al mismo tiempo respuestas de mayor o menor intensidad frente a cepas que han infectado a este individuo a lo largo de su vida. Este fenómeno inmunológico notable que se produce sobre el primer virus que le infectó, tiene sin duda repercusión en la respuesta humoral específica de la gripe, y ha obtenido gran importancia a la hora de entender la respuesta a las vacunas de gripe. Este fenómeno despierta un especial interés en la formulación de vacunas futuras de una respuesta más amplia, e incluso de vacunas universales al estilo de las que disponemos hoy en día contra la Polio y la Rubéola.

Vacunación frente a la gripe y tipos de vacunas

La medida de control más eficaz frente a la gripe sigue siendo la inmunización anual mediante la vacunación, especialmente en grupos de población considerados de alto riesgo de complicaciones asociadas a la gripe (83). No obstante, los constantes cambios antigénicos de la gripe obligan a una vigilancia virológica y epidemiológica adecuada que permita seleccionar correctamente de las cepas que deben formar parte de la vacuna antigripal cada temporada. Cada año, la OMS a través de la Red Internacional de Vigilancia de la Gripe (GISRS, *Global Influenza Surveillance and Response System*) analiza las cepas de gripe circulantes en los hemisferios norte y sur

para elegir las cepas idóneas para la formulación vacunal, optimizando la efectividad de los programas de vacunación.

Tipos de vacunas antigripales

Existen dos grandes grupos de vacunas antigripales, las inactivadas y las atenuadas. Las primeras se administran mediante inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica y son las únicas disponibles actualmente en España. Las vacunas atenuadas se administran por vía intranasal, tienen limitada su indicación en personas inmunocompetentes de 2 a 17 años y se han ido introduciendo en programas de vacunación infantil en los Estados Unidos, Finlandia y el Reino Unido, entre otros países. Algunos ensayos clínicos que comparan ambos tipos de vacunas han mostrado una eficacia similar o superior en las vacunas de virus vivos atenuados (84,85).

Vacunas inactivadas

La mayoría de vacunas que se emplean en países europeos con programas específicos de vacunación, incluida España, son de tipo inactivado en cualquiera de sus formulaciones: pueden contener virus enteros, virus fraccionados o antígenos de superficie (86). Algunos autores han señalado que estas últimas vacunas podrían originar una menor protección (87). En general, todas estas vacunas tienen un rango de edad de utilización desde los 6 meses de vida en adelante, con algunas excepciones.

En la **figura 10** se representan algunas de las vacunas antigripales comercializadas en España.

Tipo de vacuna	Nombre comercial	Formulación	Indicación	Vía de administración	Laboratorio
Virus fraccionados inactivados	Afluria	Trivalente	≥5 años	IM ¹ , SC ²	Seqirus
	Intanza		≥60 años	ID ³	Sanofi Pasteur
	Mutagrip		≥6 meses	IM, SC	Sanofi Pasteur
	Vaxigrip		≥6 meses	IM, SC	Sanofi Pasteur
	Vaxigrip Tetra	Tetravalente	≥6 meses	IM, SC	Sanofi Pasteur
	Fluarix Tetra		≥6 meses	IM	GSK
Antígenos de superficie (HA y NA)	Chiroflu	Trivalente	≥6 meses	IM, SC	Seqirus
	Chiromas (adyuvante MF59C.1)		≥65 años	IM	Seqirus
	Influvac		≥6 meses	IM, SC	Mylan

¹Intramuscular (IM); ²Subcutánea (SC); ³Intradérmica (ID)

Figura 10. Vacunas antigripales comercializadas en España. Extraído y modificado de: Ortiz de Lejarazu R. *et al. Los virus de la gripe. Pandemias, epidemias y vacunas.* 2019 (17)

- Vacunas inactivadas de virus enteros:

Este tipo de vacunas contiene partículas de virus completo de la gripe, inactivado pero con todas las proteínas, lípidos, antígenos (glucoproteínas) y ácido nucleico del virus. Se producen por inoculación de virus de la gripe en huevos embrionados de gallinas. Tras un periodo de incubación de 2-3 días, se recogen las partículas víricas, se purifican y se inactivan.

Las primeras vacunas producidas de esta manera fueron eficaces para prevenir la gripe, pero a menudo eran altamente reactógenas. Estas vacunas mostraban una buena inmunogenicidad y una reactogenicidad aceptable. Sin embargo, en niños estas reacciones adversas eran frecuentes, por lo que no era recomendable su uso en este grupo etario. Tras la vacunación con viriones completos inactivados se produce una respuesta humoral y celular frente a los antígenos de superficie e internos del virus similar a lo que ocurre tras una infección natural. La seroprotección alcanzada mediante

este tipo de vacunas es variable en función de la edad del individuo, enfermedades crónicas subyacentes y, así mismo, de las cepas incluidas en la vacuna.

- Vacunas inactivadas de virus fragmentados:

Este tipo de vacunas contienen antígenos de superficie HA y NA, así como otros antígenos internos del virus. Se producen al tratar partículas purificadas de virus completo con detergentes y disolventes orgánicos para eliminar los lípidos de la membrana viral. Este tratamiento rompe la cubierta viral para dar una mezcla de componentes de proteína viral altamente inmunógena. Las vacunas de partículas fragmentadas fueron aprobadas en 1968 y tienen un buen perfil de tolerabilidad y pueden utilizarse en niños, adultos y personas de edad avanzada.

- Vacunas de subunidades o antígenos de superficie:

Este tipo de vacunas contienen únicamente los antígenos de superficie HA y NA, que son los más inmunógenos del virus. Al igual que las vacunas de virus fragmentados, las vacunas de subunidades son menos reactógenas que las vacunas inactivadas de virus completos debido a que se eliminan muchos de los componentes reactógenos internos del virus. El procesamiento de los virus de la gripe desde los viriones completos hasta las vacunas de subunidades, produce una pérdida de inmunogenicidad pero una ganancia en tolerabilidad, reduciendo la frecuencia de efectos adversos (87). En algunas ocasiones, esta disminución de la inmunogenicidad disminuye mucho la efectividad de las vacunas antigripales en algunos colectivos cuyo sistema inmune es senescente, como las personas mayores de 65 años, o está deteriorado por cualquier razón como los pacientes inmunodeprimidos. Para aumentar la inmunogenicidad de las vacunas inactivadas, se utilizan distintas estrategias para reforzar la inmunidad, como el uso de adyuvantes como el MF-59 (88) o vacunas con dosis mayores de antígeno (89), o incluso otras vías de administración como la intradérmica (90). Todos estos diseños vacunales han demostrado mayor inmunogenicidad y eficacia en ensayos clínicos frente a la vacuna estándar.

Vacunas atenuadas

El otro grupo conceptualmente diferente de vacunas lo constituyen las vacunas fabricadas con virus activos atenuados (*Live-attenuated influenza vaccine*; LAIV). Los mecanismos de atenuación responden a dos planteamientos básicos: la selección de cepas mutantes termo-sensibles, incapaces de replicarse a temperaturas superiores a 25-28°C, y la obtención de cepas de virus recombinantes adaptadas al frío que poseen, además, los genes que codifican los antígenos de superficie HA y NA.

Estas vacunas son de administración intranasal, de modo que los virus atenuados son instilados y se multiplican activamente en el tracto respiratorio superior, induciendo una buena respuesta inmunitaria secretoria local. Una ventaja que aporta este tipo de vacunas es que inducen una respuesta inmunitaria local a nivel de mucosas de forma mediante la producción de IgA, similar al modelo de infección natural, pero en la que el virus carece de patogenicidad. En contrapartida, las limitaciones que presenta este tipo de vacunas derivan de los efectos secundarios que se observan a nivel local, sobre todo con rinorrea y congestión nasal, o fiebre en un número menor de casos (84,91,92). Por otra parte, este tipo de administración intranasal, como conlleva la replicación de virus vivos, puede permitir la transmisión del virus desde una persona vacunada hasta otra persona que no lo está, con periodos ventana de excreción viral de hasta 21 días (1,92).

Medios de elaboración de las vacunas antigripales

Las vacunas antigripales se han elaborado tradicionalmente en huevos embrionados de gallina. Este ha sido el método más comúnmente utilizado para la fabricación de vacunas para la gripe y a la vez el más antiguo. Sin embargo, este sustrato presenta como principal inconveniente una difícil disponibilidad oportuna en cantidades suficientes para la producción de virus que vaya a ser utilizado en la producción de vacunas, particularmente en el caso de pandemias, además del riesgo de generar variaciones en la expresión antigénica del virus vacunal, debido a un proceso de adaptación del virus al crecimiento en este tipo de sustrato (93). A todo ello cabe

añadir la posibilidad de que algunas cepas actuales de virus de la gripe, principalmente A (H3N2), muestren un bajo crecimiento por presentar dificultades en su cultivo en huevo (94).

Para obviar el crecimiento de las cepas de virus vacunales en huevos embrionados se han desarrollado otros sistemas más flexibles que permitan reemplazar el uso de huevos para la producción a gran escala de antígenos gripales. Los cultivos celulares en líneas continuas como células de mamíferos (riñón canino de Madin Darby ó MCDK), líneas VERO y BHK-21 suponen una alternativa que ofrece varias ventajas sobre la producción en huevos (95,96). Por un lado, el cultivo celular modifica en menor medida la expresión fenotípica antigénica viral de la cepa vacunal debido a que el virus no tiene que adaptarse al crecimiento en huevo. Otro aspecto destacable es la mayor flexibilidad y capacidad de producción de vacuna celular en caso de necesidad incrementada (pandemia, desabastecimientos por imposibilidad de crecimiento en huevo, etc). Por último, los resultados de vacunas antigripales elaboradas en cultivo celular han mostrado una seguridad y eficacia similares a las de vacunas producidas en huevo, además de evitar la posibilidad de alergia a las proteínas aviares como la albúmina (97).

Nueva generación de vacunas frente a la gripe

Las vacunas antigripales actuales están diseñadas para inducir respuestas humorales frente a la proteína más inmunodominante del virus de la gripe, la hemaglutinina (HA), y más concretamente contra el dominio HA1 o cabeza globular (98). La mayor limitación de estas vacunas es que los virus de la gripe presentan una intensa deriva antigénica, y los epítomos antigénicos de la HA, y sobre todo los localizados en la cabeza globular que es la zona más expuesta al sistema inmune, cambian constantemente por la presión selectiva del huésped (99). Esto obliga a actualizar constantemente la composición de las vacunas antigripales, ya que las cepas de gripe que circulan durante una temporada progresivamente van cambiando, siendo ligeramente diferentes en la siguiente temporada (99). Esto limita la protección humoral producida por la vacunación y dificulta proteger de forma óptima y duradera

a la población. Por otra parte, las vacunas estacionales actuales no tienen apenas capacidad para proteger a la población frente a nuevos virus pandémicos (100).

Dadas estas limitaciones, las vacunas frente a la gripe necesitan ser mejoradas y adaptadas a los requerimientos actuales y futuros. Las nuevas vacunas deben proporcionar una amplia protección frente a muchos virus de la gripe diferentes, para reducir la necesidad de cambiar la formulación vacunal y para facilitar la prevención de la gripe tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (101). Para lograr este objetivo, la OMS ha formulado unos objetivos que debe cumplir la siguiente generación de vacunas frente a la gripe (o “*Next Generation Influenza Vaccines – NGIV*”), los cuales se describen a continuación en la **Tabla 1** (96).

Tabla 1. Objetivos de la OMS para el desarrollo de las vacunas de gripe de la siguiente generación o “*Next Generation Influenza Vaccines*”.

<p>Objetivos para el año 2022</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Disponer de vacunas capaces de aumentar la protección frente a las cepas circulantes respecto a las vacunas no adyuvadas ✓ Disponer de vacunas capaces de aumentar la protección frente a la gripe grave durante al menos un año en grupos de alto riesgo en países con rentas bajas y medias.
<p>Objetivos para el año 2027</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Disponer de vacunas capaces de proteger frente a la gripe grave durante al menos cinco años ✓ Disponer de vacunas para grupos de alto riesgo en países con rentas bajas y medias.

Las vacunas antigripales por el momento comercializadas en nuestro medio se encuentran aún lejos de los objetivos marcados por la OMS. Todas estas vacunas

actuales están diseñadas para producir respuestas humorales frente a la proteína más inmunodominante del virus de la gripe, como es la hemaglutinina (98). Siguiendo los objetivos establecidos anteriormente, se van a requerir nuevas vacunas que ofrezcan una protección humoral más completa y por otro lado, que desarrollen respuestas frente a epítomos conservados para proporcionar una amplia protección frente a muchos virus de la gripe diferentes (96, 97). Se están explorando continuamente otras dianas vacunales de los virus de la gripe que puedan ser tanto o más inmunógenas que la HA y por otro lado, que se traten de epítomos antigénicos más conservados. Una aproximación ha sido el dominio HA2 o tallo de la HA como posible diana antigénica en el diseño de vacunas debido a que es una región de esta proteína mucho más conservada que la HA1, obteniendo resultados prometedores, pero no obstante, es menos inmunógena que el dominio HA1 (102). También existen otras aproximaciones dirigidas frente a proteínas internas del virus que están mucho más conservadas, como la proteína M o la NP (103,104). Sin embargo estas dianas no son muy inmunógenas debido al difícil acceso por parte de las células del sistema inmune, por lo que su uso de momento es también limitado. Por otro lado, una proteína del virus de la gripe para la que se conoce que tiene un papel relevante en la respuesta humoral frente a virus de la gripe (72,73) y parece ser prometedora en el desarrollo de futuras vacunas antigripales es la neuraminidasa (NA), aspecto que se desarrolla en el siguiente apartado.

Importancia de la Neuraminidasa (NA) como antígeno vacunal

A pesar de la disponibilidad actual de profilaxis mediante la vacunación, el virus de la gripe sigue teniendo un impacto anual significativo en la morbilidad y mortalidad de los seres humanos, lo que pone de manifiesto la necesidad de seguir investigando en este campo. Las estrategias actuales de vacunación se centran predominantemente en la HA, ya que las vacunas actuales buscan incrementar la respuesta humoral contra la hemaglutinina (HA), que es la glucoproteína inmunodominante más abundante en la superficie del virus de la gripe (12,13,44), así como los ensayos de evaluación de la eficacia vacunal, fundamentados en el análisis de los Acs anti-HA (62,105,106). Por otro

lado, la neuraminidasa (NA), la segunda glicoproteína en importancia de la superficie del virus de la gripe, ha servido históricamente como blanco para el tratamiento con fármacos antivirales y ha sido menos estudiada en el contexto de la inmunidad humoral (107).

La evidencia científica ha apoyado en numerosas ocasiones que la respuesta inmunológica mediante la producción de Acs anti-NA se ha correlacionado con una reducción en el título viral y una reducción en el desarrollo de los síntomas asociados a la gripe (64,70,75). Se ha demostrado recientemente además que la presencia de títulos previos de Acs anti-NA en sueros de pacientes se comporta como un correlato de protección independiente del título de Acs anti-HA en el suero de los mismos (72,73,108). Debido al creciente interés por la potencial importancia de los Acs anti-NA para la protección frente a virus de la gripe, una de las dianas prometedoras para las futuras vacunas antigripales parece ser la NA viral (104,109).

Las actuales vacunas antigripales actuales llevan en su composición una cantidad estandarizada de 15 µg de HA de cada cepa de gripe incluida en la misma (86). Sin embargo, debido a su método de fabricación, otras proteínas, fundamentalmente la NA, quedan dentro de su composición en cantidades que no están estandarizadas, pero que también producen respuestas humorales. Recientemente se ha reconocido la posibilidad de una protección basada en la NA, y la propuesta de estandarizar de alguna manera la cantidad de NA en las formulaciones de las vacunas se ha tenido en cuenta de cara al desarrollo de vacunas contra el virus de la gripe (64,110,111).

Es bien conocido que la NA sufre menos deriva genética que la HA (109,112), por lo que permanece más tiempo sin cambios antigénicos que limiten la protección serológica. Esta particularidad es interesante para generar respuestas humorales más duraderas y evitar la discordancia antigénica entre virus de temporadas consecutivas debido a la rápida evolución de la HA (113). Al considerarse la NA una proteína más conservada que en el caso de la HA, es posible y también probable que la respuesta humoral generada por el contacto con un subtipo de gripe provoque respuestas cruzadas de Acs frente a otros subtipos, al menos dentro del mismo clado de la NA (114). De hecho, existen estudios que demuestran que la infección previa frente a la gripe A(H1N1)pdm09 podría proporcionar protección inmunológica contra el virus

A(H5N1), ya que la secuencia aminoacídica de la estructura de NA entre estos subtipos está más conservada (75,76). Por tanto, la respuesta inmunológica frente a la NA viral podría ser de particular importancia durante una pandemia de gripe en la que la mayoría de la población no presentara inmunidad previa frente al nuevo subtipo de HA, pero que pudiera tener inmunidad previa a la NA del virus emergente (74). El estudio de la inmunogenicidad de la proteína NA como antígeno vacunal parece relevante en el diseño de vacunas enfocadas en respuestas universales frente a la gripe.

Efectividad y eficacia de las vacunas antigripales

La eficacia vacunal se determina fundamentalmente mediante ensayos serológicos clínicos controlados y la efectividad mediante estudios epidemiológicos observacionales. Estos parámetros de la vacunación antigripal son difíciles de evaluar, ya que varían de forma considerable en función de la concordancia (*matching*) existente entre las cepas vacunales y las circulantes o salvajes, así como de los métodos utilizados para el análisis, la intensidad de la actividad gripal durante la temporada en que se realiza el estudio, la edad de los pacientes incluidos en el estudio, el número de dosis administradas y la proporción de personas con factores de riesgo en la población en estudio (115).

La efectividad vacunal, entendida como la protección conferida a los sujetos vacunados en condiciones de uso habitual de la vacuna, viene determinada por tanto, de:

- Características del sujeto: edad, competencia del sistema inmune, factores genéticos que pueden condicionar la respuesta a la vacuna o la historia de exposiciones previas a los distintos virus de la gripe.
- Características de la vacuna:
 - Concordancia o *matching* de las cepas vacunales con las cepas de virus circulantes. La capacidad de los virus de la gripe de experimentar

constantes cambios antigénicos obliga a una adecuada vigilancia virológica y epidemiológica para seleccionar correctamente las cepas vacunales de cada temporada.

- Cantidad de antígeno incluida en la vacuna.
- Tipo de vacuna (vacuna de virus vivos atenuados, inactivada fraccionada o de subunidades).
- Presencia de elementos que potencien la respuesta inmune, como los adyuvantes.
- Vías de administración (subcutánea, intradérmica o intranasal).
- El origen del virus vacunal, obtenido por cultivo en embrión de pollo o en líneas celulares, puede tener un impacto diferente en la protección conferida por la vacuna.

A pesar de que la efectividad de las vacunas antigripales es moderada (116), la medida de control más eficaz de la enfermedad gripal sigue siendo la inmunización anual mediante la vacunación, especialmente en grupos de población considerados de alto riesgo por complicaciones asociadas a la gripe (83,115).

Técnicas serológicas para evaluar la eficacia vacunal

Las técnicas serológicas que se utilizan habitualmente para cuantificar los Acs específicos de la gripe incluyen:

- Reacción de Inhibición de la Hemaglutinina (RIH)
- Ensayo de Hemólisis Radial Simple (HRS)

Para evaluar la eficacia vacunal se han utilizado tradicionalmente estos dos ensayos serológicos. Para que las vacunas antigripales puedan ser comercializadas, estas deben cumplir con una serie de parámetros de eficacia vacunal que exige la Agencia Europea del Medicamento (EMA), emitidos por el Comité de especialidades farmacéuticas (CPMP).

Con estos métodos se pretende hacer una aproximación bastante fiable de la capacidad inmunogénica humoral de las vacunas, aunque actualmente se están incluyendo otros métodos complementarios para mejorar esta medición. Existen otros métodos serológicos más complejos como la microneutralización viral (MN), que permiten analizar la presencia de Acs neutralizantes frente a todas las proteínas del virus. Sin embargo, este método no se usa como método habitual para evaluar la eficacia serológica habitual. Con respecto a la aparición de nuevos métodos serológicos, cabe destacar el ensayo de titulación de anticuerpos frente a la neuraminidasa (Acs anti-NA) mediante el ensayo ELLA (*Enzyme-Linked Lectin Assay*), que surge de la necesidad de disponer de nuevas herramientas para conocer con mayor detalle los Acs frente a la gripe en muestras serológicas, y más concretamente frente a otras proteínas diferentes a la hemaglutinina que puedan estar implicadas en la respuesta inmune.

A continuación, se describe de manera resumida el fundamento de cada uno de los ensayos serológicos citados anteriormente.

- Reacción de Inhibición de la Hemaglutinación (RIH):

Es el método más utilizado actualmente para detectar y cuantificar Acs frente a la HA de virus de la gripe en muestras serológicas, tanto humanas como animales (117–119). Esta metodología es utilizada en muchos laboratorios para analizar la respuesta humoral a la vacunación, para realizar estudios de eficacia serológica vacunal, así como estudios seroepidemiológicos con el fin de analizar la susceptibilidad de distintas poblaciones frente a la gripe (44,120,121). Esta técnica es también utilizada para realizar la caracterización antigénica de los virus de la gripe utilizando antisueros de animales previamente infectados.

- Ensayo de hemólisis radial simple (HRS):

La técnica de la hemólisis radial simple (HRS) es la segunda metodología reconocida para evaluar la eficacia serológica de las vacunas estacionales. Está basada en la hemólisis pasiva de los eritrocitos mediada por el complemento e inducida por el complejo antígeno-anticuerpo (119,122,123). Esta hemólisis es fácilmente identificable y

su medida es proporcional a la concentración de Acs en el suero. Esta técnica detecta principalmente anticuerpos IgG frente a los virus de la gripe, pero también puede utilizarse para muchos otros virus como los coronavirus, virus Parainfluenza, virus Dengue o virus de la encefalitis japonesa. En esta técnica, un área de hemólisis igual o superior a 25 mm² es aceptado como correlato de protección humoral.

- Ensayo de microneutralización o de neutralización viral

El ensayo de neutralización viral es un ensayo altamente sensible y específico para detectar Acs neutralizantes específicos del virus de la gripe en sueros humanos y animales, que puede incluir la detección de anticuerpos humanos contra subtipos de gripe aviar (117,119). Aunque las pruebas de neutralización convencionales para los virus gripales (basadas en la observación del efecto citopático del virus en un cultivo de células MDCK) son laboriosas y bastante lentas, los ensayos de microneutralización utilizan placas de microtitulación en combinación con un ELISA frente a la proteína NP para detectar las células infectadas por el virus, pudiendo obtenerse resultados en dos días (124).

- Ensayo enzimático ligado a lectina (ELLA)

El ensayo ELLA (*Enzyme-Linked Lectin Assay*) fue inicialmente descrito por Lambré y colaboradores en 1990 (125), pero su uso como un ensayo serológico estandarizado ha sido más reciente, con numerosos laboratorios que realizan el ensayo para medir los títulos de Acs anti-NA en muestras clínicas (66,68,73,126). Uno de los objetivos del Consorcio para la estandarización del estudio seroepidemiológico de virus de la gripe (CONSISE- *Consortium for the Standardization of Influenza Seroepidemiology*) es promover el análisis de la respuesta humoral contra otras proteínas virales como es el caso de la NA viral. La técnica ELLA consiste en un ensayo práctico que actualmente siguen algunos laboratorios para la determinación de Acs anti-NA.

Análisis y parámetros de la eficacia vacunal

La evaluación de la eficacia vacunal es un paso fundamental para comprobar que el diseño de la vacuna es preciso y útil. Actualmente, la base científica para aprobar las vacunas antigripales comercializadas en Europa y las actualizaciones de las ya existentes son los estudios que evalúan el título de Acs anti-HA tras la vacunación mediante la RIH (117).

El análisis RIH puede servir además para conocer la capacidad de las vacunas antigripales para inducir la producción de Acs heterotípicos en la población frente a cepas gripales de reciente aparición dentro de un mismo subtipo gripal (34,127), y de mayor interés frente a subtipos con potencial pandémico, como virus de gripe aviares como los subtipos A(H5N1), A(H7N3) y A(H9N2) (128,129).

La Agencia Europea del Medicamento (EMA, *European Medicines Agency*) determina cuales son los requerimientos que debe tener una vacuna frente a la gripe en términos de protección serológica para que pueda ser comercializada (117,119,130). Estos criterios son emitidos por el Comité de especialidades farmacéuticas (CPMP, *Committee for Proprietary Medicinal Products*) y están representados en la **Tabla 2**. Los criterios del CPMP están referidos a dos grupos etarios diferentes: adultos (entre 18 y 60 años) y mayores de 60 años. En esta valoración detallada por la EMA no se han incluido otros grupos de edad que pueden recibir las vacunas antigripales, como por ejemplo, la población pediátrica.

Tabla 2. Criterios utilizados por el Comité de especialidades farmacéuticas (CPMP) para la monitorización de la eficacia de la vacuna antigripal y requeridos por la EMA para su comercialización (119).

18-60 años	> 60 años
Tasa de Seroprotección > 70%	Tasa de Seroprotección > 60 %
Tasa de Seroconversión > 40%	Tasa de Seroconversión > 30%
Razón de Incremento > 2,5	Razón de Incremento > 2,0

Los criterios para evaluar la eficacia vacunal son los siguientes:

- Tasa de Seroprotección (TSP): Es el porcentaje de población evaluada que posee Acs a títulos considerados como protectores. Para la evaluación de este parámetro se considera un título $\geq 1:40$ como correlato de seroprotección frente a la gripe. En definitiva, la TSP es el porcentaje de población que tras la vacunación muestra un título de Acs anti-hemaglutinina $\geq 1:40$. Estudios realizados por algunos autores (62,73,106,121) han demostrado que un título de Acs anti-HA de 1:40 es capaz de evitar el 50% de las infecciones por gripe.
- Tasa de Seroconversión (TSC): Es el porcentaje de la población que tras la vacunación antigripal muestra un aumento de al menos cuatro veces el título entre el suero pre-vacunal y post-vacunal. Un ejemplo sería pasar de un título pre-vacunal de 1:10 a un título post-vacunal de 1:40, o de un título 1:40 a 1:160.
- Media Geométrica de los títulos de anticuerpos (MGTs): ya 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. Esto provoca que el uso de la media aritmética sobreestime el valor medio del título de Acs. Para evitar esto, se realiza una transformación logarítmica de los títulos para obtener una distribución normal de tipo Gaussiano, siendo el valor de tendencia central la media aritmética de esa transformación.
- Razón de incremento entre los títulos pre y post-vacunales: permite estudiar el incremento de títulos que ha experimentado una población como respuesta a la vacunación antigripal, y se define como la división entre las MGTs post-vacunales y las MGTs pre-vacunales.

Estos parámetros sirven para evaluar si una vacuna ha sido eficaz o no frente a un subtipo de gripe en una población concreta, debiendo cumplir como mínimo uno de los tres requisitos establecidos por la EMA (119,130). Esto 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.

Sistema de Vigilancia de la Gripe en España (SVGE)

En España existe un sistema de vigilancia epidemiológica especial para la gripe mediante redes de médicos centinelas y laboratorios con capacidad de detección y aislamiento del virus de la gripe, denominado Sistema de Vigilancia de Gripe en España (SVGE). En el territorio español existen 20 laboratorios con capacidad de detección y aislamiento de virus gripales. Tres de ellos son Centros Nacionales de Gripe reconocidos por la OMS, que están ubicados en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III y el Hospital Clínico de Barcelona. El conjunto de estos 20 laboratorios está coordinado por el Centro Nacional de Referencia de Gripe, el Centro Nacional de Microbiología (CNM).

El SVGE engloba diferentes fuentes y sistemas de información, entre ellos, un estructurado Sistema centinela de vigilancia de gripe (ScVGE). El ScVGE está formado por redes centinela sanitarias dispuestas por Comunidades Autónomas, cuyo cometido es el conocimiento de la incidencia de la gripe, así como proporcionar datos sociodemográficos de los pacientes afectados y la caracterización de los virus circulantes. En la comunidad de Castilla y León, la vigilancia de la gripe se realiza a través del Centro Nacional de Gripe en Valladolid (NIC Valladolid) y la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León (RCSCyL) (131,132). La labor investigadora y de detección de virus gripales pertenecientes al territorio de Castilla y León se realiza en el Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario en coordinación con el mencionado NIC Valladolid. 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 (**Figura 11**).



FORMA DE CONTACTO

Red Centinela Sanitaria de Castilla y León Dirección General de Salud Pública
 Teléfono: (+34) 983413600x806358 Fax: (+34) 983413730 CorreoE: pvig@jcyl.es

INFORMACIÓN DE LA SEMANA

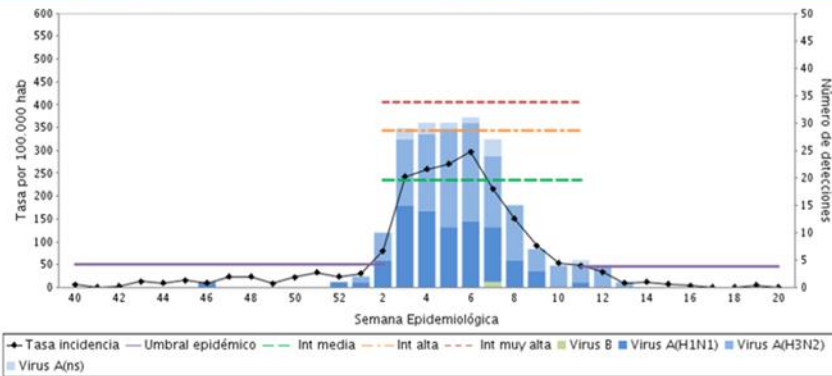
13/05/2019 al 19/05/2019

Número de casos 0
 Número de médicos declarantes 27
 Población cubierta 24.675
 Tasa de incidencia semanal por 100.000 hab.(1) 0
 Tasa estandarizada semanal por 100.000 hab. (2) 0

DATOS VIROLÓGICOS ACUMULADOS EN LA TEMPORADA

Número de frotis faríngeos de la Red Centinela Sanitaria procesados 342
 Número de detecciones en la Red Centinela Sanitaria 197

TASA DE INCIDENCIA SEMANAL Y AISLAMIENTOS VIRALES



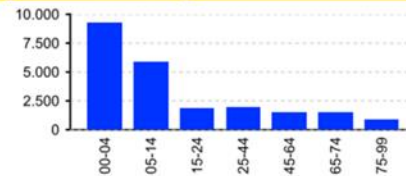
COMENTARIO

Sin actividad gripal en Castilla y León.

CASOS ACUMULADOS DE GRIPE POR EDAD Y ESTADO VACUNAL

	00-04	05-14	15-24	25-44	45-64	65-74	75-99	NC	Total
Vacunados	13	11	0	8	17	19	23	0	91
No vacunados	268	408	50	124	114	25	10	1	1000
Total	281	419	50	132	131	44	33	1	1091

TASA DE INCIDENCIA ACUMULADA POR EDAD (por 100.000 habitantes)



Valladolid, miércoles 22 de mayo de 2019

(1) Tasa estimada para Castilla y León
 (2) Tasa ajustada por la población española del padrón municipal de habitantes.
 (3) Los datos semanales se actualizan con las declaraciones recibidas después del cierre de la semana actual. Asimismo, los aislamientos notificados se actualizan en la semana correspondiente a la toma de frotis.

Figura 11. Informe semanal de la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León (RCSCyL).

Fuente: Informe epidemiológico de la semana 13/05/2019 al 19/05/2019. Programa de Vigilancia de la Gripe (PVIG).

Interés del proyecto

Las vacunas antigripales más usadas actualmente contienen HA y otros antígenos del virus que no se eliminan durante su elaboración. La HA es el único antígeno vacunal que se estandariza durante la producción de este tipo de vacunas, por lo que en su composición quedan restos de otros antígenos, entre ellos la NA, en cantidades no conocidas o no estandarizadas. La contribución de esta NA no estandarizada en la inmunogenicidad de la vacuna no es conocida, y menos la capacidad de protección serológica que puede implicar. En el presente trabajo, el análisis serológico frente a la HA y NA permitió realizar un estudio comparativo de la respuesta humoral frente a ambos antígenos.

El análisis serológico de Acs anti-HA así como de Acs anti-NA fue realizado mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (RIH) y el ensayo enzimático ligado a lectina (ELLA), respectivamente. El uso del protocolo ELLA en distintos laboratorios que trabajan con gripe es reciente (66,126). El consorcio de colaboración CONSISE (*Consortium for the Standardization of Influenza Seroepidemiology*) ha colaborado junto con distintos laboratorios en la optimización de esta técnica serológica, con el fin de estandarizar los protocolos existentes y buscar una buena reproducibilidad y aceptable variabilidad intra e inter-laboratorio en los resultados (68). Esto ha permitido la publicación de recientes trabajos que evalúan la implicación de la NA en la respuesta inmune humoral frente a la gripe, tanto de forma natural como con la vacunación. El ensayo ELLA es una técnica sólo llevada a cabo actualmente por un grupo reducido de laboratorios en el mundo, entre los que se encuentra el NIC de Valladolid. La realización del presente trabajo de investigación ha puesto a punto este método serológico en este centro, utilizando sueros pre y post-vacunales del programa de Vigilancia seroepidemiológica de la Gripe de la Junta de Castilla y León.

La limitada efectividad de las vacunas antigripales actuales estimula el interés por buscar nuevos diseños vacunales que incluyan nuevos antígenos del virus. Por ello, es necesario evaluar la respuesta inmune (tanto humoral como celular) frente a potenciales nuevos antígenos, como la NA, y buscar parámetros de protección serológica específicos frente a cada uno, que sean útiles para evaluar la eficacia serológica frente a dichos antígenos. Así, es necesario comprobar algunos parámetros

como: correlatos de seroprotección de la NA para distintos grupos de población; relación de los anticuerpos frente a la NA y los observados frente a la HA; eficacia serológica de la vacuna basada en la medida de anticuerpos anti-NA siguiendo los parámetros de la Agencia Europea del Medicamento (EMA); relación de la respuesta humoral de la NA en función del tipo de vacuna; respuesta heterotípica frente a otras NAs del mismo y diferente clado; entre otros.

Como se ha comentado anteriormente, en este trabajo se analizaron los Acs anti-NA y anti-HA previos a la vacunación de la población a estudio, con el fin de conocer su inmunidad previa frente a cepas gripales clásicas y más recientes del subtipo A(H1N1) estacional y de la variante pandémica A(H1N1) pdm09. El motivo por el que se eligió el subtipo A(H1N1) en el estudio se debe a que es el subtipo gripal que más tiempo ha estado circulando en el ser humano desde el siglo XX. Los virus gripales del subtipo A(H1N1) estacional con los que se trabajó para analizar la presencia de Acs antigripales (anti-NA y anti-HA) fueron los siguientes: A/PR/8/1934, A/Weiss/1943, A/FM/1/1947, A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007. Estas cinco cepas gripales fueron escogidas porque representan en orden cronológico algunas de las cepas más relevantes en la historia natural de este subtipo.

Las cepas A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943 son representantes de los virus gripales que circularon en las décadas de 1930 y 1940, siendo cepas derivadas de la Gripe Española. Dichas cepas fueron además los dos primeros virus que formaron parte de las primeras vacunas antigripales. En concreto, la cepa A/PR/8/1934 (denominada inicialmente como A0 siguiendo la nomenclatura antigua) fue la primera cepa incluida en la primera vacuna monovalente frente a la gripe (133), pero poco después tuvo que incluirse la cepa A/Weiss/1943 pues se comprobó que los virus de la gripe sufrían deriva antigénica, y por tanto era necesario actualizar las vacunas estacionales (17). De esta forma se creó la primera vacuna bivalente, integrada por dos cepas diferentes de un mismo subtipo.

Durante la década de los 40 surgió una cepa desligada de las anteriores, la cepa A/FM/1/1947 que se denominó como A-prime o A'). Esta cepa surgió de un *drift* antigénico mucho mayor a lo esperable tras una epidemia estacional, causando lo que algunos autores denominaron como la pseudo-pandemia de 1947 (40). Por otro lado,

los análisis serológicos se realizaron también frente a cepas más recientes del subtipo A(H1N1) clásico, las cuales pudieran haber primo-infectado a aquellos individuos más jóvenes (15-64 años). La cepa A/Brazil/11/1978 se eligió por estar relacionada directamente con la cepa A/USSR/90/1977, siendo esta la cepa del subtipo A(H1N1) clásico que re-emergió en 1977. Por otra parte, la cepa A/Brisbane/59/2007 fue la última cepa vacunal del subtipo A(H1N1) clásico antes de su extinción en el año 2009. Por último, la cepa A/California/7/2009 (A(H1N1)pdm09) se seleccionó como representante del subtipo pandémico debido a la reciente pandemia de gripe porcina acontecida en 2009. Esta cepa es la única del subtipo A(H1N1) que estaba incluida en las vacunas analizadas en este trabajo.

Objetivos

Objetivos

La respuesta inmune humoral frente a la hemaglutinina y la neuraminidasa de los virus de la gripe es uno de los elementos efectores o correlatos de inmunidad tras la vacunación estacional de gripe más empleados. Su análisis debe permitir aportar nuevos conocimientos que sirvan a las nuevas aproximaciones vacunales.

La hipótesis de este trabajo fue determinar si existen diferencias cuantitativas y cualitativas en la respuesta inmune humoral de Acs inhibidores de la hemaglutinina respecto a la de la neuraminidasa y en la eficacia vacunal en términos de respuesta serológica frente a dichos correlatos.

Objetivos principales:

El objetivo principal fue determinar la seroprotección basal y la respuesta serológica después de la vacunación antigripal estacional en la población a estudio, evaluando el efecto de dicha vacunación en la inducción de respuestas humorales protectoras frente a virus de la gripe del subtipo A(H1N1) clásico y de la variante pandémica A(H1N1) pdm09.

Implementar la técnica serológica ELLA (*Enzyme-Linked Lectin Assay*) paralelamente a la Reacción de Inhibición de Hemaglutinación (RIH) para el análisis serológico de Acs antigripales frente a la neuraminidasa y la hemaglutinina antes y después de la vacunación antigripal en la población Castellano-leonesa.

Objetivos secundarios:

1. Analizar los anticuerpos (Acs) basales anti-NA y anti-HA previos a la vacunación en la población de estudio frente a virus de la gripe de subtipo A (H1N1) clásico y de la variante pandémica A (H1N1) pdm09.
2. Analizar las diferencias serológicas basales de Acs anti-NA y Acs anti-HA frente a las cepas gripales A (H1N1) en función de la edad.
3. Evaluar la respuesta humoral (Acs anti-NA y anti-NA) homóloga frente a la variante pandémica A (H1N1) pdm09 y heteróloga frente a cepas clásicas del subtipo A (H1N1) estacional tras la administración de la vacuna trivalente anual.
4. Evaluar diferencias en la respuesta serológica producida frente a la HA y la NA en función del tipo de vacuna administrada en la población.
5. Evaluar la eficacia de la respuesta humoral frente a la HA y la NA tras la inmunización con vacuna antigripal en individuos adultos y ≥ 65 años, con los parámetros de la EMA.
6. Establecer equivalencias entre los títulos de Acs observados frente a la HA (inhibición de hemaglutinación) y la NA (ELLA) para determinar de forma indirecta los correlatos de protección necesarios para la NA.

Material y métodos

Material y métodos

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio retrospectivo observacional y analítico donde se analizaron sueros pre y post-vacunales de dos grupos diferentes de individuos, una población mayor de 65 años y otra de individuos de edad comprendida entre 15 y 64 años. Estos sueros fueron obtenidos en dos campañas de vacunación consecutivas (2013-2014 y 2014-2015) a través de la RCSCyL, en las que se dispuso tanto del suero pre-vacunal como del suero post-vacunal del mismo individuo.

El estudio de la respuesta humoral de la población frente a virus de la gripe se centró en el análisis serológico de la producción de Acs específicos frente a la hemaglutinina y la neuraminidasa de virus de la gripe del subtipo clásico A(H1N1) y del subtipo pandémico A(H1N1)pdm09.

MATERIAL

Procedencia de las muestras

Las muestras serológicas de los dos grupos de población del estudio fueron obtenidas gracias a la RCSCyL. Esta recogida de muestras serológicas 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 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 (132,134). 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.

Población del estudio

Se eligieron dos cohortes de individuos, una población mayor de 65 años y otra de individuos de edad comprendida entre 15-64 años. Ambas cohortes habían sido vacunadas con vacuna trivalente estacional frente a la gripe durante las temporadas 2013-14 y 2014-15.

- Criterios de inclusión

Se incluyeron aquellos individuos mayores de 65 años y de 15-64 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 aseguraba 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 160 individuos, siguiendo el siguiente esquema:

- 40 individuos en la cohorte de individuos 15-64 años de la temporada estacional de gripe 2013-2014.
- 40 individuos en la cohorte de individuos ≥ 65 años de la temporada estacional de gripe 2013-2014.
- 40 individuos en la cohorte de individuos 15-64 años de la temporada estacional de gripe 2014-2015.
- 40 individuos en la cohorte de individuos ≥ 65 años de la temporada estacional de gripe 2014-2015.


Recogida y almacenamiento de muestras

La recogida de muestras serológicas se encuentra dentro del proyecto de “Vigilancia seroepidemiológica de la gripe en la población Castellana y Leonesa”, regulada por la Orden SAN/1593/2006 de 13 de octubre de 2006. Se obtuvo el consentimiento informado y el reclutamiento de los Pacientes se realizó de acuerdo con la Ley Orgánica de Protección de Datos, Derechos y Obligaciones del Paciente en materia de documentación clínica (BOE nº 298 de 14 de diciembre de 1999, Ley 41/2002). El formulario de consentimiento informado está dispuesto como Anexo I en el apartado de Anexos. Las muestras serológicas se obtuvieron a través de los médicos de la RCSCyL y fueron enviadas posteriormente al Centro Nacional de Valladolid (NIC de Valladolid). A su llegada al centro, se realizó una centrifugación de cada muestra a 3.500 rpm durante 10 minutos, y se recogió el 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 congeladores de -20°C hasta su uso.

Recogida de datos demográficos

Los datos demográficos de los individuos reclutados en el estudio fueron recogidos por 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 12 y Anexo II**). En el presente formulario 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.


Junta de Castilla y León
 Consejería de Sanidad
 Dirección General de Salud Pública

ANEXO II

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

**FICHA DE REMISION DE SUEROS PREVACUNALES Y POSTVACUNABLES
2016-2017**

ETIQUETA	<p>Qué se debe recoger: *5 prevacunales *5 postvacunales, 4 semanas después de la vacunación.</p>
----------	--

IDENTIFICACIÓN:

Apellidos: _____ Nombre: _____

Edad: ____ Sexo: ____

EXTRACCIÓN:

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

POBLACIÓN DE RIESGO:

1. Sano

2. Embarazada

3. Patología de riesgo

3. Otros: especificar _____

VACUNACIÓN:

Fecha: ____/____/____

Vacuna: _____ Lote: _____

Figura 12. Formulario de recogida de los sueros pre y post-vacunales del programa de vigilancia epidemiológica de la RCSCyL.

Vacunas administradas a la población de estudio

Los tipos de vacunas, el número de individuos en cada cohorte de población vacunados con cada tipo de vacuna y las cepas de gripales A y B incluidas en las temporadas vacunales anteriormente mencionadas se describen en las **tablas 3 y 4**. El

grupo de individuos de 15-64 años (denominado en este trabajo como grupo de adultos) fue vacunado con dos vacunas diferentes durante las dos temporadas analizadas, recibiendo en la temporada 2013-14 una vacuna inactivada de tipo fraccionada elaborada en cultivo en huevos embrionados, y en la temporada 2014-15 una vacuna inactivada de antígenos de superficie elaborada en cultivo celular. El grupo de mayores de 65 años fue vacunado en sendas temporadas de gripe con vacuna adyuvada inactivada. En la **tabla 5** se recogen las cepas utilizadas en la formulación de las vacunas trivalentes anuales administradas a las distintas cohortes de población en las temporadas incluidas en el estudio. Para el análisis de datos comparando ambos grupos de edad, los dos tipos de vacunas administradas a los individuos adultos se manejaron como un solo tipo de vacuna, vacuna de tipo inactivado no adyuvada. Sin embargo, para la comparación de ambas cohortes de población joven-adulta entre las dos temporadas analizadas, las vacunas administradas fueron comparadas según su diferente método de producción como inactivada fraccionada (temporada 2013-14) e inactivada de antígenos de superficie (temporada 2014-15).

Tabla 3. Vacunas trivalentes estacionales utilizadas y número de sujetos vacunados con cada tipo de vacuna en la población de estudio.

	Grupo 15-64 años (nº individuos)	Grupo ≥ 65 años (nº individuos)
Temporada 2013-14	<i>Vaxigrip</i> ® (40)	<i>Chiromas</i> ® (40)
Temporada 2014-15	<i>Optaflu</i> ® (40)	<i>Chiromas</i> ® (40)

Tabla 4. Clasificación de las vacunas trivalentes estacionales utilizadas según tipo de vacuna y casa comercial.

Tipo de vacuna	Nombre comercial
Adyuvada	<i>Chiromas</i> ®
Fraccionada	<i>Vaxigrip</i> ®
Antígenos de superficie	<i>Optaflu</i> ®

Tabla 5. Cepas de gripe A y B incluidas en las vacunas trivalentes anuales administradas en las temporadas 2013-14 y 2014-15.

Cepa vacunal	Campaña vacunal	
	2013-2014	2014-2015
A(H1N1)	A/California/7/2009	A/California/7/2009
H3N2	A/Victoria/361/2011	A/Texas/50/2012
B	B/Massachusetts/2/2012 B/Brisbane/60/2008(cuadrivalente)	B/Massachusetts/2/2012 B/Brisbane/60/2008(cuadrivalente)

Cepas gripales A(H1N1) utilizadas en el estudio

Las cepas de gripe A(H1N1) analizadas en este trabajo fueron las siguientes: cinco cepas gripales diferentes del subtipo estacional A(H1N1) y una cepa del subtipo A(H1N1) pandémico. Para la determinación serológica de los Acs anti-gripales se ensayaron todos los sueros recogidos frente a cada una de las seis cepas gripales H1 utilizadas para este estudio, como fueron las siguientes:

Cepas del subtipo A(H1N1)

- A/Puerto Rico/8/1934
- A/Weiss/1943
- A/Fort Monmouth/1/1947 (A/FM/1/1947)
- A/Brazil/11/1978
- A/Brisbane/59/2007

Cepas del subtipo A(H1N1)pdm09

- A/California/7/2009

Estas cepas fueron escogidas por su relevancia en la historia natural del subtipo A (H1N1) desde su aparición en 1918 (36) hasta su extinción en el año 2009 con la aparición del nuevo subtipo pandémico A(H1N1)pdm09 (135). Las cepas A/PR/8/1934,

A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947 son tres cepas clásicas que representan la deriva antigénica de la Gripe Española antes de la desaparición del subtipo A(H1N1) en 1957. Estas tres cepas fueron además las primeras cepas de gripe H1 que se incluyeron en las primeras vacunas utilizadas en el ser humano. Tras la reemergencia de este subtipo en el año 1977 hasta su desaparición en el 2009, dos cepas clásicas relevantes del subtipo H1 estacional fueron las cepas A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007. A/Brisbane/59/2007 fue además la última cepa seleccionada como cepa vacunal del subtipo clásico A(H1N1) introducida en la vacuna antes la extinción de este subtipo, y A/California/07/2009 como la primera cepa del subtipo A(H1N1)pdm09.

Las diferentes cepas gripales A(H1N1) fueron obtenidas por el Centro Nacional de Gripe de Valladolid a través de distintos organismos:

- La cepa A/PR/8/1934 fue suministrada por el *National Institute for Biological Standards and Controls* (NIBSC, London, UK) donde fue previamente inactivada con beta-propiolactona para su uso en condiciones BSL-II.
- Las cepas *egg-adapted* A/Weiss/1943, A/FM/1/1947 y A/Brazil/11/1978 fueron suministradas por el *Francis Crick Institute London WHO Collaboration Centre* (London, UK) y propagadas en el NIC de Valladolid.
- Las cepas A/Brisbane/59/2007 y A/California/7/2009 fueron obtenidas de los reactivos de identificación de aislamientos de gripe suministrados por el *International Reagent Resource* (IRR), USA.

MÉTODOS

Propagación de virus en cultivo en embrión de pollo

Todas las cepas gripales comentadas anteriormente, con excepción de A/PR/8/1934, 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 ya que se trabajó en condiciones de bioseguridad adecuadas.

Para la realización del cultivo de virus en embrión de pollo así como de los estudios serológicos se dispuso de un laboratorio de Bioseguridad tipo II (BSL-II) para el manejo de los virus de la gripe utilizados. Este laboratorio está completamente equipado con el material inventariable y fungible necesario para la realización de los ensayos serológicos, así como para el cultivo de los virus que se utilicen en los experimentos.

Se realizó cultivo en huevos embrionados de gallina para aquellas cepas de gripe que iban a ser utilizadas en las pruebas serológicas, con la única excepción de A/Puerto Rico/8/1934). Para el cultivo, se seleccionaron huevos embrionados de gallina de 7-9 días de incubación (136). Inicialmente se realizó la observación del embrión en cuarto oscuro y con el fin de obtener un mayor rendimiento, se eliminaron aquellos huevos en los que no se observaba movimiento del embrión ni se apreciaban ramificaciones arteriovenosas como indicadoras de la viabilidad del embrión. Los huevos embrionados fueron lavados previamente a la inoculación del virus con una solución de yodo al 10% para evitar contaminaciones.

Con motivo de igualar presiones antes de inocular el virus, se realizaron pequeños orificios en la cámara de aire y en la cavidad alantoidea de cada huevo embrionado. Se inocularon 200 μ l del virus diluido al 1/10 mediante una jeringa de 1 ml graduada (136,137). Ésta se introduce de forma recta y aproximadamente las primeras dos terceras partes de la longitud de la aguja con el fin de depositar el virus en la cavidad alantoidea, sellando posteriormente los orificios de inoculación con parafina para mantener las condiciones asépticas del cultivo (**Figura 13**). Finalmente, los huevos inoculados fueron incubados durante 3 días a 35°C hasta realizar la recogida o *harvesting* del líquido alantoideo (LAL).

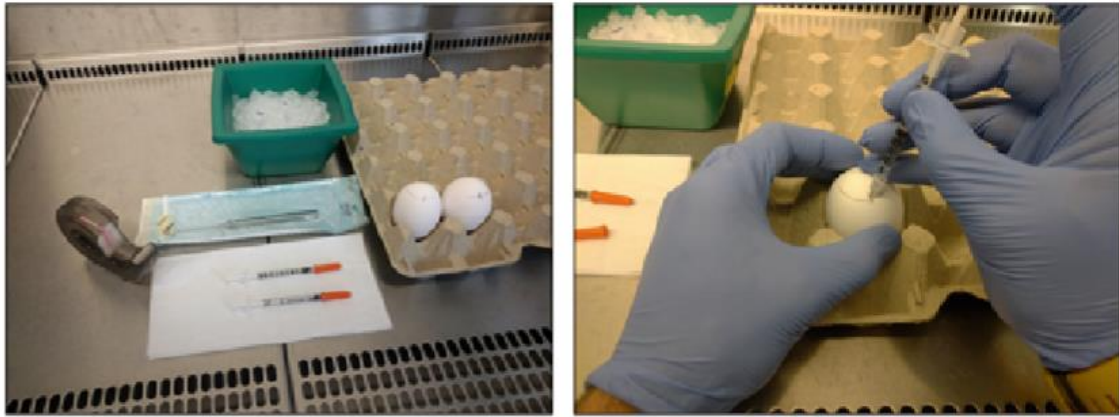


Figura 13. Proceso de inoculación manual de virus de la gripe en huevos embrionados de gallina. Extraído y modificado de: Karakus U. *et al. Methods Mol Biol* 2018 (1836):59-88 (137).

Previamente a la recogida del LAL, los huevos inoculados con el virus fueron almacenados a -20°C durante 45 minutos con el fin de eutanasiar al embrión siguiendo los principios de Bioética y Bienestar Animal. De este modo, se permite además una recogida más limpia del LAL debido a la retracción capilar que ocurre debido a las bajas temperaturas. Posteriormente se procedió, con ayuda de unas tijeras previamente esterilizadas, a la apertura del cascarón del huevo a través de la cámara de aire, recogiendo el LAL mediante pipetas Pasteur estériles y almacenándolo en tubos estériles de 20 ml (**Figura 14**). 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 en huevo embrionado de gallina para obtener mayor carga viral. Los LAL obtenidos del primer y segundo pase fueron almacenados en tubos eppendorf de 1,5 ml a -80°C hasta su uso.



Figura 14. Proceso de recogida o *harvesting* del líquido alantoideo (LAL). Extraído y modificado de: Karakus U. *et al. Methods Mol Biol* 2018 (1836):59-88 (137).

Análisis filogenético de las cepas gripales A(H1N1) incluidas en el estudio

Con el objeto de conocer la distancia genética y la relación filogenética de las cepas de gripe A(H1N1) utilizadas en los estudios serológicos, se realizó un análisis de las secuencias del gen de la HA y del gen de la NA de las cepas gripales A(H1N1) incluidas en el estudio. En dicho análisis se incluyeron además cepas de gripe pertenecientes al resto de subtipos de HA y NA descritos hasta el momento para realizar un árbol filogenético completo.

Se realizó un análisis filogenético del gen de la NA de las cepas del subtipo A(H1N1) y del subtipo A(H1N1) pdm09 así como de cepas de subtipos diferentes para estudiar las relaciones filogenéticas entre esos virus. Las secuencias de las cepas de gripe utilizadas en este estudio filogenético fueron extraídas de las bases de datos *GISAID* e *Influenza Research Database* (IRD). En la **Tabla 6** se detalla el número de acceso de cada una:

Tabla 6. Código de acceso de las secuencias del gen de la NA de las cepas gripales A utilizadas en el estudio y de cepas pertenecientes a otros subtipos A gripales.

Subtipo	Cepa	Código acceso
A(H1N1)	A/PR/8/1934	EPI131282
	A/Weiss/1943	AF494247
	A/FM/1/1947	U02085
	A/Brazil/11/1978	EPI57802
	A/Brisbane/59/2007	CY163776
	A/California/07/2009	CY121680
A(H2N2)	A/Albany/22/1957	CY022013
A(H3N2)	A/Wisconsin/67/2005	CY163912
A(H4N2)	A/HongKong/951/1980	EPI3069
A(H5N1)	A/HongKong/378.1/2001	GU052089
A(H6N1)	A/China/G90/2011	EPI1303375
A(H7N3)	A/Canada/rv504/2004	CY015006
A(H8N1)	A/Netherlands/7/2015	EPI1307201
A(H9N2)	A/HongKong/1074/1997	EPI1061134
A(H10N1)	A/Bangladesh/8988/2010	EPI1226301
A(H11N1)	A/Alberta/380/2017	EPI1304255
A(H12N1)	A/Netherlands/83/2008	EPI1307508
A(H13N1)	A/Netherlands/23/2011	EPI1307686
A(H14N1)	A/Wisconsin/10OS3941/2010	EPI419084
A(H15N1)	A/Australia/341/1983	EPI3179
A(H16N1)	A/New Jersey/UGAI15-3459/2015	EPI1305464
A(H17N1)	A/Guatemala/060/2010	EPI356309

Se realizó de igual manera un análisis filogenético del gen de la HA de las cepas del subtipo A(H1N1) y del subtipo A(H1N1) pdm09 así como de cepas de subtipos diferentes para estudiar las relaciones filogenéticas entre esos virus. Las secuencias de las cepas de gripe utilizadas en este estudio filogenético fueron extraídas de las bases de datos *GISAID* e *Influenza Research Database (IRD)*. En la **Tabla 7** se detalla el número de acceso de cada una:

Tabla 7. Código de acceso de las secuencias del gen de la HA de las cepas gripales A utilizadas en el estudio y de cepas pertenecientes a otros subtipos A gripales.

Subtipo	Cepa	Código acceso
A(H1N1)	A/PR/8/1934	EPI242408
	A/Weiss/1943	EPI230628
	A/FM/1/1947	EPI241812
	A/Brazil/11/1978	EPI57807
	A/Brisbane/59/2007	EPI502144
	A/California/07/2009	EPI680484
A(H2N2)	A/Albany/22/1957	CY502145
A(H7N3)	A/Canada/rv504/2004	CY06116
A(H1N4)	A/Zhejiang/476/2013	EPI764814
A(H1N5)	A/New Jersey/Sg-00544/2008	EPI455553
A(H1N6)	A/California/10064/2008	EPI328172
A(H1N7)	A/Wisconsin/16OS4004/2016	EPI1154737
A(H1N8)	A/Korea/A10/2012	EPI1147945
A(H1N9)	A/Zhejiang/51043/2015	EPI1061190

Las secuencias de los genes de NA y HA fueron alineadas usando el algoritmo de ClustalW BioEdit 7.2.3. El análisis filogenético se realizó utilizando el software MEGA 5.2. (Mega Software, Tempe, AZ, USA) y el mejor modelo de sustitución de nucleótidos fue predicho por la herramienta *Best-Fit*. El modelo “General Time Reversible” con tasas distribuidas por rayos gamma, obtuvo la puntuación más alta del criterio de información bayesiano. La reproducibilidad del árbol filogenético fue garantizada por un análisis de arranque de 1.000 réplicas. También se construyó una matriz de similitud genética esta vez únicamente para la neuraminidasa N1 y la hemaglutinina H1 de las cepas gripales A(H1N1) incluidas en el estudio, utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud. La similitud genética entre los diferentes virus de la gripe A(H1N1) y A(H1N1) pdm09 se expresó como porcentaje de la homología genética (% de similitud/100).

Análisis serológicos para evaluar la presencia de anticuerpos frente a la gripe y de la respuesta humoral a las vacunas estacionales. Ensayo ELLA y RIH

El análisis serológico de los sueros en el presente trabajo fue realizado mediante ensayo enzimático ligado a lectina (*Enzyme-Linked Lectin Assay*, ELLA) y mediante la reacción de inhibición de hemaglutinación (RIH) para analizar los anticuerpos anti-gripales dirigidos frente a la neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) respectivamente. Estos análisis fueron realizados en los sueros pre y post-vacunales.

En este primer apartado del análisis serológico se describe el fundamento del ensayo ELLA para la medición del título de Acs anti-NA así como su protocolo de trabajo.

- **Fundamento del ensayo ELLA – Análisis de Acs frente a la NA**

El ensayo ELLA es un método práctico para medir los títulos de Acs anti-NA en suero. Aunque el ensayo ELLA fue descrito por Lambré y colaboradores en 1990, su aplicación como ensayo serológico ha sido más reciente, utilizándose por algunos laboratorios como método para medir los títulos de Acs anti-NA en muestras clínicas. En el presente trabajo, la determinación de la presencia de Acs anti-NA en sueros pre y post-vacunales en población vacunada frente a la gripe se realizó mediante el ensayo ELLA.

El ensayo ELLA se lleva a cabo en placas de 96 pocillos con fondo plano recubiertas con fetuína, una proteína de suero altamente glucosilada, como sustrato para la NA. Si existe actividad neuraminidasa en la suspensión preparada por acción enzimática de este antígeno viral, se liberan los ácidos siálicos terminales de la estructura glucoproteica de la fetuína, dejando al descubierto el penúltimo azúcar, la galactosa. La cantidad de ácido siálico liberado se determina químicamente mediante un conjugado enzimático. La intensidad de la reacción colorimétrica se puede cuantificar mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. La densidad óptica (DO) medida va a ser proporcional a la actividad de la NA viral.

Siguiendo el esquema representado en la **figura 15**, los pasos a realizar en este ensayo serológico se pueden resumir en lo siguiente:

1. Al añadir distintas diluciones del virus, la actividad neuraminidasa de este escindiría el ácido siálico de la fetuína (sustrato) y deja libre los terminales de galactosa de la misma (el virus “desializa” la fetuína).
2. La aglutinina derivada del cacahuete (PNA, *Peanut Agglutinin*) es una lectina con especificidad para la galactosa que se une a residuos terminales de galactosa. La liberación de los residuos de la galactosa de la fetuína puede ser cuantificada utilizando un conjugado de PNA con peroxidasa de rábano picante (HRPO, *Horseradish Peroxidase*) denominado como PNA-HRPO (aglutinina-peroxidasa).
3. Se añade el sustrato (OPD, *o-Phenylenediamine Dihydrochloride*) cromógeno específico de la peroxidasa. La reacción enzimática del conjugado PNA-HRPO con el sustrato OPD da lugar a un cambio de color que puede ser medido mediante el análisis de absorbancia a una λ de 490 nm. La densidad óptica (DO) medida va a ser proporcional a la actividad de la NA del virus.

Con este ensayo serológico se puede determinar la actividad NA del virus, pudiendo además determinar de manera indirecta la presencia o no de Acs anti-NA en el suero humano y su título. Si se parte de un ensayo en el que trabajamos con diluciones seriadas de un suero problema y con un virus gripal determinado, los Acs anti-NA que hubieran presentes en el suero problema bloquearían la acción enzimática sobre el sustrato de fetuína por parte de la NA de la cepa gripal. Considerando que la DO es directamente proporcional a la actividad NA del virus, la cantidad de anticuerpos anti-NA será inversamente proporcional a la DO observada.

1. Placa revestida de fetuína

Fetuína: fracción proteica – fracción glucídica – galactosa – ác. siálico

2. Adición del virus gripal o cantidad estandarizada de neuraminidasa (NA)

Fracción proteica – fracción glucídica – galactosa $\xrightarrow{\text{NA}}$ ác. Siálico

Fracción proteica – fracción glucídica – galactosa

3. Adición del conjugado enzimático (PNA-HRPO)

Fracción proteica – fracción glucídica – galactosa: PNA-HRPO

4. Adición del sustrato cromógeno (OPD)

Fracción proteica – fracción glucídica – galactosa: PNA-HRPO $\xrightarrow{\text{OPD}}$ Señal (DO)




Figura 15. Esquema general del ensayo enzimático ligado a lectina (ELLA) para la determinación enzimática de la glucoproteína Neuraminidasa (NA). Extraído y modificado de: Food and Drug Administration (FDA) (138).

- **Protocolo de trabajo del ensayo ELLA**

El ensayo serológico ELLA fue inicialmente descrito por Lambré *et al.*, en 1990 (125), pero su aceptación como un ensayo serológico estándar ha sido más reciente, con numerosos laboratorios que realizan el ensayo para medir los títulos de Acs anti-NA en muestras clínicas (66,68,73,126). El protocolo del ensayo ELLA descrito a continuación hace referencia al formato práctico que actualmente siguen los laboratorios para la evaluación de rutina de la respuesta de anticuerpos humanos frente a la NA gripal.

Preparación de las placas recubiertas de fetuína

Para el ensayo ELLA, se requiere recubrir placas de 96 pocillos y fondo plano en el laboratorio con fetuína antes de realizar los experimentos. Se describen a continuación:

1. Preparar una solución tampón mediante la mezcla de 10 ml de tampón de recubrimiento (10x coating buffer) con 90 ml de agua desionizada.
2. Preparar una solución de stock de fetuína a 25 mg/ml en 100 ml de tampón de recubrimiento. Esta solución de stock de fetuína se va a almacenar en alícuotas de 1 ml a -20 ° C.
3. Inmediatamente antes de cada ensayo serológico, se debe preparar una solución de trabajo de fetuína (25 µg/ml) para revestir las microplacas de 96 pocillos. Para conseguir esa solución trabajo de fetuína, se diluye 1 ml de fetuína a 25 mg/ml (preparada en el paso 2) en 99ml de tampón de recubrimiento.
4. Utilizar una pipeta multicanal para dispensar 100 µl de la solución de trabajo de fetuína en cada uno de los 96 pocillos de cada placa.
5. Cubrir cada placa con un papel transparente y luego colocar las placas en grupos de 10.
6. Colocar las placas en un refrigerador (2-8 ° C) durante al menos 18 h antes de realizar un ensayo. Las placas pueden estar almacenadas con la solución de fetuína a 2-8 ° C durante un máximo de 2 meses antes de realizar los ensayos.

Titulación de los virus de la gripe

Para poder realizar los ensayos serológicos, es necesario realizar una titulación previa de los virus de la gripe para realizar diluciones homogéneas del virus para los test. Esta titulación fue realizada para cada uno de los distintos virus gripales para los que se realizaron los ensayos serológicos.

La titulación de los virus supone un paso en el ensayo que necesita de dos días para su realización. El primer día se preparan las diluciones del virus, que se transfieren a una placa revestida de fetuína y se deja incubar de 16 a 18 horas a 37°C. Al segundo día se añade el complejo enzimático (enzima y sustrato cromóforo) y se lee la reacción enzimática que nos dará el título del virus, pudiendo calcular posteriormente la dilución estandarizada necesaria para el ensayo ELLA. Este paso de titulación del virus se ha de realizar cada vez que se haga un nuevo ensayo ELLA.

Para la titulación de cada uno de los diferentes virus gripales a ensayar se siguieron detalladamente los siguientes pasos:

A) Preparación de la dilución del virus (Figura 16):

1. Descongelar un tubo eppendorf del virus y conservar en hielo. No es aconsejable volver a congelar por la posible pérdida de carga viral.
2. Utilizar placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en "U" para la dilución del virus.
3. Alicuotar 120 µl de diluyente en cada pocillo de la columna 2 a la columna 11.
4. Alicuotar 216 µl de diluyente en cada pocillo de la columna 1.
5. Vortear el vial del virus y añadir 24 µl de virus a la columna 1. Esto da una dilución inicial del virus 1:10 (24 µl virus/240 µl).
6. Realizar diluciones seriadas del virus, transfiriendo 120 µl de la columna 1 hasta la columna 12, desechando los últimos 120 µl.

Hasta este paso se realizan las diluciones seriadas del virus en una placa de microtitulación estéril, no revestida de fetuína. A continuación, se transfieren las diluciones seriadas del virus a una placa recubierta de fetuína.

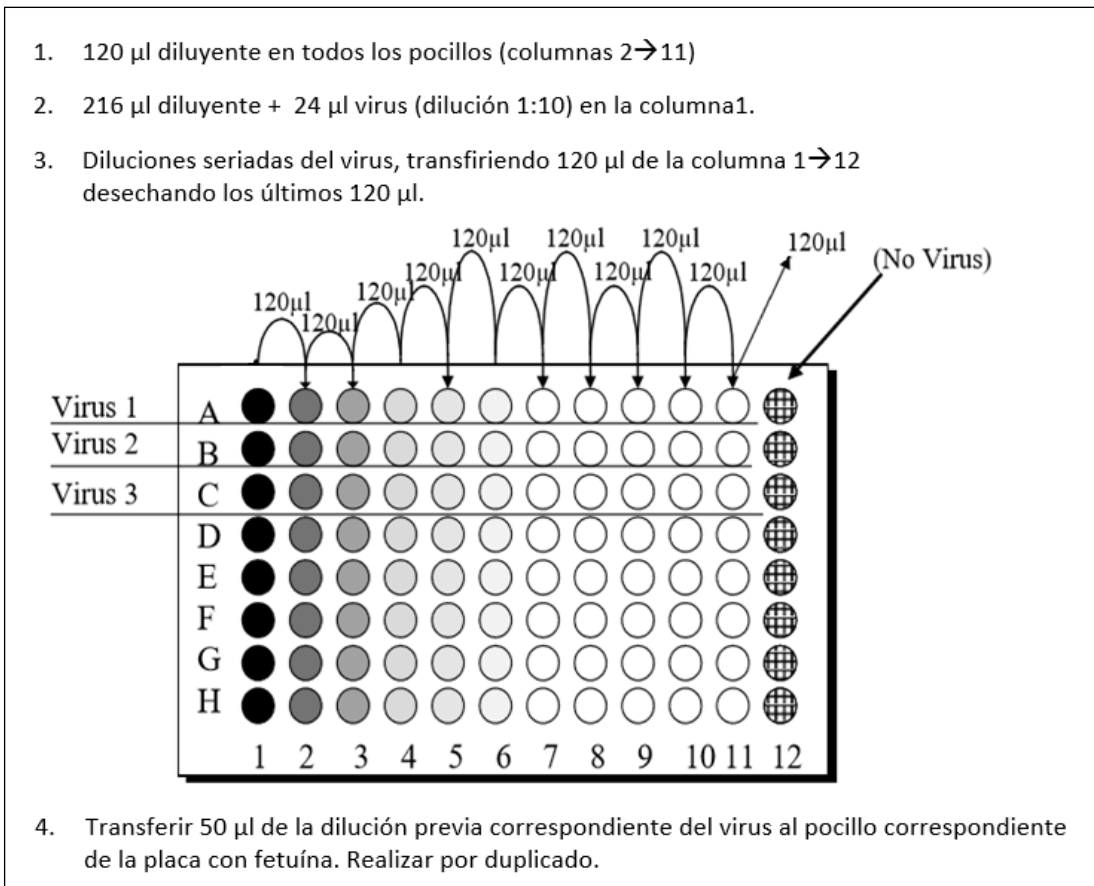


Figura 16. Esquema de la preparación de diluciones seriadas del virus para su titulación. Extraído y modificado de: Gao J. *et al. J Vis Exp* 2016 (115): e54573 (67).

B) Transferir las diluciones seriadas del virus a una placa revestida de fetuína:

1. Lavar las placas revestidas de fetuína previamente 3 veces con PBS-Tween.
Quitar el exceso del buffer con papel absorbente para eliminar el exceso de las paredes de los pocillos.
2. Añadir 50 μ l de diluyente de la columna 1 a la columna 11 en la placa revestida de fetuína.
3. Añadir 100 μ l de diluyente a la columna 12 (control negativo).

4. Transferir 50 μ l de la dilución previa correspondiente del virus (de la placa U estéril) al pocillo correspondiente de la placa con fetuina. Realizar por duplicado.
5. Cubrir cada placa con un adhesivo de aluminio o transparente.
6. Incubar las placas a 37 °C durante al menos 16-18 horas.

C) Medir la actividad enzimática de la neuraminidasa (NA) del virus:

1. Destapar las placas.
2. Lavar 6 veces con el PBS-Tween y eliminar todo el exceso con papel absorbente.
3. Añadir 100 μ l del conjugado PNA-HRPO en todos los pocillos.
4. Incubar las placas durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Preparar el sustrato OPD 15 minutos antes del siguiente paso.
6. Lavar las placas 6 veces con la solución de lavado PBS-T.
7. Añadir 100 μ l del sustrato OPD a todos los pocillos.
8. Incubar las placas durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
Durante este tiempo controlar la variación del color.
9. Parar la reacción enzimática con 100 μ l de ácido sulfúrico a concentración 1 N.
10. Leer las placas a 490 nm.

D) Análisis y selección de la dilución del virus para el ensayo ELLA:

1. Usar el programa Excel para hacer gráfica de los valores de densidad óptica (DO) a 490 nm respecto a las diluciones de virus.

2. Observar la curva de titulación del virus, identificando la señal máxima y la mínima (control negativo/no virus) y la relación lineal de la curva de las distintas diluciones del virus.
3. Para mejorar la precisión y sensibilidad, seleccionar una dilución del virus que a 490 nm ofrezca una señal cercana a la máxima, pero dentro de la línea de la meseta. La dilución del virus más apropiada es aquella que corresponda a un 90-95 % de la señal máxima (generalmente 1/60, 1/80...) (**Figura 17**). Dicha dilución del virus debe usarse para todos los ensayos con el mismo stock del virus. Una vez realizada la titulación de cada virus, se procede al montaje del ensayo ELLA trabajando con los sueros problema y el virus en placas de fetuina.

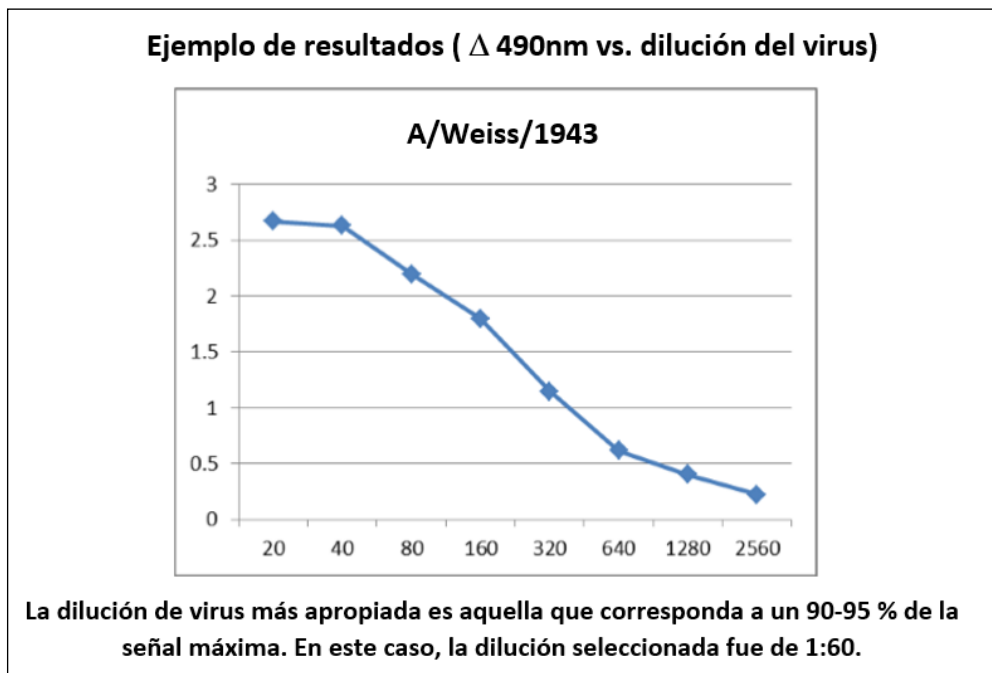


Figura 17. Ejemplo de lectura de la titulación de la cepa A/Weiss/1943. La dilución óptima se encontrará en el 90-95% de la señal máxima, que en este ejemplo se corresponde con una dilución 1/80. Extraído y modificado de: Gao J. *et al. J Vis Exp* 2016 (115): e54573 (67).

Tratamiento previo de los sueros

La presencia de inhibidores inespecíficos de la actividad NA en los sueros humanos puede provocar resultados anómalos en el ensayo ELLA, por lo que es necesaria su eliminación previamente a la realización de los experimentos. Estos inhibidores inespecíficos son generalmente termolábiles y destruidos mediante un tratamiento térmico. Con el fin de evitar descongelaciones múltiples, todos los sueros (pre y post-vacunales) fueron previamente alicuotados en seis alícuotas destinadas cada una de ellas para el ensayo frente a cada uno de los virus del estudio. Cada alícuota de suero se incubó previamente a cada ensayo en un baño de agua a 56 °C durante 45-60 minutos.

Ensayo enzimático ligado a lectina (ELLA) de los sueros

A) Preparación de diluciones seriadas de las muestras de suero (Figura 18):

1. Colocar las muestras de suero inactivadas por calor en el hielo.
2. Para un conjunto de 8 sueros a testar por placa, realizar una dilución inicial de 1:10 de los sueros. Para ello, en la columna 2, añadir 216 μ l de diluyente y 24 μ l de cada muestra de suero. Mezclar la muestra en el pocillo pipeteando arriba y abajo 3 veces para conseguir una dilución de la muestra homogénea.
3. Añadir 120 μ l de diluyente a todos los pocillos de las columnas 3-11.
4. Realizar diluciones del suero, transfiriendo 120 μ l de la columna 2 hasta la columna 11, desechando los últimos 120 μ l.

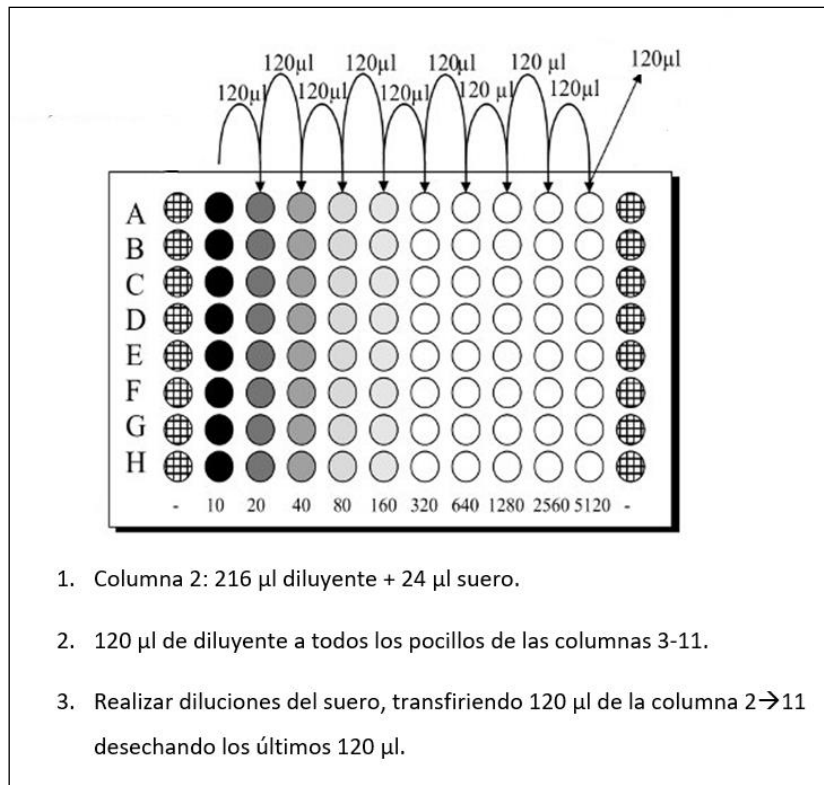


Figura 18. Preparación de diluciones seriadas de las muestras de suero para la realización del ensayo ELLA. Extraído y modificado de: Gao J. *et al. J Vis Exp* 2016 (115): e54573 (67).

B) Preparación de los virus a testar en el ensayo:

1. Descongelar un vial de virus, vortear y resuspender el virus en el diluyente para conseguir la dilución del virus seleccionada previamente en la titulación del virus.
2. Preparar al menos 5 ml de suspensión de virus por cada placa de ensayo. Mantener la dilución del virus en hielo o refrigerada a 5°C hasta que se laven las placas y las muestras de suero se hayan añadido a la placa.

C) Adición de las diluciones seriadas de los sueros y suspensión de virus a la placa revestida de fetuína:

1. Decidir sobre el número de placas recubiertas de fetuína que son necesarias para el ensayo (generalmente se ensayan 4 sueros por placa, de modo que cada suero se testa por duplicado).

2. Se lavan las placas revestidas de fetuína 3 veces con PBS-Tween. A continuación, se invierten las placas sobre una toalla de papel absorbente para eliminar el exceso de tampón de lavado.
3. Utilizar una pipeta multicanal para transferir 50 µl de cada dilución del suero de la placa de dilución a la placa revestida de fetuína siguiendo la misma disposición de los pocillos (de columna 2 a columna 11). Tener en cuenta que del pocillo de la placa de dilución (con fondo en “U”) se debe transferir dos veces consecutivas a la placa con fetuína para conseguir una transferencia de las diluciones seriadas de cada suero por duplicado (es decir, se utilizan dos filas consecutivas de la placa de fetuína para cada suero).
4. Añadir 50 µl de virus diluido a todos los pocillos excepto en la columna del control negativo (columna 12).
5. Añadir 50 µl de diluyente a todos los pocillos de la columna 12 (control negativo).
6. Cubrir cada placa con un adhesivo de aluminio o transparente. A continuación agitar suavemente las placas de forma manual o mediante la colocación de éstas en un agitador de placas a velocidad moderada durante 10 segundos para conseguir una correcta mezcla de virus y suero en todos los pocillos
7. Incubar las placas a 37 °C durante al menos 16-18 horas.

D) Adición del conjugado enzimático y sustrato para la lectura de placas:

1. Lavar las placas 6 veces con tampón de lavado (PBS-Tween). A continuación, se invierten las placas sobre una toalla de papel absorbente para eliminar el exceso de tampón de lavado.
2. Añadir 100 µl a cada pocillo de la solución PNA-HRPO (a la dilución predeterminada 1:1000).
3. Incubar las placas durante 2 horas a T ambiente.
4. Lavar las placas 3 veces con tampón de lavado (PBS-Tween) y secar con el papel absorbente para eliminar el exceso remanente.

5. Añadir 100 µl del sustrato OPD a todos los pocillos.
6. Incubar las placas durante 10 min a T ambiente en oscuridad. Durante este tiempo ir controlando que va variando el color.
7. Parar la reacción enzimática con 100 µl de ácido sulfúrico a concentración 1 N.
8. Leer placas a 490 nm.

E) Análisis de los resultados y cálculo del título de Acs anti-NA de los sueros:

E.1. Determinar la validez de los resultados del ensayo:

1. Confirmar que los valores del control negativo (sin virus y sin suero) están a menos del 10% del valor de la señal analítica emitida (DO) por el control positivo (virus y no suero).
2. Confirmar que las mediciones de densidad óptica (DO) de los pocillos de control negativo son consistentes ($\leq 20\%$ de diferencia) y que las mediciones de densidad óptica de los pocillos para muestras duplicadas de sueros son consistentes ($\leq 10\%$ de diferencia).
3. Determinar la causa raíz de los resultados no válidos y repetir el ensayo si los criterios enumerados anteriormente no se cumplen.

E.2. Cálculo del título de Acs anti-NA de los sueros:

1. Para cada placa de ensayo, se calcula la media de los valores de densidad óptica (DO) de todos los pocillos del control negativo (columna 12). Este valor promedio hace referencia al “ruido de fondo” o “background” de cada lectura de placa.
2. Restar el “ruido de fondo” a todas las lecturas.
3. Calcular el porcentaje de inhibición a cada dilución de suero usando la fórmula:

$$[(DO \text{ control de virus} - DO \text{ suero}) / DO \text{ control de virus}] \times 100$$

4. Identificar la más alta dilución del suero que produce al menos un 50% de la inhibición de la máxima señal. Esa dilución de suero seleccionada es la que produce un 50 % de la inhibición de la actividad del virus (**Figura 19**).
5. Reportar el recíproco de esta dilución, que corresponde con el título de Acs anti-NA en dicho suero frente a la cepa de virus estudiada.

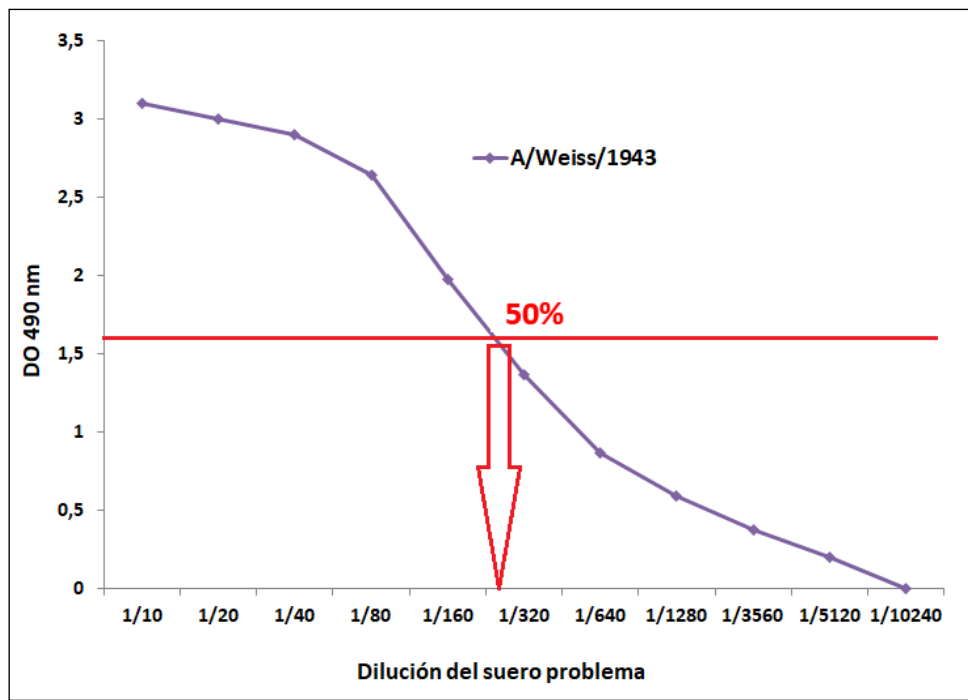


Figura 19. Cálculo del título de Acs anti-NA en el suero problema: identificar la dilución más elevada del suero que produce al menos un 50% de la inhibición de la señal máxima. El recíproco de esta dilución corresponde al título de Acs anti-NA del suero problema frente a la cepa de virus estudiada (A/Weiss/1943 en este caso).

En la **figura 20** se representa un ensayo serológico ELLA realizado frente a las cinco cepas gripales del subtipo A(H1N1) estacional y la cepa A/California/7/2009 (A(H1N1) pdm09), incluidas en este trabajo.

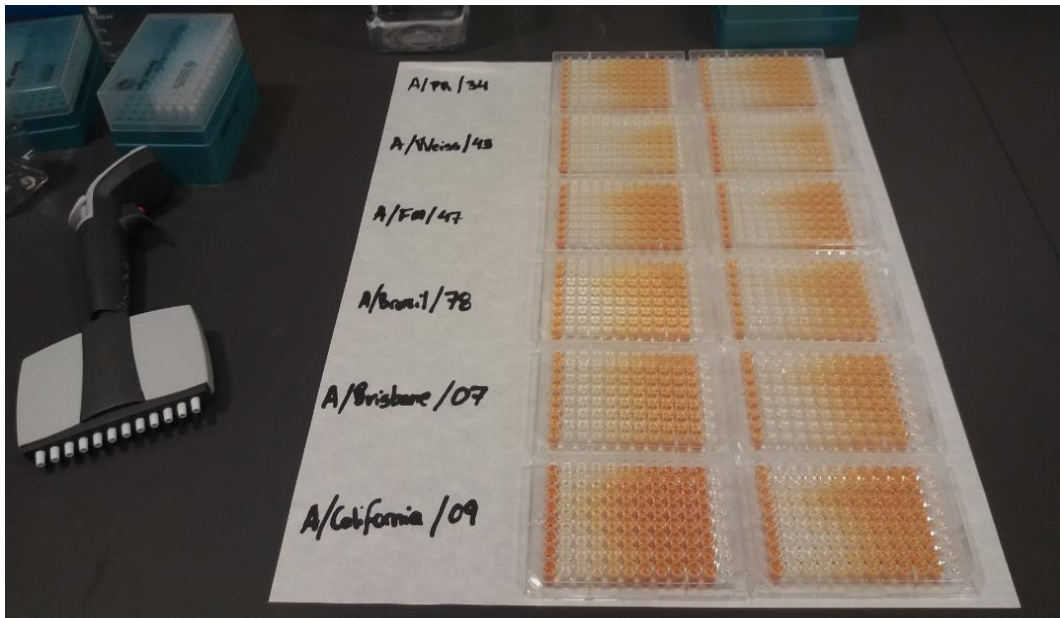


Figura 20. Ensayo serológico ELLA frente a las cinco cepas gripales del subtipo A(H1N1) estacional y la cepa A/California/7/2009 (A(H1N1) pdm09), incluidas en este trabajo.

- **Fundamento del ensayo RIH - Análisis de Acs frente a la HA**

El análisis serológico de los sueros en el presente trabajo fue realizado también mediante reacción de inhibición de hemaglutinación (RIH). Este ensayo permite analizar la presencia de anticuerpos frente a la cabeza de la hemaglutinina de los virus de la gripe.

La RIH es el método más utilizado actualmente para detectar y cuantificar Acs frente a la HA de virus de la gripe en muestras serológicas, tanto humanas como animales (117–119). Esta metodología es utilizada en muchos laboratorios para analizar la respuesta humoral a la vacunación, para realizar estudios de eficacia serológica vacunal, así como estudios seroepidemiológicos con el fin de analizar la susceptibilidad de distintas poblaciones frente a la gripe (44,120,121). El ensayo RIH es una técnica utilizada para realizar la caracterización antigénica de los virus de la gripe utilizando antisueros de animales previamente infectados. Es además 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 (65,119).

Este método serológico está basado en la capacidad de los virus de la gripe en aglutinar hematíes de diferentes especies animales. La aglutinación ocurre a través de la unión de la HA del virus al ácido siálico presente en la superficie de los hematíes. El número de hematíes aglutinados es proporcional al contenido de HA y puede utilizarse para estimar la cantidad de virus que existe en una dilución. Así mismo, en presencia de un suero que posea Acs específicos frente a un virus, estos formarán con el virus un complejo antígeno-anticuerpo que inhibirá la unión del virus con los hematíes. El procedimiento clásico de la RIH utiliza una suspensión del 0,5 % de hematíes mezclados e incubados con la suspensión del virus, con un control negativo que sólo contiene hematíes, y un control positivo que contiene hematíes y viriones (139).

El ensayo de RIH implica la interacción de hematíes, anticuerpos inhibidores específicos de la HA (Acs anti-HA) y virus de la gripe. Pueden ocurrir tres supuestos en este ensayo serológico cuando se realiza en placas de microtitulación con fondo en “V” (**figura 21**):

- 1) Ante la ausencia del virus, los hematíes en una solución se depositarán por gravedad en el fondo de un pocillo de la placa de microtitulación y tendrán la apariencia de un punto rojo (representación A de la figura 21).

- 2) En presencia de virus, la HA presente en su superficie se une específicamente al ácido siálico presente en la superficie de los hematíes. Cuando se da este fenómeno, se forma una malla o retículo entre los virus y los hematíes que es observable de forma macroscópica. Esto se denomina “hemaglutinación” y se representa mediante la formación de la estructura reticulada, que se muestra en la representación B de la figura 21.

- 3) En presencia de Acs capaces de reconocer específicamente la HA de determinados virus de la gripe, estos se unirán a la proteína HA y evitarán que el virus y los hematíes se unan, y por lo tanto, que no ocurra la hemaglutinación. En este caso, ocurre la “inhibición de la hemaglutinación” (representación C de la figura 21). Esto provocará que los hematíes precipiten observándose su sedimentación en el fondo del pocillo observándose un punto rojo. Este punto rojo adquiere forma de lágrima si se inclina la placa de microtitulación.

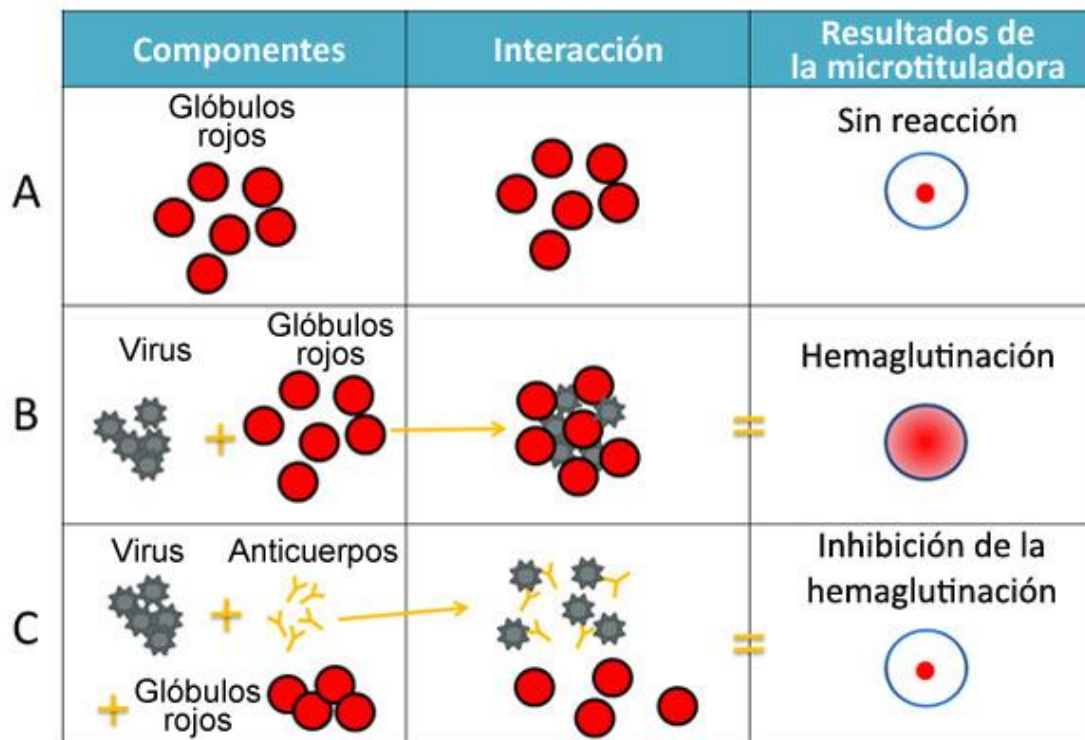


Figura 21. Esquema de los tres supuestos posibles en una prueba de reacción de inhibición de la hemaglutinación (RIH). A, en presencia únicamente de hematíes, estos se depositan y forman un punto rojo (Sin reacción, No hemaglutinación). B, en presencia de virus y hematíes, estos interaccionan formando un retículo, pudiendo observarse macroscópicamente como una malla sobre el pocillo (Hemaglutinación). C, en presencia de anticuerpos específicos, los virus de la gripe serán neutralizados por estos y la HA no podrá unirse al ácido siálico de los hematíes. Estos se depositarán en el fondo del pocillo observándose un punto rojo (Inhibición de hemaglutinación)
Modificado de: Caracterización antigénica. CDC (140).

- **Protocolo de trabajo del ensayo RIH**

Extracción de sangre de gallina y su procesado

Como se ha comentado anteriormente, el ensayo RIH se basa en la propiedad que tienen los virus gripales de aglutinar hematíes de distintas especies animales. Para el montaje del ensayo RIH se deben utilizar hematíes de distintas especies animales en

función del virus gripal analizado. Para ensayos serológicos frente al subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09, se utilizan preferentemente 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. La extracción de sangre se realizó en al menos tres gallinas diferentes con el fin de evitar errores debido a la variabilidad individual de cada animal.

Procesado y limpieza de la sangre

Para el procesado y limpieza de la sangre extraída con el objeto de su correcta utilización en el ensayo, se realizó el siguiente protocolo:

1. Filtrar la sangre a través de una gasa estéril y diluirla a razón de 1:30 en solución anticoagulante Alsever para evitar la coagulación de esta.
2. Centrifugar la sangre diluida durante 10 minutos a 2500 rpm. Tras esta centrifugación, se elimina el sobrenadante (mezcla de suero y solución anticoagulante Alsever) y se retira la capa de leucocitos (buffy coat) depositada en la superficie del sedimento de hematíes con ayuda de una pipeta Pasteur de punta fina.
3. A continuación se realiza una serie de cuatro centrifugaciones de la sangre durante 10 minutos a 2500 rpm, seguidas cada una de un lavado. El primer lavado se realiza con Cloruro Sódico mientras que los siguientes lavados se realizan utilizando PBS hasta observar la ausencia de leucocitos.

Preparación de las diluciones de hematíes

Después de la limpieza de la sangre, la suspensión de hematíes obtenida ha de ser diluida a la concentración requerida para su uso. Para el tratamiento previo de los sueros, la concentración requerida de hematíes es del 50%, mientras que para el uso en la titulación de los virus gripales y el ensayo RIH la concentración utilizada fue del 0,5%. Para obtener estas diluciones, se realizó un hematocrito y se diluyó la sangre en solución PBS en función de la cantidad necesaria para la reacción.

Tratamiento de los sueros

La presencia en sangre de inhibidores inespecíficos de la actividad hemaglutinante del virus puede interferir en los resultados del ensayo serológico. Existen tres tipos distintos de inhibidores inespecíficos: de tipo α (inhibidores estables a la temperatura); de tipo β (inhibidores sensibles a la temperatura); y de tipo γ (inhibidores estables a la temperatura y RDE sensibles). Para la inactivación de estos inhibidores previamente a la realización de los ensayos serológicos, se realizó un tratamiento de los sueros que incluyó la adición de un enzima (RDE, *Receptor Destroying Enzyme*), seguida de una inactivación por temperatura. Los pasos se describen a continuación:

1. Diluir 100 μ l de cada suero en 300 μ l de RDE hasta alcanzar una disolución del suero en RDE a razón de 1:4, manteniendo estos durante 17 horas a 37°C para la inactivación dependiente del RDE de los inhibidores inespecíficos termoestables.
2. Incubar en baño maría a 56°C durante 45 minutos para inactivar el RDE y eliminar los inhibidores inespecíficos termolábiles.
3. Añadir 600 μ l de PBS para obtener una dilución final del suero de 1:10 (dilución de *stock* del suero).
4. Dispensar 100 μ l de suspensión de hematíes al 50% para realizar la adsorción previa, centrifugándose 10 minutos a 2500 rpm.
5. Recoger el sobrenadante de cada suero y almacenarlo en tubos eppendorf etiquetados hasta su utilización en congeladores de -20°C.

Previamente al uso de estos sueros en cada ensayo serológico mediante RIH, se realizó una des-complementación de los mismos incubándolos durante 30 minutos a 56°C.

Titulación de los virus de la gripe

El objetivo de la titulación es conocer la concentración del virus disponible para poder realizar una dilución normalizada para los ensayos serológicos. Previamente a cada ensayo serológico, se realizó una titulación de cada uno de los distintos virus gripales, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se realizan 3 diluciones diferentes de cada virus en PBS (1/10, 1/50 y 1/100). Cada una de estas diluciones se realiza por duplicado. La titulación se realiza en placas de micro-titulación de 96 pocillos con fondo "V" debido al uso de sangre de gallina.
2. Se dispensan 50 µl de PBS a cada pocillo en toda la placa, exceptuando en la primera columna (únicamente dilución del virus).
3. Posteriormente se dispensan 50 µl de virus diluido en los pocillos primero y segundo de cada fila según las diluciones previamente descritas.
4. Se realizan 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 descarta el último volumen de la pipeta después de realizar la última dilución doble.
5. Posteriormente se añaden 50 µl de hematíes diluidos al 0.5% en todos los pocillos de la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 45 minutos hasta su lectura.
6. Para asegurar la validez del ensayo, se incluye un control negativo (última fila de la placa de microtitulación) en el que solo se dispensan 50 µl de PBS y 50 µl de la suspensión de hematíes diluidos al 0.5% en cada pocillo.

Lectura e interpretación de la titulación del virus hemaglutinante

La interpretación de los resultados obtenidos en la prueba de RIH se realizó inclinando la placa de microtitulación a 60-70° sobre una superficie blanca. Se determinó como título hemaglutinante la dilución más alta de virus (pocillo) en la que se observara hemaglutinación completa (**figura 22**).

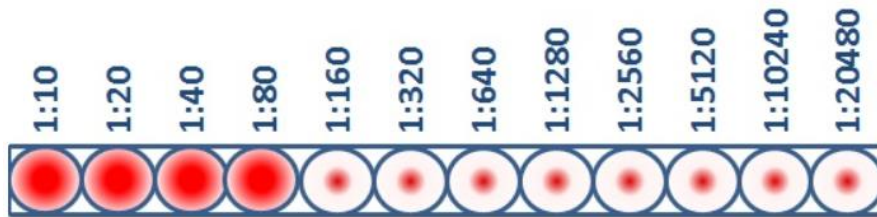


Figura 22. Esquema de un ensayo de titulación por hemaglutinación de un virus. Esta muestra del virus presenta un título hemaglutinante de 1:80, ya que el pocillo de esta dilución es el último que muestra hemaglutinación completa. Fuente: Caracterización antigénica. CDC (140).

Para la correcta interpretación de los resultados, se determinó como título hemaglutinante la dilución más alta en la que se observara hemaglutinación completa, determinada como ausencia de lágrima de sangre en la posición inclinada de la placa de microtitulación a 60-70° (**figura 23**).

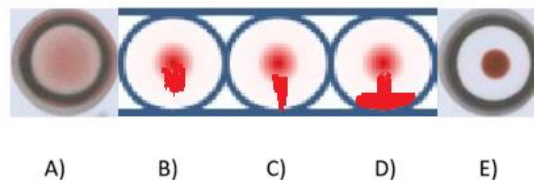


Figura 23. Lectura e interpretación de los resultados obtenidos en la reacción de inhibición de hemaglutinación (RIH) en placa de microtitulación. A) hemaglutinación positiva completa; B) hemaglutinación positiva débil; C, D y E) hemaglutinación negativa.

Una vez obtenido el título hemaglutinante de cada dilución de virus por duplicado, se debe obtener la media de todas las lecturas para haber la titulación exacta del antígeno viral. Para ello se realizó una media aritmética de los títulos. Para que el título del virus sea comparable con el resto de resultados, es necesario realizar una normalización del título para obtener 4 unidades hemaglutinantes (4 UH). Para ello, se

dividió el título obtenido entre 4, y se comprobó que se tenían 4UH de cada virus antes de cada experimento mediante otra titulación.

Ensayo RIH para la titulación de sueros

El objetivo de la RIH es conocer el título de anticuerpos hemaglutinantes (Acs anti-HA) presentes en los sueros de la población estudiada. Para su realización se utilizaron placas de micro-titulación de 96 pocillos con fondo "V". El protocolo del ensayo se describe a continuación:

1. Dispensar 50 μ l de PBS en todos los pocillos excepto la segunda columna. En esta columna se dispensará únicamente el suero problema, disuelto anteriormente a una dilución 1/10 tras el tratamiento de los sueros (dilución de stock).
2. Dispensar 50 μ l de suero en el primer pocillo (control de suero), segundo y tercero.
3. Realizar las diluciones seriadas del suero a partir del tercer pocillo, traspasando un volumen de 50 μ l del contenido de cada pocillo hasta el siguiente.
4. Dispensar 25 μ l del Ag vírico (previa una concentración comprobada de 4UH) en cada pocillo a excepción de la primera columna (control de suero).
5. Cubrir la placa, agitar ligeramente y dejar incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
6. Tras esta incubación, añadir 50 μ l de la suspensión de hematíes al 0,5% en todos los pocillos de la placa de microtitulación. Previo a esto, homogeneizar la suspensión de hematíes para evitar que los hematíes sedimenten.
7. Cubrir las placas con adhesivo, agitar ligeramente y dejar incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos.

En el ensayo 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. Dichos controles de suero sirven para comprobar que no existen inhibidores inespecíficos en el mismo que supongan una distorsión de los resultados.

Lectura e interpretación del ensayo serológico de RIH

La interpretación de los resultados en el ensayo RIH de los sueros se realizó inclinando la placa de micro-titulación a 60-70° sobre una superficie blanca. Se tomó como título de Acs anti-HA la última dilución de suero en la que se observó inhibición de hemaglutinación completa como se muestra en la **Figura 24**.

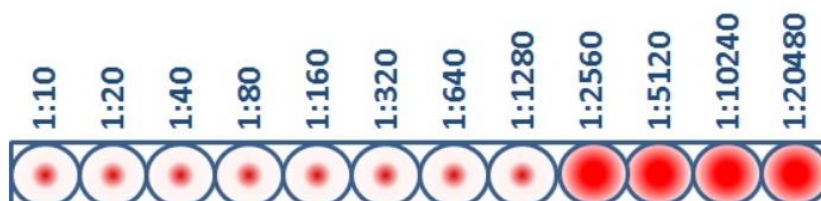


Figura 24. Esquema de un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (RIH). Este ejemplo muestra una titulación del suero problema de 1:1280, ya que a esta dilución se observó inhibición completa de la hemaglutinación. Fuente: Caracterización antigénica. CDC (140).

Análisis de los resultados

En el análisis e interpretación de los resultados se utilizaron los datos obtenidos mediante los ensayos serológicos ELLA y RIH. Se analizaron además los resultados obtenidos del análisis filogenético del gen completo de la HA y NA de cada una de las cepas gripales usadas en el ensayo serológico.

Para estudiar la respuesta serológica humoral previa y tras la vacunación antigripal en la población del estudio, se utilizaron los criterios establecidos por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y emitidos por el Comité de especialidades farmacéuticas (CPMP) (119,130). Los criterios a evaluar fueron los siguientes:

- **Tasa de Seroprotección (TSP):** Es el porcentaje de población evaluada que posee Acs a títulos considerados como protectores. Para la evaluación de este parámetro se consideró un título $\geq 1/40$ como correlato de seroprotección frente a la gripe.

- Tasa de Seroconversión (TSC): Es el porcentaje de la población que tras la vacunación antigripal muestra un aumento de al menos cuatro veces el título entre el suero pre-vacunal y post-vacunal. Un ejemplo sería pasar de un título pre-vacunal de 1/10 a un título post-vacunal de 1/40, o de un título 1/40 a 1/160.
- Razón de incremento entre los títulos pre y post-vacunales: permite estudiar el incremento de títulos que ha experimentado una población como respuesta a la vacunación antigripal, y se define como la división entre las MGTs post-vacunales y las MGTs pre-vacunales.

Los parámetros descritos anteriormente sirvieron para evaluar si la vacuna antigripal había sido o no eficaz en términos serológicos frente a cada cepa gripal en la población a estudio. La EMA establece como requisito de eficacia vacunal cumplir como mínimo uno de los tres requisitos establecidos (119,130). Sin embargo, en este trabajo hemos considerado la evaluación de los tres parámetros en conjunto para disponer de una conclusión más completa.

Además de los tres parámetros anteriormente comentados, se estudió la Tasa de Protección Vacunal (TPV) o tasa de protección debida a la vacuna, definida como el porcentaje de individuos que adquirieron un título $\geq 1/40$ frente a un determinado virus tras la vacunación. Fue un parámetro definido por el autor y directores de este trabajo con el objeto de medir la parte del aumento de la seroprotección que es debida íntegramente a la vacuna.

Debido a la falta de consenso por el momento sobre el correlato de seroprotección frente a la neuraminidasa (Acs anti-NA), para el análisis serológico frente a este antígeno se utilizaron los mismos correlatos de protección y parámetros usados para los Acs inhibidores de la hemaglutinina (Acs anti-HA) (73). Es decir, en términos de seroprotección se consideraron aquellos títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$. Estos datos observados de seroprotección para Acs anti-NA se valoraron además en duplicado, considerando como título seroprotector un título $\geq 1/80$.

Para la interpretación estadística descriptiva de los datos se utilizaron diferentes métodos paramétricos y no paramétricos mediante el programa SPSS V24 (IBM, Armonk, NY, USA). Se consideró una significación estadística del $p < 0,05$. Los test estadísticos empleados para el análisis de los datos fueron los siguientes:

- **Test Chi-cuadrado de Pearson:**

El test Chi-cuadrado de Pearson (χ^2) se utilizó para comprobar las diferencias existentes en el porcentaje de individuos seroprotegidos (TSP) y que presentaron seroconversión (TSC) en función del grupo etario poblacional.

- **Test de McNemar para muestras relacionadas:**

Este test no paramétrico fue utilizado para estudiar el efecto de la vacuna en términos seroconversión (TSC) frente a los distintos virus gripales analizados. Se utilizó además para estudiar las diferencias existentes entre la TSP pre-vacunal y la TSP post-vacunal frente a todos los subtipos y cepas de gripe utilizados.

- **Test T de Student para muestras independientes:**

El test T de Student para muestras independientes se utilizó para comprobar la existencia de diferencias entre los valores de la MGTs pre-vacunales entre ambos grupos etarios frente a los distintos virus gripales del subtipo A(H1N1) estacional y A(H1N1) pandémico. De igual modo, este mismo análisis se utilizó para comprobar diferencias entre las MGTs post-vacunales en función de la edad de los individuos analizados.

- **Correlación de Spearman:**

El test no paramétrico de correlación de Spearman se utilizó para estudiar la correlación existente entre los títulos de Acs anti-HA y anti-NA en la población analizada frente a las cepas gripales incluidas en el estudio.

- **Correlación de Pearson:**

Debido a que los títulos de Acs son valores que siguen una progresión geométrica y una distribución no normal, se puede realizar una transformación logarítmica

(logaritmo neperiano) de los datos, con el fin de conseguir una distribución Normal de tipo Gaussiano. Con los valores logarítmicos de los títulos de Acs (“normalización de los datos”), se puede aplicar así una prueba paramétrica de correlación (Correlación de Pearson). Este test de correlación se utilizó para estudiar la correlación existente entre los títulos de Acs anti-HA y anti-NA en la población analizada frente a las cepas gripales incluidas en el estudio. Se fijó un nivel de significación de $\alpha=0,05$.

- **Área bajo la curva o curva ROC:**

Mediante la construcción de estas curvas ROC se pretende conocer si existe una relación estadística entre un título 1/40 frente a la HA, considerado como seroprotector frente a este antígeno, y un título concreto frente a la NA. Esa capacidad discriminativa para el estudio de Acs a título protector ($Acs \geq 1/40$) se estudia mediante las curvas ROC, hallándose valores de sensibilidad y especificidad para cada uno de los diferentes títulos de Acs anti-NA observados frente a cada una de las cepas gripales del estudio y en función del grupo etario, con un nivel de significación estadística ($p < 0,05$).

Resultados

Resultados

Características demográficas de la población

La exposición de los resultados se ha realizado atendiendo a dos grupos de población estudiados en este trabajo, por una parte la población de edad comprendida entre 15-64 años y por otro lado, la población ≥ 65 años.

Características demográficas de los individuos ≥ 65 años

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

- Análisis demográfico global

El grupo poblacional de individuos ≥ 65 años estaba compuesto por 80 individuos de dos cohortes de las temporadas de gripe 2013-14 ($n_1=40$), y 2014-15 ($n_2=40$). La media de edad de todo el grupo fue de 78,6 años (IC95%: 76,8-80,5). El 43,8% de los individuos incluidos fueron varones ($n_1=35$) y el 56,2% mujeres ($n_2=45$) (**Figura 25**). El número medio de días entre la administración de la vacuna y la extracción del suero post-vacunal (NDEV) fue de 33,7 días (IC95%: 31,4-36,2).

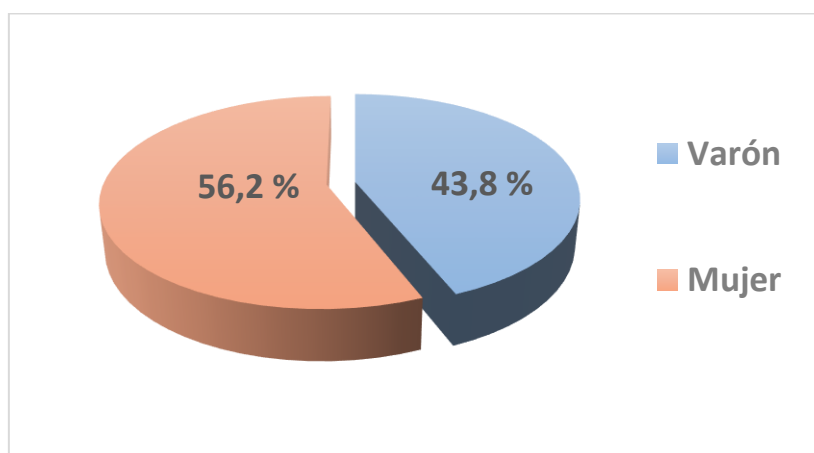


Figura 25. Distribución porcentual de sexos en el grupo de individuos ≥ 65 años.

○ Análisis demográfico por cohortes de temporadas vacunales

Los valores de la media e intervalo de confianza (IC95%) de las variables edad y NDEV en cada temporada gripal así como la distribución por sexos de los individuos se exponen en la **Tabla 8**.

La media de edad de los individuos ≥ 65 años fue de 76,0 años (IC95%: 69,0-95,0) en la cohorte de la temporada 2013-14 y de 81,2 años (IC95%: 77,0-82,0) en la cohorte de la temporada 2014-15 (**Figura 26**). Mediante el análisis estadístico T de Student para muestras independientes ($\alpha=0,05$) se observaron diferencias significativas en la media de edad de los individuos entre ambas temporadas, siendo significativamente mayor la media de edad de los individuos reclutados de la temporada 2014-2015 ($p<0,05$).

El NDEV medio de los individuos de cada cohorte fue de 34,9 días (IC95%: 30,0-35,0) en la cohorte de la temporada 2013-14 y de 32,5 días (IC95%: 28,0-34,9) en la cohorte de la temporada 2014-15. No se observaron diferencias significativas (T-Student; $\alpha=0,05$) en la media del NDEV de cada una de las cohortes, siguiendo la distribución que se muestra en la **Figura 27**.

Tabla 8. Valores de la media e intervalo de confianza (IC95%) de las variables edad y NDEV, y valores porcentuales de la variable sexo de los individuos ≥ 65 años en cada temporada vacunal.

Temporada	Edad	Sexo		NDEV	Total
	Media (IC95%)	Varón (%)	Mujer (%)	Media (IC95%)	
2013-14	76,0 (69,0-95,0)	30	70	34,9 (30,0-35,0)	40
2014-15	81,2 (77,0-82,0)	57,5	42,5	32,5 (28,0-34,9)	40

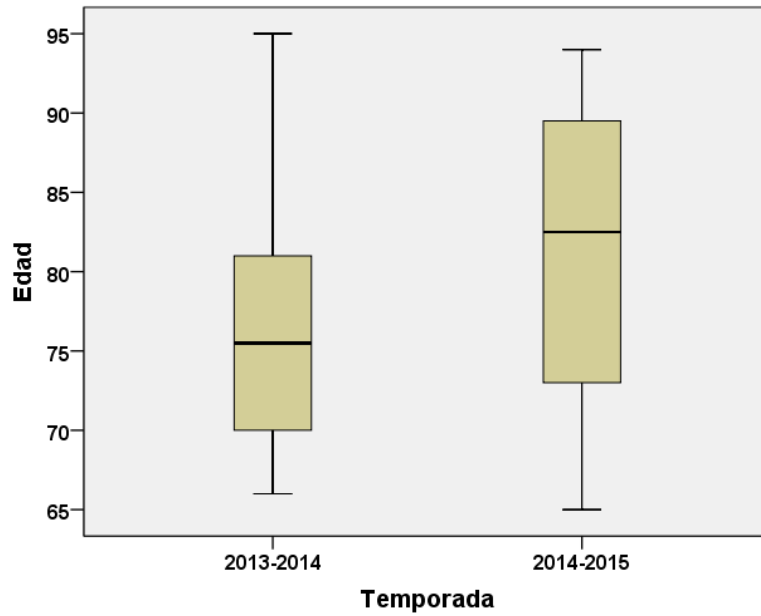


Figura 26. Distribución en box-plot de la media y del intervalo de confianza al 95% (IC95%) de la edad de los individuos ≥ 65 años en cada temporada vacunal.

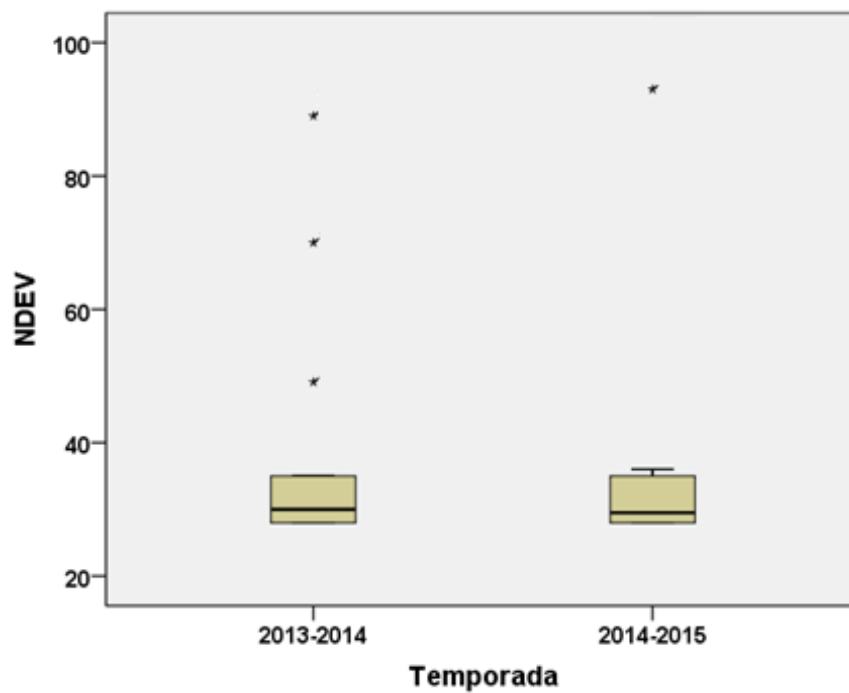


Figura 27. Distribución en box-plot de la media y del intervalo de confianza al 95% de la variable número de días de exposición a la vacuna (NDEV) de los individuos ≥ 65 años en cada temporada vacunal. Los valores fuera del IC95% (*outliers*) se representan con asterisco.

Características demográficas de los individuos de 15-64 años

Las características demográficas de los individuos de edad comprendida entre 15-64 años del estudio se analizaron de forma global y en función de cada temporada vacunal incluida en el estudio.

- Análisis demográfico global

El grupo poblacional de individuos de 15-64 años estaba compuesto por 80 individuos distribuidos en dos cohortes procedentes de las temporadas de gripe 2013-14 (n1=40), y 2014-15 (n2=40). La media de edad de todo el grupo fue de 50,8 años (IC95%: 48,1-53,3). El 45,0% de los individuos incluidos fueron varones (n1=36) y el 55,0% mujeres (n2=44). (**Figura 28**). El NDEV fue de 32,1 días (IC95%: 30,9-33,7).

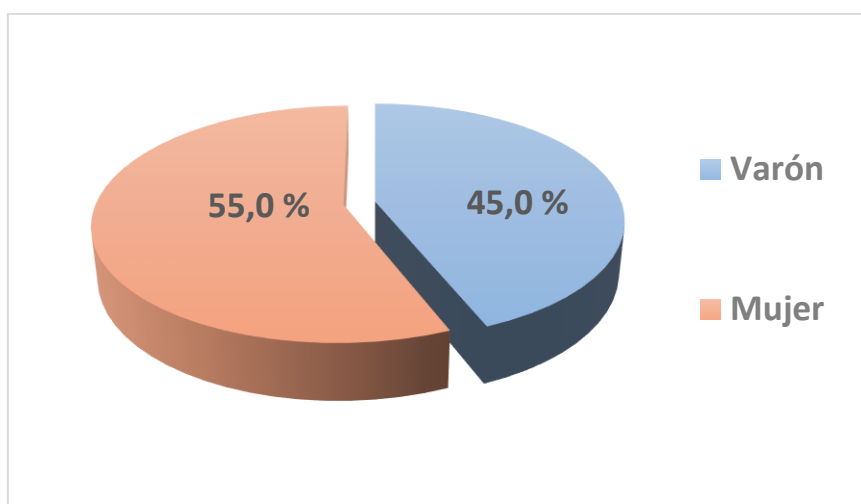


Figura 28. Distribución porcentual de sexos en el grupo de individuos de 15-64 años.

- Análisis demográfico por cohortes de temporadas vacunales

Los valores de la media e intervalo de confianza (IC95%) de las variables edad y NDEV en cada temporada gripal así como la distribución por sexos de los individuos se exponen en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Valores de la media e intervalo de confianza (IC95%) de las variables edad y NDEV, y valores porcentuales de la variable sexo de los individuos 15-64 años en cada temporada vacunal.

Temporada	Edad	Sexo		NDEV	Total
	Media (IC95%)	Varón (%)	Mujer (%)	Media (IC95%)	
2013-14	50 (45,9-53,9)	50,0	50,0	33,4 (31,3-36,1)	40
2014-15	51,6 (48,3-54,6)	40,0	60,0	30,9 (29,8-32,1)	40

La media de edad del grupo de individuos adultos (15 a 64 años) fue de 50,0 años (IC95%: 45,9-53,9) en la temporada 2013-14 y de 51,6 años (IC95%: 48,3-54,6) en la temporada 2014-15) (**Figura 29**). No se observaron diferencias significativas (T-Student; $\alpha=0,05$) en la media de edad de los individuos entre ambas temporadas vacunales de gripe.

El NDEV medio de los individuos fue de 30,9 días (IC95%: 31,3-36,1) en la temporada 2013-14 y de 33,4 días (IC95%: 29,8-32,1) en la temporada 2014-15. No se observaron diferencias significativas (T-Student; $\alpha=0,05$) en la media del NDEV de cada una de las cohortes, siguiendo la distribución que se muestra en la **Figura 30**.

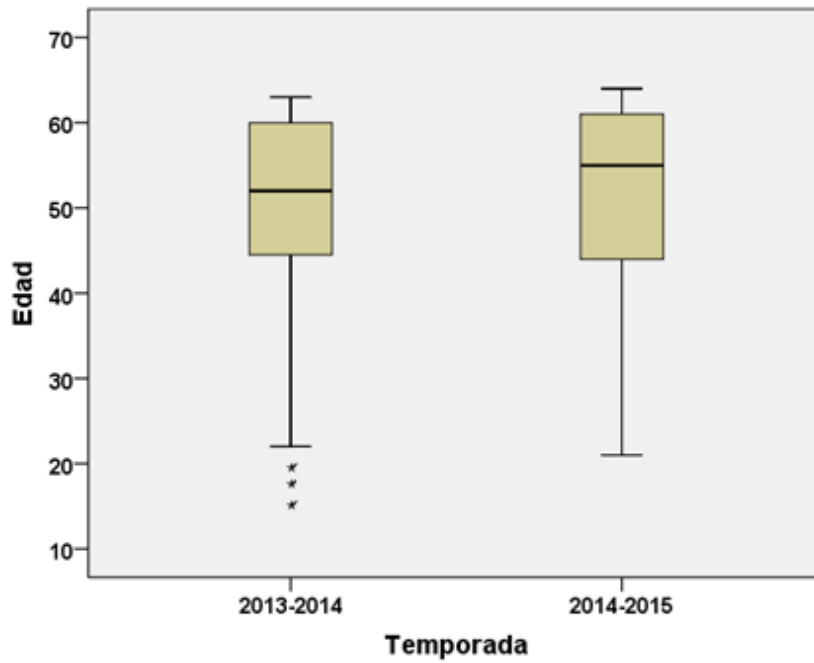


Figura 29. Distribución en box-plot de la media y del intervalo de confianza al 95% (IC95%) de la edad de los individuos de 15-64 años en cada temporada vacunal. Los valores fuera del IC95% (*outliers*) se representan con asterisco.

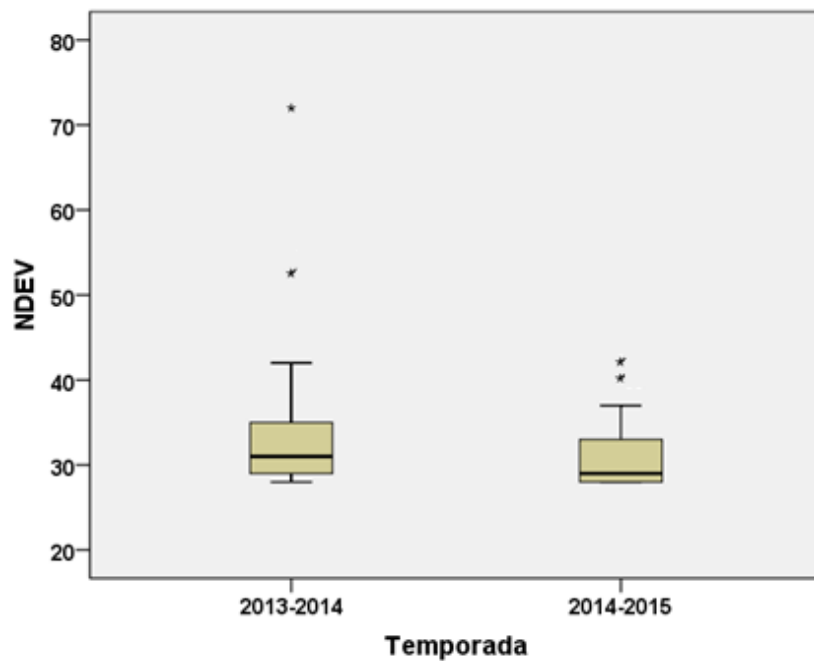


Figura 30. Distribución en box-plot de la media y del intervalo de confianza al 95% (IC95%) de la variable número de días de exposición a la vacuna (NDEV) de los individuos de 15-64 años en cada temporada vacunal. Los valores fuera del IC95% (*outliers*) se representan con asterisco.

Vacunas administradas a la población de estudio

El tipo de vacuna trivalente estacional administrada y el número de individuos en cada cohorte de población vacunados se describen en la **Tabla 10**. El grupo de individuos de 15-64 años recibió en la temporada 2013-14 una vacuna inactivada fraccionada preparada en cultivo de huevos embrionados de gallina, mientras que en la temporada 2014-15 el grupo de 15-64 años se inmunizó con una vacuna inactivada de antígenos de superficie preparada en cultivos celulares. Por otro lado, el grupo mayor de 65 años recibió vacuna de tipo adyuvada en ambas temporadas vacunales. Para la comparación del efecto de la vacunación entre adultos y mayores de 65 años, ambas vacunas del grupo de adultos se consideraron como inactivadas sin diferenciar el modo de fabricación. Sin embargo, para las comparaciones realizadas entre ambas cohortes de adultos, sí se consideró el tipo de vacuna administrada en cada campaña vacunal.

Tabla 10. Vacunas trivalentes estacionales administradas y número de individuos vacunados con cada tipo de vacuna en la población de estudio.

	Grupo 15-64 años (nº individuos)	Grupo ≥ 65 años (nº individuos)
Temporada 2013-14	Fraccionada-cultivo en huevo (40)	Adyuvada (40)
Temporada 2014-15	Antígenos de superficie- cultivo celular (40)	Adyuvada (40)

Análisis de Acs anti-NA previos a la vacunación

En este apartado se estudia la presencia de Acs anti-NA pre-vacunales en ambas cohortes de población analizadas (individuos ≥ 65 años y de 15-64 años) frente a las cepas gripales clásicas del subtipo A(H1N1) estacional y frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico. Siguiendo el orden siguiente, se analiza el nivel de Acs anti-NA pre-vacunales por un lado en la población global del estudio, y en segundo lugar, se analiza el nivel de Acs entre las dos cohortes de población estudiadas y en función de cada temporada estacional anual.

- **Análisis de la presencia de Acs anti-NA pre-vacunales en la población global del estudio.**

El análisis ELLA demostró presencia de Acs anti-NA a títulos $\geq 1/10$ en prácticamente la totalidad de los sueros pre-vacunales frente a todas las cepas del subtipo A(H1N1) clásico y A(H1N1)pdm09 analizadas en la población estudiada. Únicamente tres sueros pre-vacunales mostraron títulos de Acs $< 1/10$, correspondientes a tres individuos diferentes y frente a las cepas A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947 respectivamente (**Tabla 11**). Estos individuos presentaban una edad de 68, 59 y 56 años respectivamente.

Los títulos observados de Acs anti-NA $\geq 1/40$ así como títulos $\geq 1/80$ frente a las distintas cepas gripales A(H1N1) en la población global a estudio quedan representados en las **Figuras 31 y 32** respectivamente. Estos Acs anti-NA estaban presentes a títulos $\geq 1/40$ en más del 88,8 % y en más del 73,8 % a títulos $\geq 1/80$ en población global analizada.

La población estudiada presentó mayor tasa de seroprotección pre-vacunal medida por Acs anti-NA frente a las cepas gripales A/Weiss/1943, A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/ 59/2007 y de ellas A/Weiss/1943 y A/Brazil/11/1978 tuvieron las proporciones más altas de individuos con títulos muy elevados (32,5% y 18,1 % de los individuos presentaron títulos >1/640 respectivamente). Frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1)pdm09, sólo un 2,5% de la población global analizada presentó títulos de Acs anti-NA superiores a 1/640 (**Tabla 11**).

Tabla 11. Distribución global de los títulos de Acs anti-NA pre-vacunales frente a cepas del subtipo A(H1N1) y subtipo A(H1N1)pdm09. N: número de individuos; %: distribución porcentual.

Título	A/PR/8/1934		A/Weiss/1943		A/FM/1/1947		A/Brazil/11/1978		A/Brisbane/59/2007		A/California/07/2009	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<10	1	0,6	1	0,6	1	0,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10	5	3,1	1	0,6	1	0,6	1	0,6	0	0,0	3	1,9
20	12	7,5	0	0,0	4	2,5	0	0,0	1	0,6	11	6,9
40	14	8,8	2	1,3	7	4,4	7	4,4	8	5,0	28	17,5
80	32	20,0	8	5,0	20	12,5	11	6,9	24	15,0	38	23,8
160	43	26,9	35	21,9	42	26,3	33	20,6	43	26,9	34	21,3
320	30	18,8	36	22,5	35	21,9	42	26,3	47	29,4	29	18,1
640	18	11,3	25	15,6	32	20,0	37	23,1	26	16,3	13	8,1
>640	5	3,1	52	32,5	18	11,3	29	18,1	11	6,9	4	2,5
Títulos ≥ 1/40	142	88,8	158	98,8	154	96,3	159	99,4	159	99,4	146	91,3

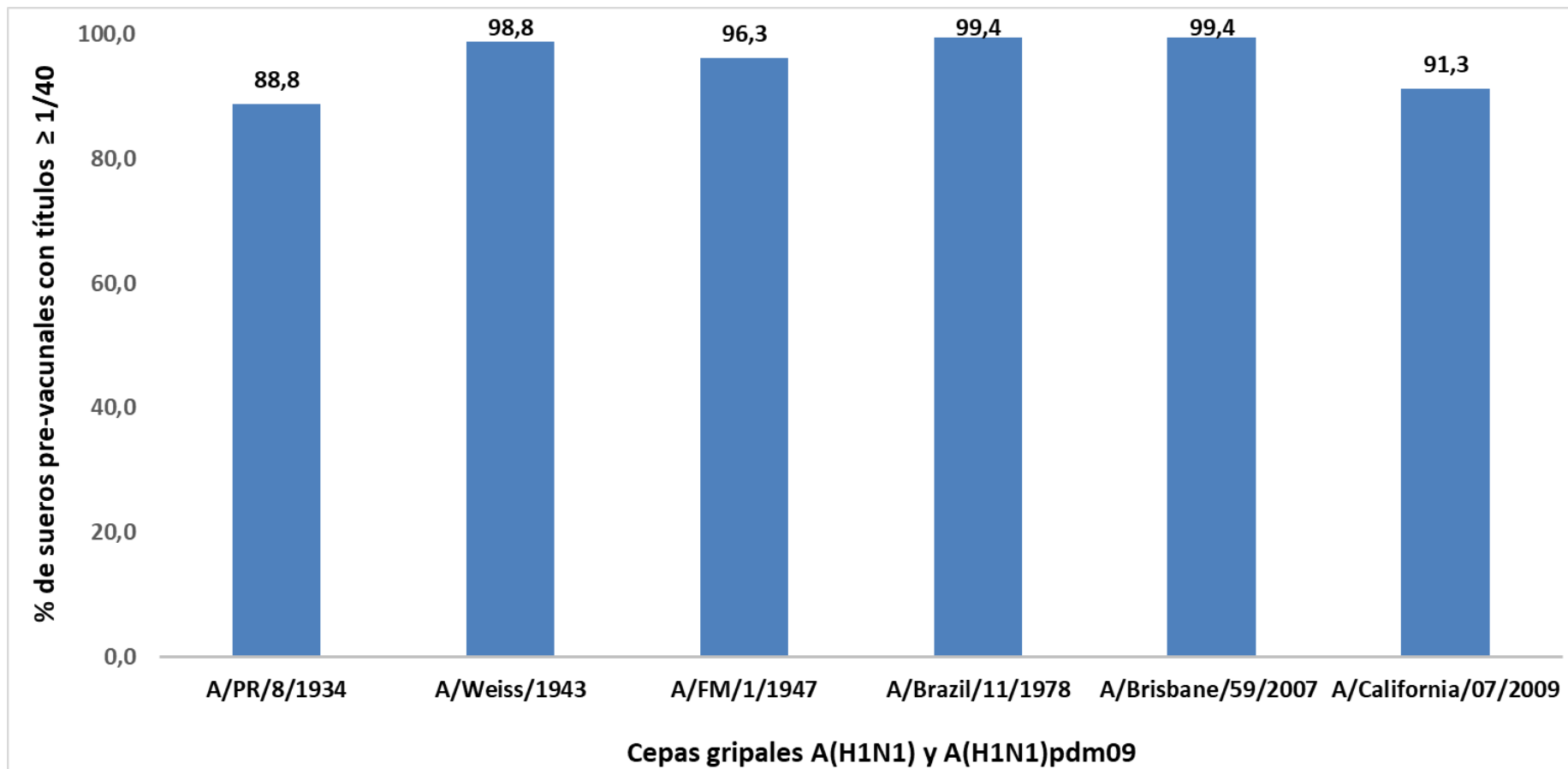


Figura 31. Tasa de seroprotección (TSP) pre-vacunal global medida como porcentaje de individuos con Acs anti-NA a títulos $\geq 1/40$ frente a cepas del subtipo A(H1N1) y subtipo A(H1N1)pdm09.

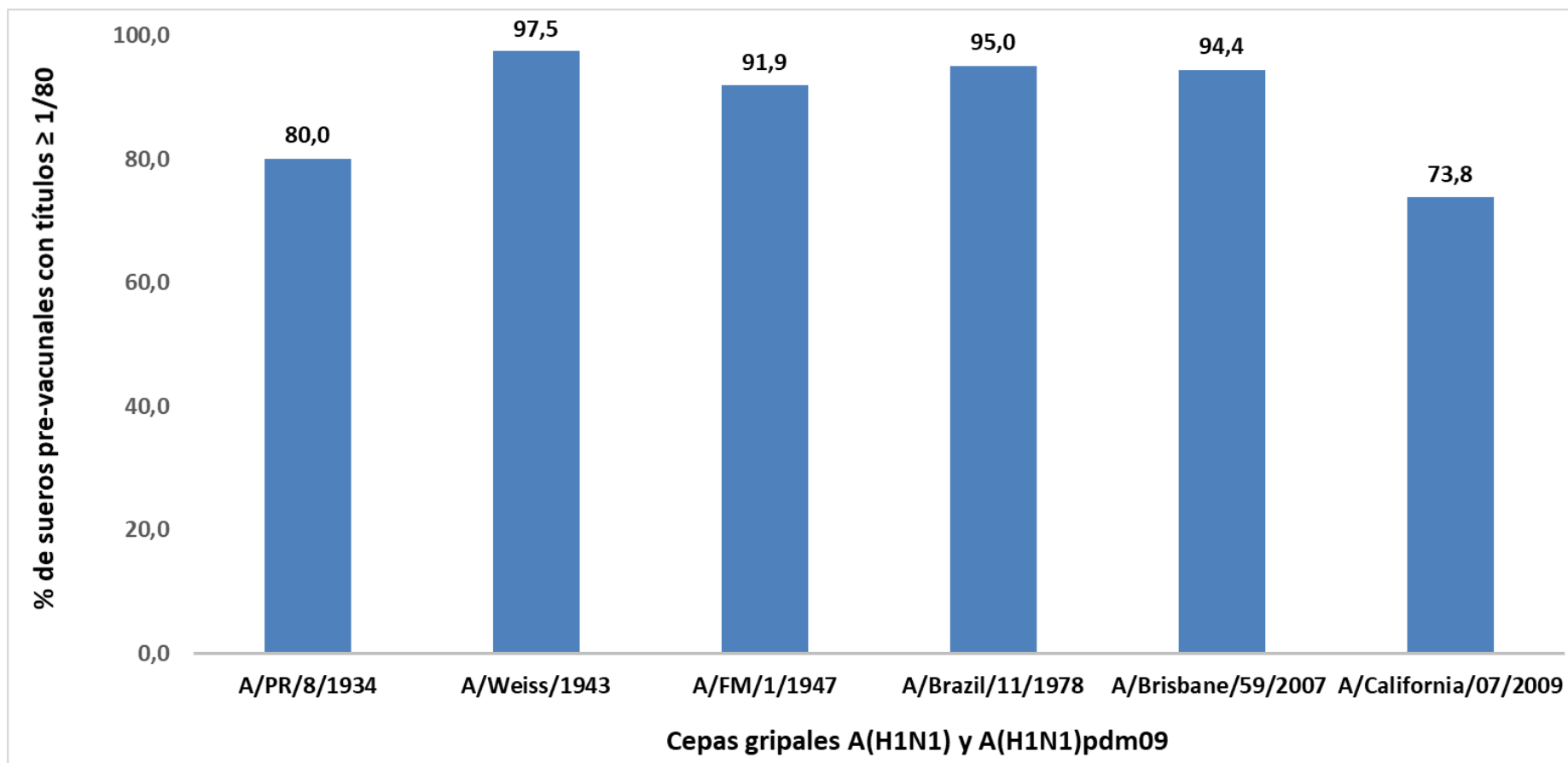


Figura 32. Tasa de seroprotección (TSP) pre-vacunal global medida como porcentaje de individuos con Acs anti-NA a títulos $\geq 1/80$ frente a cepas del subtipo A(H1N1) y subtipo A(H1N1)pdm09.

- **Análisis de la presencia de Acs anti-NA pre-vacunales en función del grupo etario.**

El análisis ELLA mostró la presencia de Acs anti-NA en los sueros pre-vacunales frente a todas las cepas del subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 analizadas en ambos grupos etarios. Estos Acs estaban presentes a títulos $\geq 1/40$ en más del 81,3% y en más del 67,5% a títulos $\geq 1/80$ en ambos grupos etarios (**Figura 33**).

Todos los individuos del grupo de edad ≥ 65 años mostraron Acs a títulos $\geq 1/40$ frente a las cepas A/Weiss/1943, A/FM/1/1947, A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007. El porcentaje más bajo de individuos ≥ 65 años con Acs $\geq 1/40$ se observó frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/California/07/2009 (n=77; 96,3%), en ambos casos.

En el grupo de individuos adultos no se encontró ningún virus frente al cual la totalidad de estos individuos mostrara anticuerpos a títulos $\geq 1/40$. El porcentaje más alto de individuos adultos con títulos de Acs $\geq 1/40$ fue frente a las cepas A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007 (n=79; 98,8% frente a ambas cepas), y el porcentaje más bajo fue frente a la cepa A/PR/8/1934 (n=65; 81,3%).

Todos los individuos ≥ 65 años mostraron títulos $\geq 1/80$ frente a la cepa A/Weiss/1943. El porcentaje más bajo de individuos ≥ 65 años con Acs a $\geq 1/80$ se observó frente a la cepa A/California/07/2009 (n=64; 80,0%). No se encontró ningún virus frente al cual la totalidad de individuos adultos mostrara anticuerpos a títulos $\geq 1/80$. El porcentaje más alto de individuos adultos con títulos de Acs $\geq 1/80$ fue frente a la cepa A/Brazil/11/1978 (n=78; 97,5%), y el porcentaje más bajo fue frente a la cepa A/California/07/2009 (n=54; 67,5%).

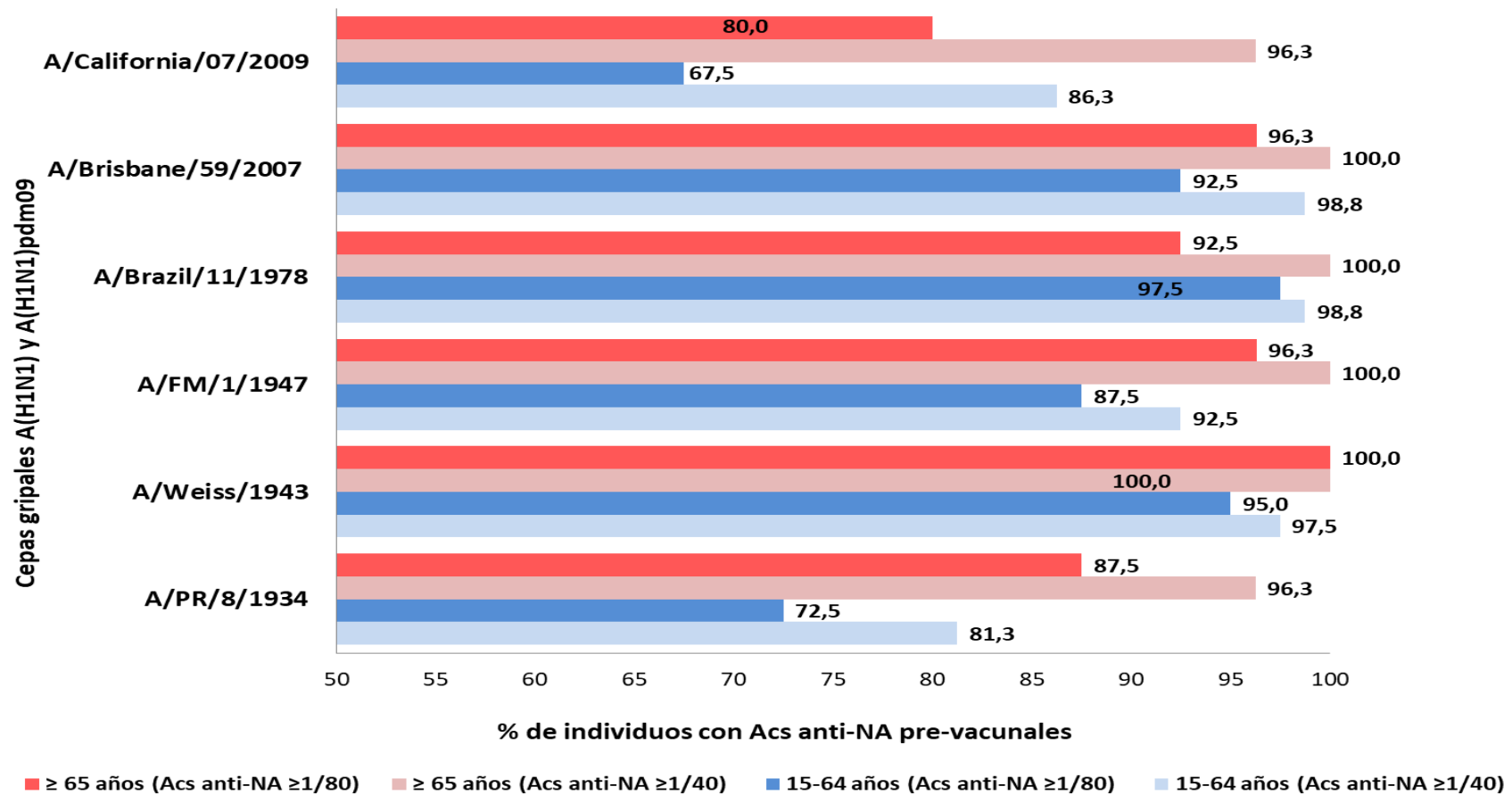


Figura 33. Tasa de seroprotección pre-vacunal por grupo de edad (adultos y mayores de 65 años) medida como porcentaje de individuos con Acs anti-NA a títulos $\geq 1/40$ y $\geq 1/80$ frente a las cepas de gripe A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09.

Tomando como correlato de protección un título $\geq 1/40$, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la TSP pre-vacunal entre ambos grupos etarios frente a las cepas A/PR/8/1934, A/FM/1/1947 y A/California/07/2009 (**Tabla 12**), siendo esta TSP más elevada en ≥ 65 años frente a dichas cepas gripales (χ^2 de Pearson; $p < 0.05$). Este mismo análisis tomando como correlato de protección un título de $1/80$, mostró diferencias estadísticamente significativas en la TSP pre-vacunal entre ambos grupos etarios frente a las cepas A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947, siendo esta TSP más elevada en ≥ 65 años frente a dichas cepas gripales (χ^2 de Pearson; $p < 0.05$) (**Tabla 13**).

La presencia de Acs anti-NA de los sueros pre-vacunales fue analizada mediante el cálculo de la Media Geométrica de los títulos (MGTs) (**Tabla 14**). El valor más elevado de las MGTs pre-vacunales en los ≥ 65 años se observó frente a la cepa A/Weiss/1943 (MGTs=716,0; IC95%:534,0-974,7) y el más bajo frente a la cepa A/California/07/2009 (MGTs=136,9; IC95%:109,2-170,9). En los individuos de 15-64 años la MGTs más elevada se observó frente a la cepa A/Brazil/11/1978 (MGTs=448,5; IC95%:364,5-542,9) y la más baja frente a A/California/07/2009 (MGTs=100,2; IC95%:79,3-127,7). La MGTs pre-vacunales fue significativamente más elevada en los ≥ 65 años que en adultos frente a las cepas A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947, y significativamente más elevada en los adultos que en los individuos ≥ 65 frente a la cepa A/Brazil/11/1978 (T-Student; $p < 0.05$). Frente a las cepas A/Brisbane/59/2007 y A/California/07/2009 no se encontraron diferencias significativas en las MGTs entre ambos grupos etarios.

Tabla 12. Distribución de individuos con títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$ previos a la vacunación. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de individuos seroprotectidos frente a los virus gripales analizados. N: número de individuos protegidos antes de la vacunación; % (TSP): Tasa de seroprotección pre-vacunal.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	15-64 años		≥ 65 años		p-valor
	N	% (TSP)	N	% (TSP)	
A/PR/8/1934	65	81,3	77	96,3	0,003
A/Weiss/1943	78	97,5	80	100,0	0,155
A/FM/1/1947	74	92,5	80	100,0	0,013
A/Brazil/11/1978	79	98,8	80	100,0	0,316
A/Brisbane/59/2007	79	98,8	80	100,0	0,316
A/California/07/2009	69	86,3	77	96,3	0,025

Tabla 13. Distribución de individuos con títulos de Acs anti-NA $\geq 1/80$ previos a la vacunación. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de individuos seroprotectidos frente a los virus gripales analizados. N: número de individuos protegidos antes de la vacunación; % (TSP): Tasa de seroprotección pre-vacunal.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	15-64 años		≥ 65 años		p-valor
	N	% (TSP)	N	% (TSP)	
A/PR/8/1934	58	72,5	70	87,5	0,018
A/Weiss/1943	76	95	80	100,0	0,043
A/FM/1/1947	70	87,5	77	96,3	0,043
A/Brazil/11/1978	78	97,5	74	92,5	0,147
A/Brisbane/59/2007	74	92,5	77	96,3	0,303
A/California/07/2009	54	67,5	64	80,0	0,072

Tabla 14. Media geométrica de los títulos (MGTs) de Acs anti-NA y diferencias entre los valores MGTs de los sueros pre-vacunales frente a las cepas gripales A(H1N1) analizadas. IC95%: intervalo de confianza al 95%; ($p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	MGTs Anti-NA (IC95%) pre-vacunales		p-valor
	15-64 años	≥ 65 años	
A/PR/8/1934	106,5 (81,2-137,7)	166,6 (131,1-209,9)	0,016
A/Weiss/1943	369,6 (269,9-485,7)	716,0 (534,0-974,7)	0,002
A/FM/1/1947	169,5 (128,3-215,5)	351,9 (283,9-434,4)	<0,001
A/Brazil/11/1978	448,5 (364,5-542,9)	269,0 (211,8-336,1)	0,001
A/Brisbane/59/2007	222,3 (179,5-276,4)	251,0 (211,4-296,5)	0,399
A/California/07/2009	100,2 (79,3-127,7)	136,9 (109,2-170,9)	0,066

- **Análisis de los Acs anti-NA pre-vacunales en función de la temporada de gripe y grupo etario.**

La TSP pre-vacunal tomando como correlatos de seroprotección los títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$ y $\geq 1/80$ en función de las temporadas estacionales de gripe y en función del grupo etario, queda reflejada en las **Tablas 15 y 16**.

Tabla 15. Número y porcentaje de individuos con títulos de Acs anti-NA protectores ($\geq 1/40$) en función de la temporada estacional y grupo etario frente a las cepas de gripe A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Temporada 2013-2014		Temporada 2014-2015	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
A/PR/8/1934	26 (65,0)	38 (95,0)	39 (97,5)	39 (97,5)
A/Weiss/1943	40 (100,0)	40 (100,0)	38 (95,0)	40 (100,0)
A/FM/1/1947	37 (92,5)	40 (100,0)	37 (92,5)	40 (100,0)
A/Brazil/11/1978	40 (100,0)	40 (100,0)	39 (97,5)	40 (100,0)
A/Brisbane/59/2007	40 (100,0)	40 (100,0)	39 (97,5)	40 (100,0)
A/California/07/2009	34 (85,0)	37 (92,5)	35 (87,5)	40 (100,0)

Tabla 16. Número y porcentaje de individuos con títulos de Acs anti-NA protectores ($\geq 1/80$) en función de la temporada estacional y grupo etario frente a las cepas de gripe A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Temporada 2013-2014		Temporada 2014-2015	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
A/PR/8/1934	19 (47,5)	34 (85,0)	39 (97,5)	36 (90,0)
A/Weiss/1943	39 (97,5)	40 (100,0)	37 (92,5)	40 (100,0)
A/FM/1/1947	35 (87,5)	39 (97,5)	35 (87,5)	38 (95,0)
A/Brazil/11/1978	39 (97,5)	40 (100,0)	39 (97,5)	34 (85,0)
A/Brisbane/59/2007	39 (97,5)	40 (100,0)	35 (87,5)	37 (92,5)
A/California/07/2009	23 (57,5)	31 (77,5)	31 (77,5)	33 (82,5)

Con el objeto de comprobar si la TSP pre-vacunal observada frente a cada una de las cepas gripales A(H1N1) estudiadas fue diferente entre las dos temporadas estacionales vacunales y entre ambos grupos etarios, se realizó un test Chi-cuadrado ($\alpha=0,05$). Este análisis mostró únicamente diferencias estadísticamente significativas en la TSP pre-vacunal ($\geq 1/40$) del grupo de individuos adultos frente a la cepa A/PR/8/1934 entre ambas temporadas vacunales (χ^2 de Pearson; $p < 0,05$). La TSP pre-vacunal ($\geq 1/40$) en adultos frente a la cepa A/PR/8/1934 fue más elevada en la temporada 2014-2015 (con 39 individuos seroprotegidos) que en la temporada 2013-2014 (con 26 seroprotegidos) (**Tabla 17**).

Cuando se consideró como correlato de seroprotección un título $\geq 1/80$, la TSP pre-vacunal también mostró diferencias estadísticamente significativas en el grupo de 15-64 años frente a la cepa A/PR/8/1934, siendo esta TSP más elevada en este grupo etario durante la temporada 2014-15 ($p < 0,05$) (**Tabla 18**). Con respecto al grupo de individuos ≥ 65 años, la TSP pre-vacunal tomando como correlato de seroprotección un título $\geq 1/40$ no mostró diferencias significativas frente a ningún virus analizado. Sin embargo, cuando se tomó un correlato de seroprotección $\geq 1/80$, se observaron diferencias significativas frente a la cepa A/Brazil/11/1978, siendo la TSP pre-vacunal ($\geq 1/80$) en mayores de 65 años más elevada en la temporada 2013-2014 (con 40 individuos seroprotegidos) que en la temporada 2014-2015 (con 40 individuos seroprotegidos).

Tabla 17. Valores de significación estadística (p-valor) de la TSP ($\geq 1/40$) pre-vacunal frente a las cepas gripales A(H1N1) en cada temporada analizada (χ^2 de Pearson; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Individuos 15-64 años			Individuos ≥ 65 años		
	Temp. 2013-14	Temp. 2014-15	p-valor	Temp. 2013-14	Temp. 2014-15	p-valor
	($n_1=40$)	($n_2=40$)		($n_1=40$)	($n_2=40$)	
A/PR/8/1934	26	39	<0,001	38	39	0,556
A/Weiss/1943	40	38	0,152	40	40	1,000
A/FM/1/1947	37	37	1,000	40	40	1,000
A/Brazil/11/1978	40	39	0,314	40	40	1,000
A/Brisbane/59/2007	40	39	0,314	40	40	1,000
A/California/07/2009	34	35	0,745	37	40	0,077

Tabla 18. Valores de significación estadística (p-valor) de la TSP ($\geq 1/80$) pre-vacunal frente a las cepas gripales A(H1N1) en cada temporada analizada (χ^2 de Pearson; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Individuos 15-64 años			Individuos ≥ 65 años		
	Temp. 2013-14	Temp. 2014-15	p-valor	Temp. 2013-14	Temp. 2014-15	p-valor
	($n_1=40$)	($n_2=40$)		($n_1=40$)	($n_2=40$)	
A/PR/8/1934	19	39	<0,001	34	36	0,499
A/Weiss/1943	39	37	0,305	40	40	1,000
A/FM/1/1947	35	35	1,000	39	38	0,556
A/Brazil/11/1978	39	39	1,000	40	34	0,011
A/Brisbane/59/2007	39	35	0,090	40	37	0,077
A/California/07/2009	23	31	0,056	31	33	0,576

Análisis de los Acs anti-NA tras la vacunación estacional frente al subtipo A(H1N1)pdm09

En este apartado se analiza la capacidad de las vacunas trivalentes anuales para inducir la producción de Acs anti-NA frente a cepas gripales clásicas del subtipo A(H1N1) estacional y frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico.

- **Análisis global del efecto de la vacuna trivalente estacional sobre la generación de Acs anti-NA frente a cepas de gripe A(H1N1) clásicas y actuales.**

El análisis ELLA demostró presencia de Acs anti-NA a títulos $\geq 1/10$ en la totalidad de los sueros post-vacunales frente a todas las cepas del subtipo A(H1N1) clásico y A(H1N1)pdm09 analizadas en la población estudiada. La distribución de los títulos de Acs anti-NA post-vacunales frente a las distintas cepas analizadas se representa en la **tabla 19**. Se analizó la TSP post-vacunal utilizando como correlatos de seroprotección los títulos de Acs anti-NA de 1/40 y 1/80 frente a cepas gripales A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09 (**Figura 34**). De forma global se observó un aumento en la TSP tras la vacunación frente a las cepas A/PR/8/1934, A/FM/1/1947 y A/California/07/2009. Tomando como correlato de seroprotección un título de 1/80, se observó un aumento en la TSP post-vacunal frente a todas las cepas gripales clásicas del subtipo A(H1N1) así como frente a la cepa del subtipo A(H1N1)pdm09 (**Figura 35**).

El análisis de los títulos de Acs anti-NA obtenidos mediante ELLA en los sueros pre y post-vacunales de la población global, permitieron hallar la TSP, TPV y TSC frente a las cepas gripales del subtipo A(H1N1) estacional y del subtipo A(H1N1) pandémico. Estos valores están expuestos en la **tabla 20 y figura 36** tomando como correlato de seroprotección un título de 1/40. Por otro lado, tomando como correlato de seroprotección un título de 1/80, quedan reflejados los valores en la **tabla 21 y figura 37**.

Tabla 19. Distribución global de los títulos de Acs anti-NA post-vacunales frente a cepas del subtipo A(H1N1) y subtipo A(H1N1)pdm09. N: número de individuos; %: distribución porcentual.

Título	A/PR/8/1934		A/Weiss/1943		A/FM/1/1947		A/Brazil/11/1978		A/Brisbane/59/2007		A/California/07/2009	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10	0	0,0	1	0,6	1	0,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
20	7	4,4	1	0,6	1	0,6	1	0,6	1	0,6	1	0,6
40	13	8,1	0	0,0	4	2,5	1	0,6	1	0,6	6	3,8
80	30	18,8	0	0,0	4	2,5	4	2,5	4	2,5	12	7,5
160	42	26,3	18	11,3	36	22,5	20	12,5	27	16,9	21	13,1
320	34	21,3	29	18,1	28	17,5	41	25,6	40	25,0	49	30,6
640	25	15,6	31	19,4	53	33,1	41	25,6	51	31,9	38	23,8
>640	9	5,6	80	50,0	33	20,6	52	32,5	36	22,5	33	20,6
Títulos ≥ 1/40	153	95,6	158	98,8	158	98,8	159	99,4	159	99,4	159	99,4

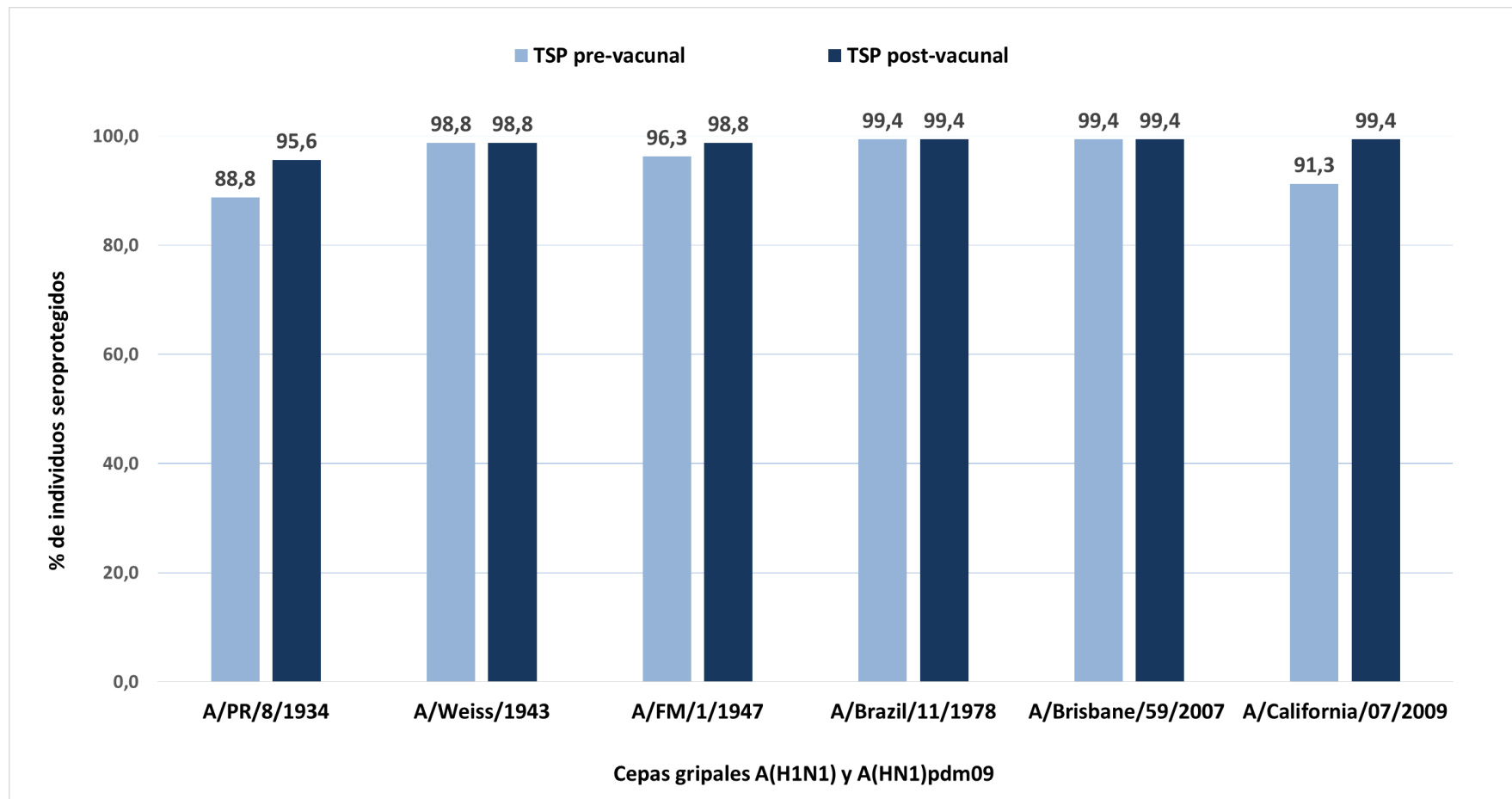


Figura 34. Tasa de seroprotección pre y post-vacunal utilizando un correlato de seroprotección con un título de Acs anti-NA $\geq 1/40$ frente a cepas gripales A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09.

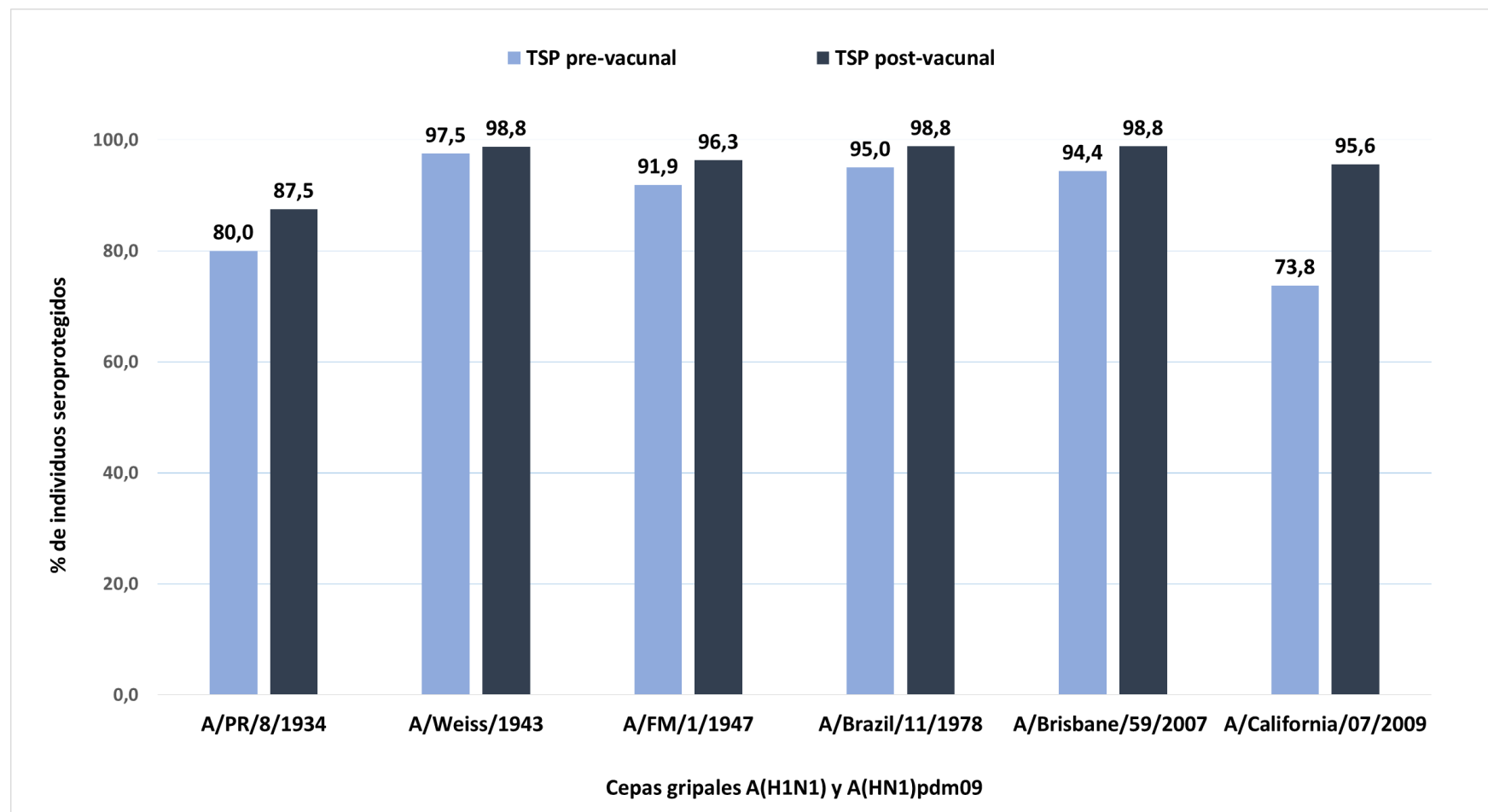


Figura 35. Tasa de seroprotección pre y post-vacunal utilizando un correlato de seroprotección con un título de Acs anti-NA $\geq 1/80$ frente a cepas gripales A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09.

Tabla 20. Resultados globales de la TSP pre y post-vacunal, TPV y TSC frente a cepas gripales A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09, tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA $\geq 1/40$. TSP: tasa de seroprotección; TPV: tasa de seroprotección conferida por la vacuna; TSC: tasa de seroconversión.

	A/PR/8/ 1934	A/Weiss/ 1943	A/FM/1/ 1947	A/Brazil/11/ 1978	A/Brisbane/59/ 2007	A/California/07/ 2009
Nº total de sueros	160	160	160	160	160	160
Nº pre-protegidos	142	158	154	159	159	146
TSP pre-vacunal (%)	88,8	98,8	96,3	99,4	99,4	91,3
Nº post-protegidos	153	158	158	159	159	159
TSP post-vacunal (%)	95,6	98,8	98,8	99,4	99,4	99,4
TPV (%)	6,9	0,0	2,5	0,0	0,0	8,1
Nº seroconversiones	16	36	27	27	43	86
TSC (%)	10,0	22,5	16,9	16,9	26,9	53,8

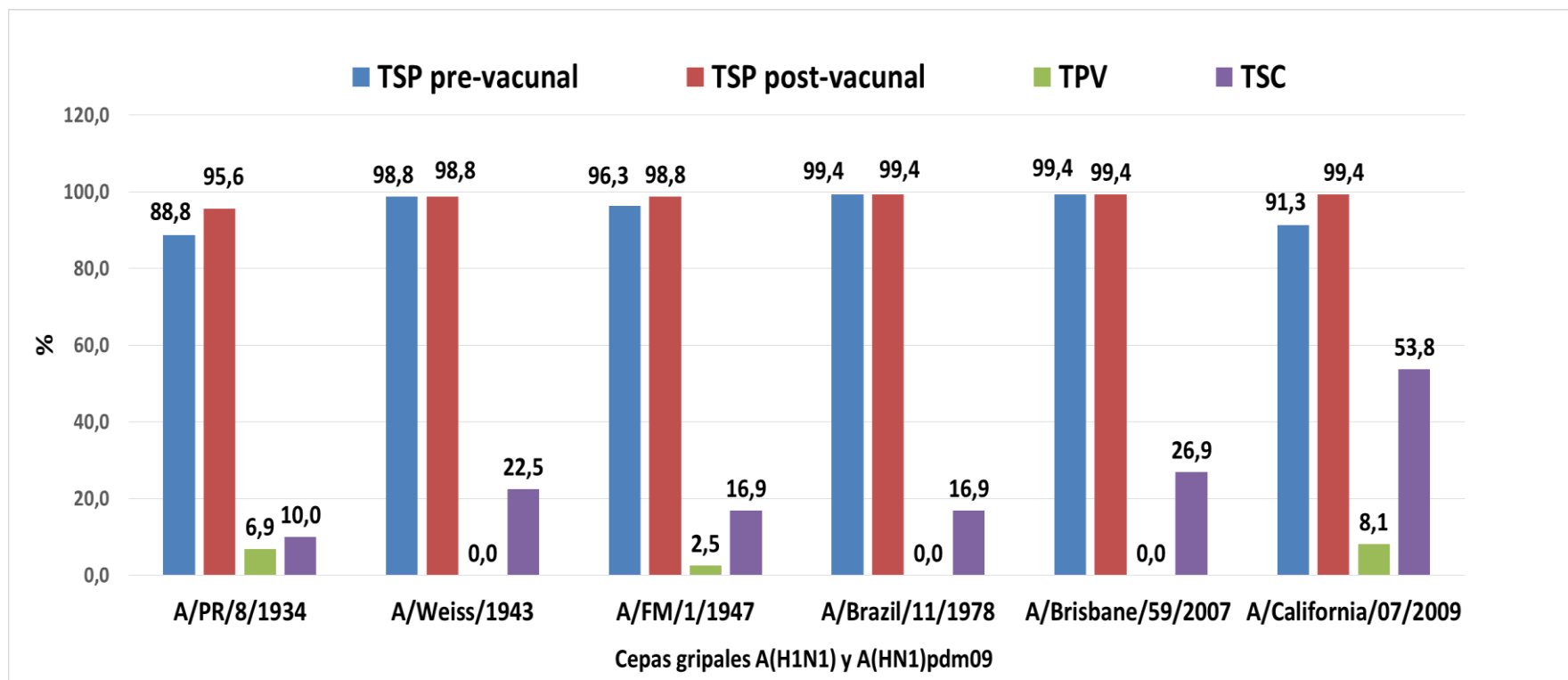


Figura 36. Valores globales de TSP pre y post-vacunal, TPV y TSC frente a las cepas gripales A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09, , tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA $\geq 1/40$.

Tabla 21. Resultados globales de la TSP pre y post-vacunal, TPV y TSC frente a cepas gripales A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09, tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA $\geq 1/80$. TSP: tasa de seroprotección; TPV: tasa de seroprotección conferida por la vacuna; TSC: tasa de seroconversión.

	A/PR/8/ 1934	A/Weiss/ 1943	A/FM/1/ 1947	A/Brazil/11/ 1978	A/Brisbane/59/ 2007	A/California/07/ 2009
Nº total de sueros	160	160	160	160	160	160
Nº pre-protegidos	142	158	154	159	159	146
TSP pre-vacunal (%)	80,0	97,5	91,9	95,0	94,4	73,8
Nº post-protegidos	153	158	158	159	159	159
TSP post-vacunal (%)	87,5	98,8	96,3	98,8	98,8	95,6
TPV (%)	7,5	1,3	4,4	3,8	4,4	21,8
Nº seroconversiones	16	36	27	27	43	86
TSC (%)	10,0	22,5	16,9	16,9	26,9	53,8

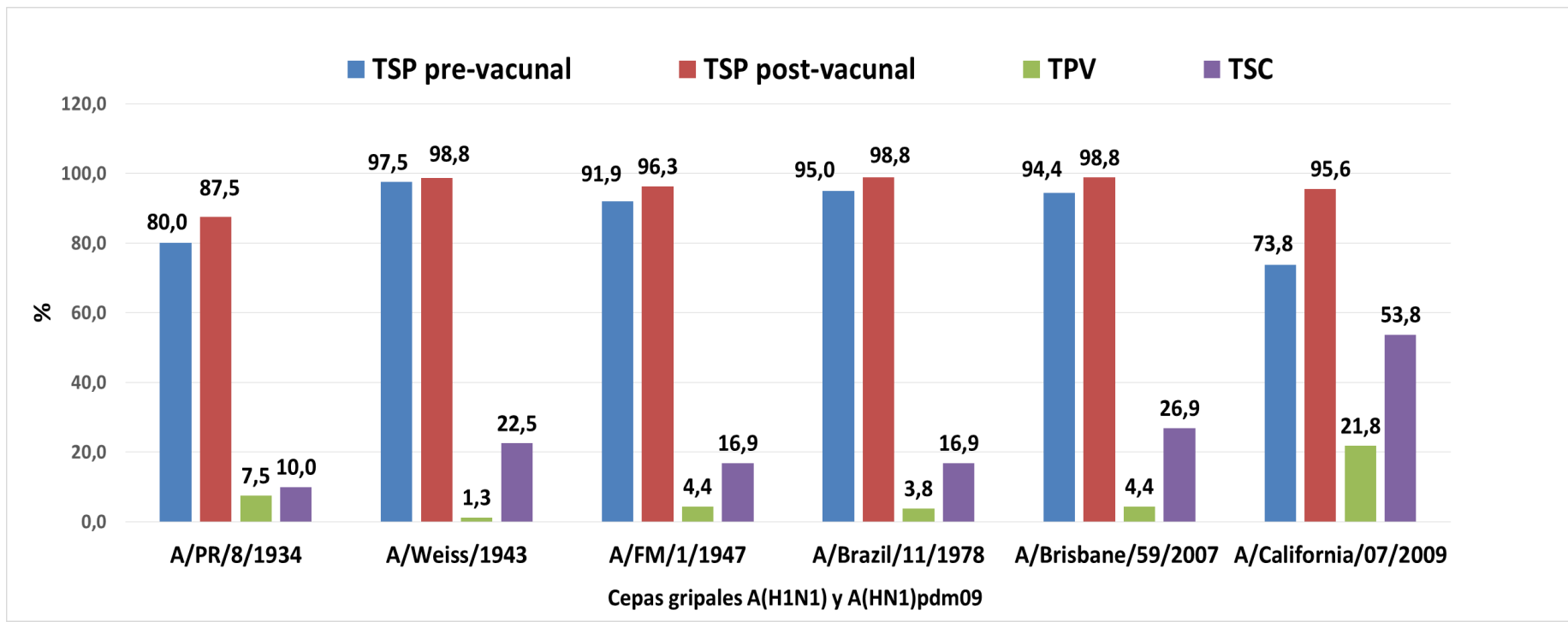


Figura 37. Valores globales de TSP pre y post-vacunal, TPV y TSC frente a las cepas gripales A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09, , tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA $\geq 1/80$.

La vacunación estacional indujo una respuesta humoral homóloga que incrementó el título de Acs anti-NA hasta valores protectores ($\geq 1/40$) en un 8,1% (TPV) de la población global analizada frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1)pdm09. Esta TPV permitió pasar de una TSP pre-vacunal del 91,3% a una TSP post-vacunal del 99,4% frente al subtipo pandémico. Por otro lado, tras la vacunación estacional también se observó una respuesta heterológica que incrementó el título de Acs anti-NA hasta títulos protectores ($\geq 1/40$) frente a dos de las cepas clásicas del subtipo A(H1N1) estacional incluidas en el estudio (cepas A/PR/8/1934 y A/FM/1/1947). Ninguna de estas cepas estacionales estaba incluida como cepa vacunal en las temporadas vacunales del estudio.

Tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA de $\geq 1/80$, la vacunación produjo globalmente una TPV homóloga del 21,8% frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1)pdm09. Esta TPV permitió pasar de una TSP pre-vacunal del 73,8% a una TSP post-vacunal del 95,6% frente al subtipo pandémico. Por otro lado, tras la vacunación estacional también se observó una respuesta heterológica que incrementó el título de Acs anti-NA hasta títulos protectores ($\geq 1/80$) frente a todas las cepas clásicas del subtipo A(H1N1) estacional incluidas en el estudio. Esta TPV osciló entre el 1,3% frente a la cepa A/Weiss/1943 y el 7,5% frente a la cepa A/PR/8/1934. Ninguna de estas cepas estacionales estaba incluida como cepa vacunal en las temporadas vacunales del estudio.

La vacunación estacional indujo seroconversión homóloga en el 53,8% de la población global frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo pandémico, cepa incluida en la vacuna. La vacunación también indujo seroconversión heterológica frente a las cepas clásicas del subtipo A(H1N1) estacional, con tasas que oscilaron entre el 10,0% frente a la cepa A/PR/8/1934 y el 26,9% de la población frente a la cepa A/Brisbane/59/2007.

- **Análisis del efecto de la vacuna trivalente estacional sobre la generación de Acs anti-NA en función del grupo etario.**

El análisis de la producción de Acs anti-NA en función del grupo etario no sólo busca mostrar las diferencias debidas a la edad de los individuos adultos y mayores de 65 años, sino también mostrar las diferencias entre dos conceptos vacunales diferentes. Es necesario recordar que el grupo de mayores de 65 años fue vacunado con una vacuna adyuvada, mientras que los adultos fueron vacunados con vacunas inactivadas sin adyuvante. Por tanto, los resultados mostrados a continuación hacen referencia tanto a las diferencias de edad como a las debidas al uso de un tipo de vacuna diferente en cada grupo. Con el fin de facilitar la redacción de los resultados, se utilizará solo la comparación etaria como referencia de ambos conceptos.

Tras la vacunación estacional se observó que la TSP post-vacunal ascendió al 92,5% en los individuos adultos y que fue superior al 98,8% en el grupo ≥ 65 frente a todas las cepas A(H1N1) y A(H1N1)pdm09, tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA de $\geq 1/40$ (**Figura 38**). Por otra parte, la TSP post-vacunal ($\geq 1/80$) fue superior al 80,0% en los individuos adultos y superior al 95,0% en el grupo ≥ 65 frente a todas las cepas A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 (**Figura 38**).

La TSP post-vacunal (tanto en títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$ y $\geq 1/80$) fue significativamente mayor que la TSP pre-vacunal en el grupo de adultos frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/California/07/2009 (χ^2 de Pearson; $p < 0.05$) (**Tabla 22**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la TSP pre y post-vacunal ($\geq 1/40$) en mayores de 65 años frente a ninguna de las cepas analizadas. Sin embargo, tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA $\geq 1/80$, la TSP post-vacunal fue significativamente superior con respecto a la TSP pre-vacunal en este grupo de mayor edad frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/California/07/2009 (**Tabla 22**).

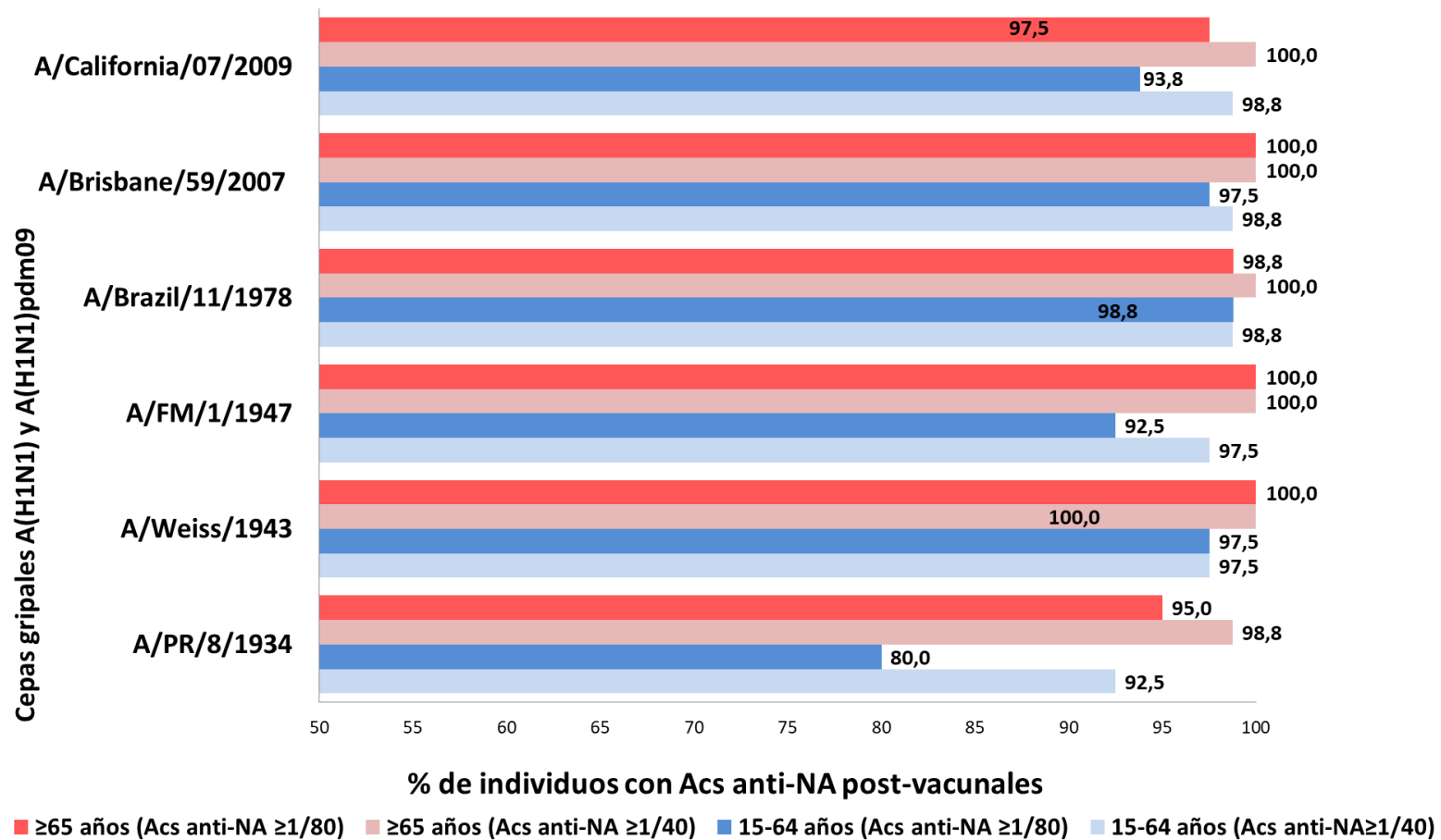


Figura 38. Tasas de Seroprotección post-vacunales (TSP) frente a cepas del subtipo A(H1N1) y subtipo A(H1N1)pdm09 en adultos y mayores de 65 años utilizando como correlatos de seroprotección títulos de Acs anti-NA de 1/40 y 1/80.

Tabla 22. Distribución por grupos etarios de individuos con títulos protectores de Acs anti-NA antes y después de la vacunación antigripal utilizando como correlatos de seroprotección títulos de Acs anti-NA de 1/40 y 1/80. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de individuos seroprottegidos frente a las cepas gripales A(H1N1) analizadas.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo 15-64 años (n ₁ =80)			Grupo ≥65 años (n ₂ =80)		
	Nº pre- protegidos (≥1/40)	Nº post- protegidos (≥1/40)	p-valor	Nº pre- protegidos (≥1/40)	Nº post- protegidos (≥1/40)	p-valor
A/PR/8/1934	65	74	0,004	77	79	0,500
A/Weiss/1943	78	78	1,000	80	80	1,000
A/FM/1/1947	74	78	0,125	80	80	1,000
A/Brazil/11/1978	79	79	1,000	80	80	1,000
A/Brisbane/59/2007	79	79	1,000	80	80	1,000
A/California/07/2009	69	79	0,002	77	80	0,250

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo 15-64 años (n ₁ =80)			Grupo ≥65 años (n ₂ =80)		
	Nº pre- protegidos (≥1/80)	Nº post- protegidos (≥1/80)	p-valor	Nº pre- protegidos (≥1/80)	Nº post- protegidos (≥1/80)	p-valor
A/PR/8/1934	58	64	<0,001	70	76	<0,001
A/Weiss/1943	76	78	0,778	80	80	1,000
A/FM/1/1947	70	74	0,254	77	80	0,843
A/Brazil/11/1978	78	79	0,712	74	79	0,283
A/Brisbane/59/2007	74	78	0,369	77	80	0,777
A/California/07/2009	54	75	0,001	64	78	0,004

En términos de seroconversión, la vacunación con la cepa A/California/07/2009 (subtipo A(H1N1)pdm09) indujo una respuesta humoral heterotípica significativa frente a la NA de todas las cepas analizadas del subtipo A(H1N1) clásico, tanto en adultos como en ≥ 65 años (McNemar; $p < 0.05$). La TSC heteróloga más elevada se observó en el grupo de adultos frente a la cepa A/Weiss/1943 (TSC =31,3%) y frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 en los ≥ 65 años (TSC =36,3%) (**Tabla 23**). La vacuna frente a la cepa A/California/07/2009 produjo seroconversión homóloga en el 52.5% en adultos ($n_1=42$) y en el 55% en ≥ 65 años ($n_2=44$).

Se realizó un test Chi-cuadrado ($\alpha=0,05$) de variables independientes para comprobar si la seroconversión inducida por la vacunación fue diferente entre ambos grupos etarios frente a cada una de las cepas gripales A(H1N1) (**Tabla 24**). La TSC heteróloga fue significativamente mayor en ≥ 65 años (29 seroconversiones) que en adultos (14 seroconversiones) frente a la cepa A/Brisbane/59/2007, y en adultos (25 seroconversiones) que en ≥ 65 años (11 seroconversiones) frente a la cepa A/Weiss/1943 (χ^2 de Pearson; $p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas en la seroconversión homóloga frente a la cepa pandémica A/California/07/2009 (cepa vacunal) entre ambos grupos etarios (χ^2 Pearson; $p < 0.05$).

Tabla 23. Número de seroconversiones (SC) y tasa de seroconversión (TSC) frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 tras la vacunación estacional de ambos grupos etarios.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	15-64 años (n ₁ =80)		≥ 65años (n ₂ =80)	
	SC	TSC (%)	SC	TSC (%)
A/PR/8/1934	7	8,8	9	11,3
A/Weiss/1943	25	31,3	11	13,8
A/FM/1/1947	17	21,3	10	12,5
A/Brazil/11/1978	12	15,0	15	18,8
A/Brisbane/59/2007	14	17,5	29	36,3
A/California/07/2009	42	52,5	44	55,0

Tabla 24. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de seroconversión (TSC) en función del grupo etario frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 (χ^2 de Pearson; p<0,05).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Nº de seroconversiones		p-valor
	15-64 años (n ₁ =80)	≥ 65años (n ₂ =80)	
A/PR/8/1934	7	9	0,598
A/Weiss/1943	25	11	0,008
A/FM/1/1947	17	10	0,14
A/Brazil/11/1978	12	15	0,527
A/Brisbane/59/2007	14	29	0,007
A/California/07/2009	42	44	0,751

Los valores de las MGTs de Acs anti-NA post-vacunales en cada grupo etario frente a cada cepa de gripe analizada, así como los valores del intervalo de confianza (IC95%) para las MGTs están representados en la **Tabla 25**. El análisis de los valores de las MGTs post-vacunales en función de la edad se realizó mediante el uso del estadístico de contraste T-Student de muestras independientes. La MGTs post-vacunales fue significativamente más elevada frente a las cepas A/PR/8/1934, A/FM/1/1947 y

A/Brisbane/59/2007 en el grupo de individuos mayores de 65 años con respecto a los adultos, y significativamente más elevada frente a la cepa A/Brazil/11/1978 en adultos con respecto a ≥ 65 años (T-Student; $p < 0.05$).

Los valores de las MGTs pre y post-vacunales en ambos grupos etarios, así como la razón de incremento de estos títulos (RIC) tras la vacunación están expuestos en la **Tabla 26**. Se realizó un perfil de las MGTs pre-vacunales y su incremento tras la vacunación estacional de gripe, ilustrado en la **Figura 39**. El mayor incremento en las MGTs de Acs-anti NA tras la vacunación se observó frente a la cepa A/California/07/2009 (pdm) en ambos grupos etarios, siendo ésta la cepa incluida en las vacunas administradas en estos individuos durante el estudio. La vacunación antigripal con la cepa A/California/07/2009 (pdm) también incrementó los títulos de Acs frente al resto de cepas gripales analizadas, aunque en menor medida.

Tabla 25. Media geométrica de los títulos (MGTs) post-vacunales de Acs anti-NA y diferencias entre las MGTs frente a las cepas gripales analizadas entre ambos grupos etarios (T-student; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	MGTs Anti-HA (IC95%) post-vacunales		p-valor
	15-64 años	≥ 65 años	
A/PR/8/1934	139,3 (109,3-176,8)	253,2 (202,6-315,1)	<0,001
A/Weiss/1943	858,9 (639,7 -1115,6)	1012,5 (772,2-1349,4)	0,402
A/FM/1/1947	331,2 (251,8-426,1)	542,6 (450,7-656,2)	0,002
A/Brazil/11/1978	685,6 (533,6-861,9)	464,3 (378,8-583,3)	0,012
A/Brisbane/59/2007	411,3 (326,5-515,2)	566,7 (471,4-677,2)	0,028
A/California/07/2009	342,8 (270,2-435,3)	460,3 (370,3-563,6)	0,077

Tabla 26. Medias geométricas de los títulos (MGTs) de Acs anti-NA pre y postvacunales y razón de incremento de los títulos (RIC) en ambos grupos etarios frente a las cepas gripales A(H1N1) analizadas.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo etario	MGTs pre- vacunales (IC 95%)	MGTs post-vacunales (IC 95%)	RIC
A/PR/8/1934	15- 64	106,5 (81,2-137,7)	139,3 (109,3-176,8)	1,3
	≥ 65	166,6 (131,1-209,9)	253,2 (202,6-315,1)	1,5
A/Weiss/1943	15- 64	369,6 (269,9-485,7)	858,9 (639,7 -1115,6)	2,3
	≥ 65	716,0 (534,0-974,7)	1012,5 (772,2-1349,4)	1,4
A/FM/1/1947	15- 64	169,5 (128,3-215,5)	331,2 (251,8-426,1)	2,0
	≥ 65	351,9 (283,9-434,4)	542,6 (450,7-656,2)	1,5
A/Brazil/11/1978	15- 64	448,5 (364,5-542,9)	685,6 (533,6-861,9)	1,5
	≥ 65	269,0 (211,8-336,1)	464,3 (378,8-583,3)	1,7
A/Brisbane/59/ 2007	15- 64	222,3 (179,5-276,4)	411,3 (326,5-515,2)	1,8
	≥ 65	251,0 (211,4-296,5)	566,7 (471,4-677,2)	2,3
A/California/07/ 2009	15- 64	100,2 (79,3-127,7)	342,8 (270,2-435,3)	3,4
	≥ 65	136,9 (109,2-170,9)	460,3 (370,3-563,6)	3,4

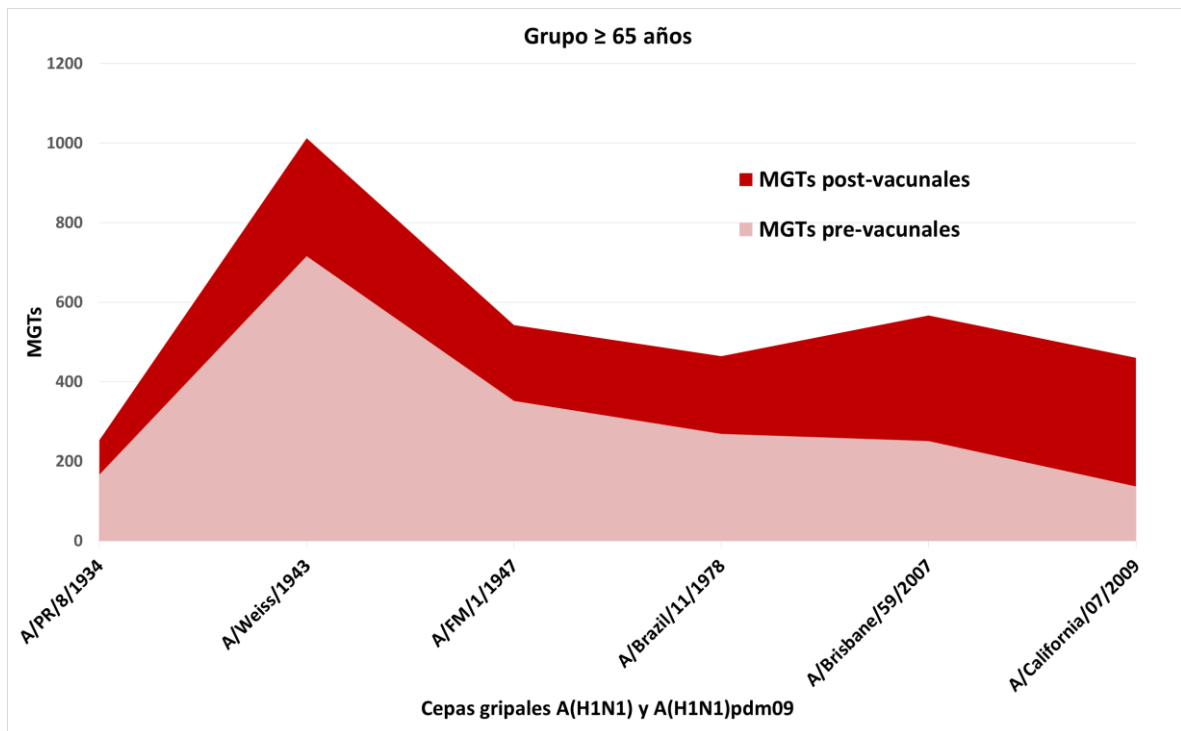
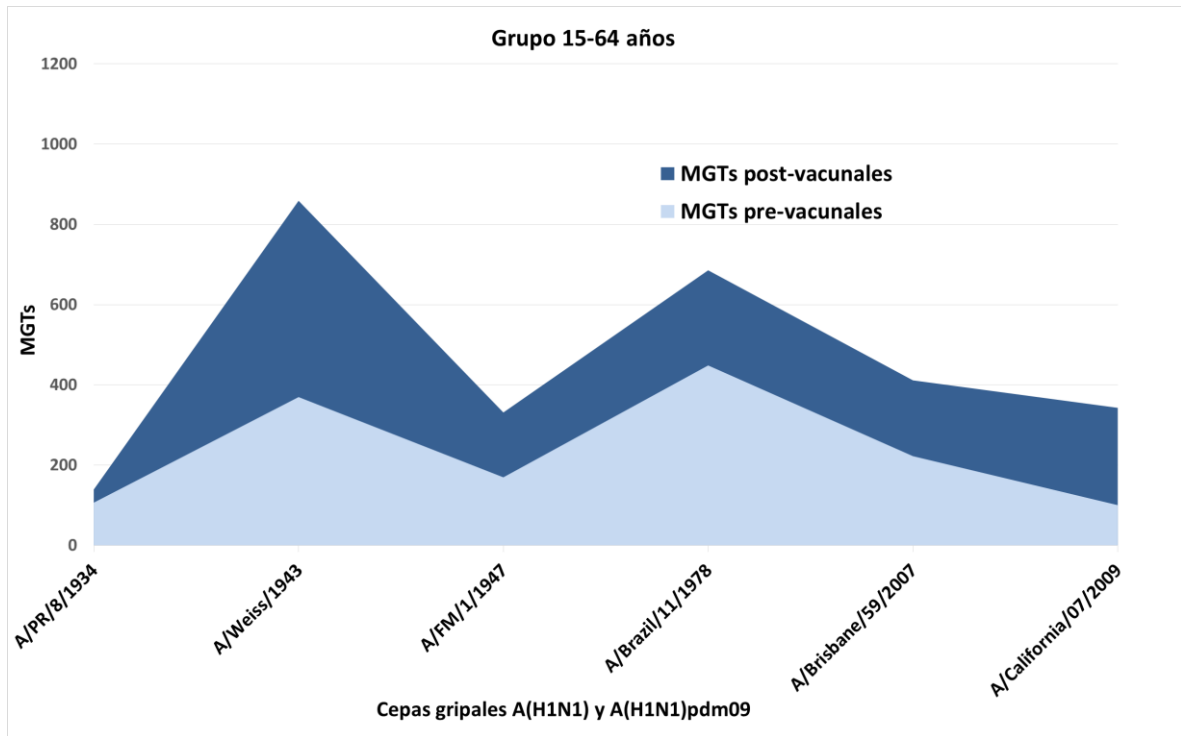


Figura 39. Perfil de las medias geométricas de los títulos (MGTs) de Acs anti-NA pre y post-vacunales en ambos grupos etarios frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

- **Análisis del efecto de la vacuna trivalente estacional sobre la generación de Acs anti-NA en función del grupo etario y de la temporada vacunal.**

En este epígrafe se analiza el efecto de la vacunación estacional antigripal sobre la generación de Acs anti-NA en función del grupo etario y de la temporada vacunal. Los dos grupos mayores de 65 años fueron vacunados en las dos temporadas analizadas con la misma vacuna adyuvada. Sin embargo, los dos grupos de adultos comparados en este trabajo se vacunaron con dos vacunas distintas, ya que durante la temporada 2013-14 recibieron una vacuna inactivada fraccionada preparada en cultivo de huevos embrionados de gallina, mientras que en la temporada 2014-15 el grupo de adultos se inmunizó con una vacuna inactivada de antígenos de superficie preparada en cultivos celulares. Esta diferencia en el tipo de vacuna administrada se tendrá en cuenta en la comparación entre las dos temporadas estudiadas en las que estén implicados los dos grupos de adultos.

La distribución del número de individuos con títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$ así como $\geq 1/80$ tras la vacunación antigripal en función de las campañas vacunales y en función del grupo etario está reflejada en las **Tabla 27 y 28**. La TSP post-vacunal, tanto para títulos $\geq 1/40$ como $\geq 1/80$, más baja frente a cepas gripales pertenecientes al subtipo A(H1N1) estacional fue la observada en el grupo de adultos frente a la cepa A/PR/8/1934 en la temporada 2013-2014 (TSP de 87,5% y de 62,5% para títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$ así como $\geq 1/80$, respectivamente). Frente a todas las cepas gripales pertenecientes al subtipo A(H1N1) estacional, la TSP post-vacunal ($\geq 1/40$) observada fue superior al 87,5% y al 97,5% en el grupo de adultos y de mayores de 65 años, respectivamente. Cuando se consideró el correlato de seroprotección en $1/80$, la TSP post-vacunal ($\geq 1/80$) observada fue superior al 62,5% y al 92,5% en el grupo de adultos y de mayores de 65 años, respectivamente.

Tabla 27. Número y porcentaje de individuos adultos y mayores de 65 años con títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$ tras la vacunación. Los datos se muestran en función de la temporada estacional y grupo etario frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Temporada 2013-2014		Temporada 2014-2015	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
A/PR/8/1934	35 (87,5)	39 (97,5)	39 (97,5)	40 (100,0)
A/Weiss/1943	40 (100,0)	40 (100,0)	38 (95,0)	40 (100,0)
A/FM/1/1947	39 (97,5)	40 (100,0)	39 (97,5)	40 (100,0)
A/Brazil/11/1978	40 (100,0)	40 (100,0)	39 (97,5)	40 (100,0)
A/Brisbane/59/2007	40 (100,0)	40 (100,0)	39 (97,5)	40 (100,0)
A/California/07/2009	39 (97,5)	40 (100,0)	40 (100,0)	40 (100,0)

Tabla 28. Número y porcentaje de individuos adultos y mayores de 65 años con títulos de Acs anti-NA $\geq 1/80$ tras la vacunación. Los datos se muestran en función de la temporada estacional y grupo etario frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Temporada 2013-2014		Temporada 2014-2015	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
A/PR/8/1934	25 (62,5)	39 (97,5)	39 (97,5)	37 (92,5)
A/Weiss/1943	40 (100,0)	40 (100,0)	38 (95,0)	40 (100,0)
A/FM/1/1947	38 (95,0)	40 (100,0)	36 (90,0)	40 (100,0)
A/Brazil/11/1978	40 (100,0)	40 (100,0)	39 (97,5)	39 (97,5)
A/Brisbane/59/2007	40 (100,0)	40 (100,0)	38 (95,0)	40 (100,0)
A/California/07/2009	37 (92,5)	39 (97,5)	38 (95,0)	39 (97,5)

El número y porcentaje de individuos que mostraron seroconversión homóloga y heteróloga tras la vacunación antigripal en función de las temporadas estacionales de gripe y en función del grupo etario poblacional se muestra en la **Tabla 29**. La respuesta a la vacunación en términos de seroconversión homóloga frente a la cepa A/California/07/2009 (subtipo A(H1N1)pdm09) fue al menos de un 40% en ambos grupos etarios y en cada una de las temporadas vacunales. La vacuna trivalente estacional indujo además una seroconversión heteróloga, aunque en menor magnitud, frente a las cepas A(H1N1) estacionales analizadas en ambas temporadas vacunales consideradas, oscilando desde una TSC del 5,0% en el grupo de mayor edad frente a la

cepa A/FM/1/1947 en la temporada 2013-14, hasta una TSC del 52,5% en el grupo de adultos frente a A/Weiss/1943 y una misma TSC del 52,5% en el grupo de mayor edad frente a A/Brisbane/59/2007, ambas TSC observadas en la temporada 2014-15.

Tabla 29. Número y porcentaje de individuos adultos y mayores de 65 años que seroconvierten tras la vacunación. Los datos se muestran en función de la temporada estacional y grupo etario frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Temporada 2013-2014		Temporada 2014-2015	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
A/PR/8/1934	7 (17,5)	4 (10,0)	0 (0,0)	5 (12,5)
A/Weiss/1943	4 (10,0)	6 (15,0)	21 (52,5)	5 (12,5)
A/FM/1/1947	11 (27,5)	2 (5,0)	6 (15,0)	8 (20,0)
A/Brazil/11/1978	4 (10,0)	3 (7,5)	8 (20,0)	12 (30,0)
A/Brisbane/59/2007	9 (22,5)	8 (20,0)	5 (12,5)	21 (52,5)
A/California/07/2009	16 (40,0)	24 (60,0)	26 (65,0)	20 (50,0)

Los valores de las MGTs pre y post-vacunales en ambos grupos etarios así como el incremento de estos títulos (RIC) tras la vacunación están expuestos en la **Tabla 30**. Las MGTs de Acs anti-NA observadas tras la vacunación en ambos grupos etarios aumentaron con respecto a las MGTs pre-vacunales observadas frente a todas las cepas del subtipo A(H1N1) y frente a la cepa del subtipo A(H1N1)pdm09 en ambas temporadas vacunales consideradas. El valor de la RIC observada en ambas temporadas y grupos etarios fue de al menos un 3,0 frente a la cepa del subtipo A(H1N1) pandémico, cepa incluida en la vacuna, mientras que frente a las cepas del subtipo A(H1N1), la RIC tras la vacunación osciló desde un 1,3 a 2,3 en la temporada 2013-14, y desde una RIC de 1,3 hasta 3,4 en la temporada 2014-15.

Tabla 30. Valores de la MGTs y RIC de los sueros pre y post-vacunales en ambos grupos etarios frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 en función de la campaña vacunal antigripal.

		Temporada 2013-2014		
Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo etario	MGTs pre-vacunales (IC 95%)	MGTs post-vacunales (IC 95%)	RIC
A/PR/8/1934	15- 64	62 (45,6-84,7)	78,6 (60,6-105,5)	1,3
	≥ 65	122,7 (82,7-169,4)	190,2 (146,0-249,0)	1,6
A/Weiss/1943	15- 64	444,6 (330,6-606,5)	697,6 (530,9-927,9)	1,6
	≥ 65	1575,1(1104,5-2227,1)	2306,0 (1737,0-3073,7)	1,5
A/FM/1/1947	15- 64	180,6 (128,7-253,9)	373,9 (269,0-526,1)	2,1
	≥ 65	476,5 (370,2-602,8)	650,9 (522,7-801,2)	1,4
A/Brazil/11/1978	15- 64	476,5 (371,1-617,9)	617,9 (484,9-788,9)	1,3
	≥ 65	393,8 (319,9-483,4)	538,0 (415,6-672,2)	1,4
A/Brisbane/59/ 2007	15- 64	269 (211,1-344,7)	476,5 (373,9-604,8)	1,8
	≥ 65	258,5 (212,8-316,5)	596,9 (479,3-747,7)	2,3
A/California/07/ 2009	15- 64	100,7 (74,6-140,8)	340,3 (253,5-450,4)	3,4
	≥ 65	113,1 (78,7-154,2)	437,0 (319,9-583,2)	3,6

		Temporada 2014-2015		
Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo etario	MGTs pre-vacunales (IC 95%)	MGTs post-vacunales (IC 95%)	RIC
A/PR/8/1934	15- 64	182,8 (133,8-244,2)	246,7 (191,1-325,5)	1,3
	≥ 65	226,2 (168,3-294,5)	337 (247,2-467,5)	1,5
A/Weiss/1943	15- 64	307,3 (182,9-498,5)	1057,4 (674,8-1593,6)	3,4
	≥ 65	325,5 (244,1-452,4)	444,6 (325,8-597,8)	1,4
A/FM/1/1947	15- 64	159,1 (109,6-228,4)	293,3 (200,6-415,8)	1,8
	≥ 65	259,8 (190,2-361,1)	452,4 (337,4-599,7)	1,7
A/Brazil/11/1978	15- 64	422,1 (299,9-575,0)	760,8 (517,6-10085,5)	1,8
	≥ 65	183,7 (130,2-269,0)	400,7 (285,0-556,9)	2,2
A/Brisbane/59/ 2007	15- 64	183,7 (127,7-270,3)	354,9 (245,5-514,4)	1,9
	≥ 65	193,5 (150,6-247,8)	538 (407,7-741,4)	2,8
A/California/07/ 2009	15- 64	99,7 (69,7-181,0)	345,4 (248,0-490,8)	3,5
	≥ 65	165,6 (120,9-221,2)	484,8 (364,3-650,1)	3,0

Como se ha comentado con anterioridad, los dos grupos de adultos comparados en este trabajo se vacunaron con dos vacunas inactivadas distintas mientras que los dos grupos mayores de 65 años fueron vacunados en las dos temporadas analizadas con la misma vacuna adyuvada. Con esta razón, se realizó una comparación estadística de la TSC y RIC entre las dos temporadas estudiadas en las que estaban implicados ambos grupos etarios (**Tabla 31 y 32**).

La TSC de los títulos de Acs anti-NA frente a la cepa del subtipo A(H1N1)pdm09 fue significativamente mayor en el grupo de adultos de la temporada 2014-2015 (TSC: 65,0%) con respecto a la cohorte de la temporada 2013-2014 (TSC: 40,0%). También se encontraron diferencias significativas en la TSC frente a cepas clásicas del subtipo A(H1N1) estacional. Por un lado, la TSC fue significativamente mayor frente a la cepa A/PR/8/1934 en la temporada 2013-2014 (TSC: 17,5%) con respecto a la temporada 2014-2015 (TSC: 0,0%). Por otro lado, la TSC fue significativamente mayor frente a la cepa A/Weiss/1943 en la temporada 2014-2015 (TSC: 52,5%) con respecto a la temporada 2013-2014 (TSC: 10,0%) (**Tabla 31**). En mayores de 65 años, la TSC observada frente a las cepas A/FM/1/1947, A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007 fue significativamente mayor en la temporada 2014-2015 (TSC de 20,0%, 30,0% y 52,5% respectivamente) con respecto a la cohorte poblacional de la temporada 2013-2014 (TSC de 5,0%, 7,5% y 20,0% respectivamente) (**Tabla 31**).

Analizando la comparación de la RIC de las medias geométricas de los títulos de Acs anti-NA en ambos grupos etarios en función de las temporadas vacunales, también se observaron diferencias significativas (**Tabla 32**). En adultos, la RIC frente a la cepa A/Weiss/1943 fue significativamente mayor en la temporada 2014-2015 (RIC: 3,4) con respecto a la RIC observada en la temporada 2013-2014 (RIC: 1,6). En mayores de 65 años, las RIC observadas frente a las cepas A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007 en la cohorte vacunada en la temporada 2014-2015 fueron significativamente superiores (RIC:2,2 y RIC:2,8 respectivamente) con respecto a la cohorte poblacional de la temporada 2013-2014 (RIC:1,4 y RIC:2,3 respectivamente).

Tabla 31. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de seroconversión (%-TSC) de los títulos de Acs anti-NA frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 en adultos y mayores de 65 años en función de la temporada vacunal considerada (χ^2 de Pearson; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Individuos 15-64 años			Individuos ≥ 65 años		
	Temp. 2013-14 n (%-TSC)	Temp. 2014-15 n (%-TSC)	p-valor	Temp. 2013-14 n (%-TSC)	Temp. 2014-15 n (%-TSC)	p-valor
A/PR/8/1934	7 (17,5)	0 (0,0)	0,006	4 (10,0)	5 (12,5)	0,723
A/Weiss/1943	4 (10,0)	21 (52,5)	<0,001	6 (15,0)	5 (12,5)	0,745
A/FM/1/1947	11 (27,5)	6 (15,0)	0,172	2 (5,0)	8 (20,0)	0,053
A/Brazil/11/1978	4 (10,0)	8 (20,0)	0,210	3 (7,5)	12 (30,0)	0,010
A/Brisbane/59/2007	9 (22,5)	5 (12,5)	0,239	8 (20,0)	21 (52,5)	0,002
A/California/07/2009	16 (40,0)	26 (65,0)	0,025	24 (60,0)	20 (50,0)	0,369

Tabla 32. Valores de significación estadística (p-valor) de la razón de incremento (RIC) de las MGTs de Acs anti-NA frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 en adultos y mayores de 65 años en función de la temporada vacunal considerada (T-Student; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Individuos 15-64 años			Individuos ≥ 65 años		
	Temp. 2013-14 RIC	Temp. 2014-15 RIC	p-valor	Temp. 2013-14 RIC	Temp. 2014-15 RIC	p-valor
A/PR/8/1934	1,3	1,3	0,998	1,6	1,5	0,453
A/Weiss/1943	1,6	3,4	0,001	1,5	1,4	0,933
A/FM/1/1947	2,1	1,8	0,455	1,4	1,7	0,059
A/Brazil/11/1978	1,3	1,8	0,078	1,4	2,2	0,001
A/Brisbane/59/2007	1,8	1,9	0,359	2,3	2,8	0,006
A/California/07/2009	3,4	3,5	0,271	3,6	3,0	0,039

- **Análisis de la eficacia vacunal según los criterios EMA.**

Para analizar la eficacia serológica de las vacunas utilizadas en la inducción de Acs anti-NA, se analizaron los parámetros determinados por la EMA (TSP, TSC y RIC). Este análisis permite realizar una aproximación sobre la eficacia de la vacuna estacional frente a la NA, utilizando parámetros que son utilizados únicamente frente a la HA. A pesar de que la EMA determina que para que la vacuna estacional sea eficaz serológicamente debe cumplir únicamente con uno de los tres criterios evaluados, en este trabajo hemos considerado necesario evaluar los tres criterios a la vez. El análisis de la eficacia serológica vacunal para Acs frente a la NA se realizó utilizando los dos correlatos serológicos propuestos, 1/40 y 1/80.

El análisis de la eficacia vacunal mostró que la TSP post-vacunal, tanto considerando un valor de seroprotección de 1/40 como de 1/80, fue superior al 90,0% tanto en mayores de 65 años como en adultos en ambas temporadas frente a todas las cepas A(H1N1) estacionales y frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico (**Tabla 33**). La única excepción observada a esta consideración fue la TSP post-vacunal en adultos frente a la cepa A/PR/8/1934.

La vacunación cumplió los tres criterios EMA de eficacia vacunal tanto en el grupo de adultos como en los individuos mayores de 65 años frente a la cepa pandémica A/California/07/2009 (**Tabla 33**).

Frente a cepas pertenecientes al subtipo A(H1N1) estacional se cumplieron los siguientes criterios (**Tabla 33**):

- Temporada 2013-2014:
 - Adultos:
 - A excepción de la TSP post-vacunal, tanto para valores 1/40 como 1/80, no se cumplió ningún criterio más frente a los virus A(H1N1) clásicos.
 - Mayores de 65 años:
 - La RIC fue de 2,3 (superior a 2,0) frente a la cepa A/Brisbane/59/2007. A excepción de la TSP post-vacunal tanto

para valores 1/40 como 1/80, no se cumplió ningún criterio más frente a los virus A(H1N1) clásicos.

- Temporada 2014-2015:
 - Adultos:
 - Tanto la TSC como la RIC fueron superiores al 40% (TSC 52,5%) y a 2,5 (RIC 3,4) respectivamente frente a la cepa A/Weiss/1943.
 - A excepción de la TSP post-vacunal, tanto para valores 1/40 como 1/80, no se cumplió ningún criterio más frente a los virus A(H1N1) clásicos.
 - Mayores de 65 años:
 - Tanto la TSC como la RIC fueron superiores al 30% y a 2,0 respectivamente frente a las cepas A/Brazil/11/1978 (TSC 30,0%; RIC 2,2) y A/Brisbane/59/2007 (TSC 52,5%; RIC 2,8).
 - A excepción de la TSP post-vacunal tanto para valores 1/40 como 1/80, no se cumplió ningún criterio más frente a los virus A(H1N1) clásicos.

Tabla 33. Valores de tasa de seroprotección ($TSP \geq 1/40$ y $\geq 1/80$), tasa de seroconversión (TSC) y Razón de Incremento (RIC) siguiendo los criterios EMA de eficacia serológica vacunal frente a las cepas de gripe A(H1N1) y cepa A(H1N1) pandémica, distribuidos en los grupos etarios y temporadas vacunales. *Color rojo: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA.

		Criterio EMA	A/PR/8/1934	A/Weiss/1943	A/FM/1/1947	A/Brazil/11/1978	A/Brisbane/59/2007	A/California/07/2009
Temporada 2013-2014	15-64 años	TSP $\geq 1/40$	87,5	100,0	97,5	100,0	100,0	97,5
		TSP $\geq 1/80$	62,5	100,0	95,0	100,0	100,0	92,5
		TSC	17,5	10,0	27,5	10,0	22,5	40,0
		RIC	1,3	1,6	2,1	1,3	1,8	3,4
	≥ 65 años	TSP $\geq 1/40$	97,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		TSP $\geq 1/80$	97,5	100,0	100,0	100,0	100,0	97,5
		TSC	10,0	15,0	5,0	7,5	20,0	60,0
		RIC	1,6	1,5	1,4	1,4	2,3	3,6
Temporada 2014-2015	15-64 años	TSP $\geq 1/40$	97,5	95,0	97,5	97,5	97,5	100,0
		TSP $\geq 1/80$	97,5	95,0	90,0	97,5	95,0	95,0
		TSC	0,0	52,5	15,0	20,0	12,5	65,0
		RIC	1,3	3,4	1,8	1,8	1,9	3,5
	≥ 65 años	TSP $\geq 1/40$	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		TSP $\geq 1/80$	92,5	100,0	100,0	97,5	100,0	97,5
		TSC	12,5	12,5	20,0	30,0	52,5	50,0
		RIC	1,5	1,4	1,7	2,2	2,8	3,0

Análisis filogenético del gen de la Neuraminidasa (N1) de las cepas gripales

Con el objetivo de conocer la distancia genética y la relación filogenética de las cepas de gripe A(H1N1) utilizadas en los estudios serológicos, se realizó un análisis de las secuencias del gen de la NA de las cepas gripales incluidas en el estudio. Se realizaron dos análisis filogenéticos. En el primero, se incluyó el gen de la NA de las cepas del estudio y además otras cepas de gripe representativas del resto de NAs existentes (**Figura 40**). El segundo análisis incluyó únicamente las cepas de gripe A(H1N1) que fueron utilizadas en los estudios serológicos (**Figura 41**).

La similitud genética (% de similitud/100) del gen de la NA entre los diferentes virus de la gripe A(H1N1) y A(H1N1) pdm09 analizados se describen en la **Tabla 34**. La homología genética observada en el gen de la NA entre las cepas del subtipo A(H1N1) clásico fue superior al 85%. La homología genética más elevada se observó entre las cepas A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947 (96,7%) y la más baja entre las cepas A/PR/8/1934 y A/Brisbane/59/2007 (85,6%). La cepa pandémica A/California/07/2009 (subtipo A(H1N1)pdm09) mostró una homología genética con las cepas pertenecientes al subtipo A(H1N1) clásico de entre el 72,1% (A/Brisbane/59/2007) y el 76,4% (A/FM/1/1947).

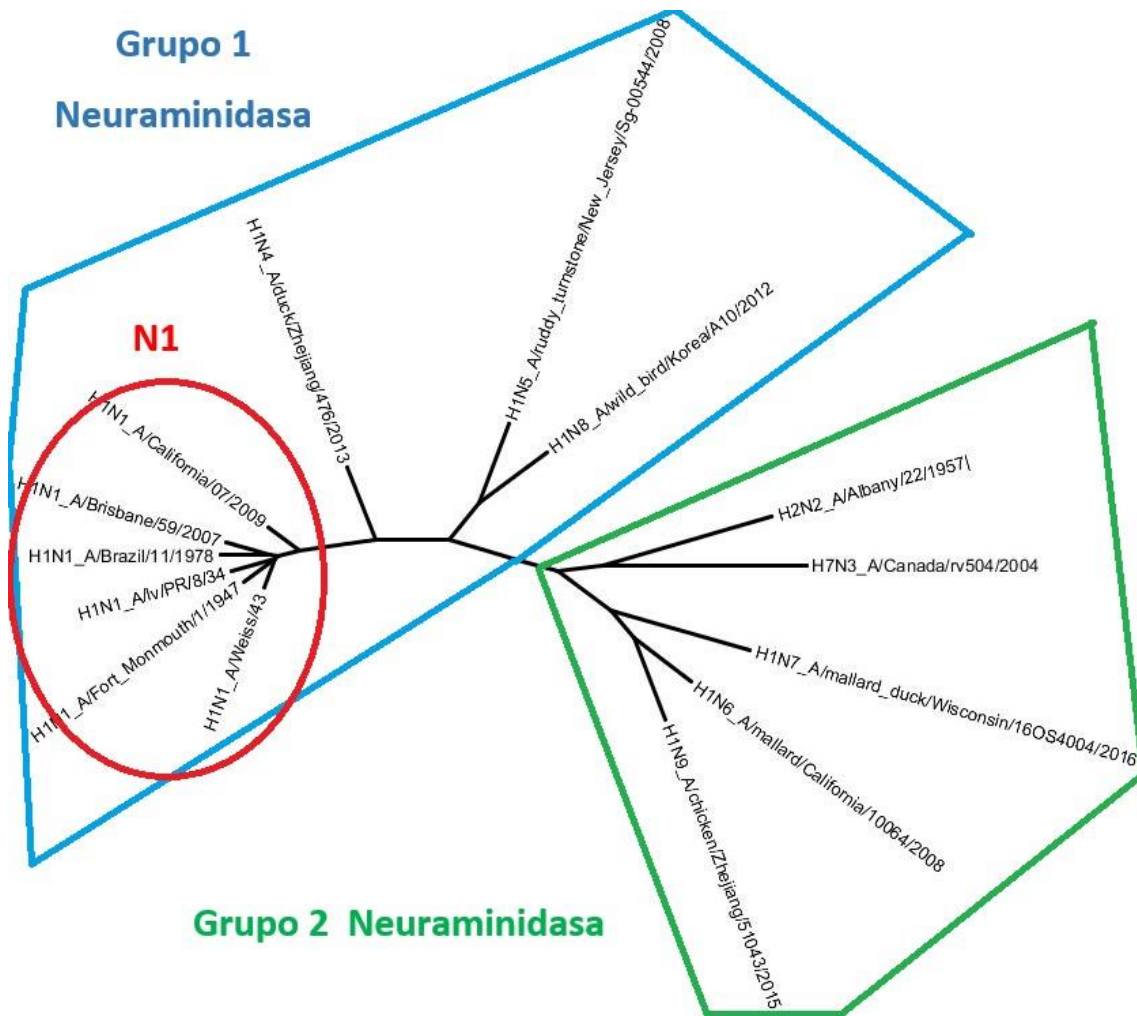


Figura 40. Árbol filogenético del gen de la NA de las cepas gripales A(H1N1) incluidas en el estudio y de cepas pertenecientes al resto de subtipos de NA descritos.

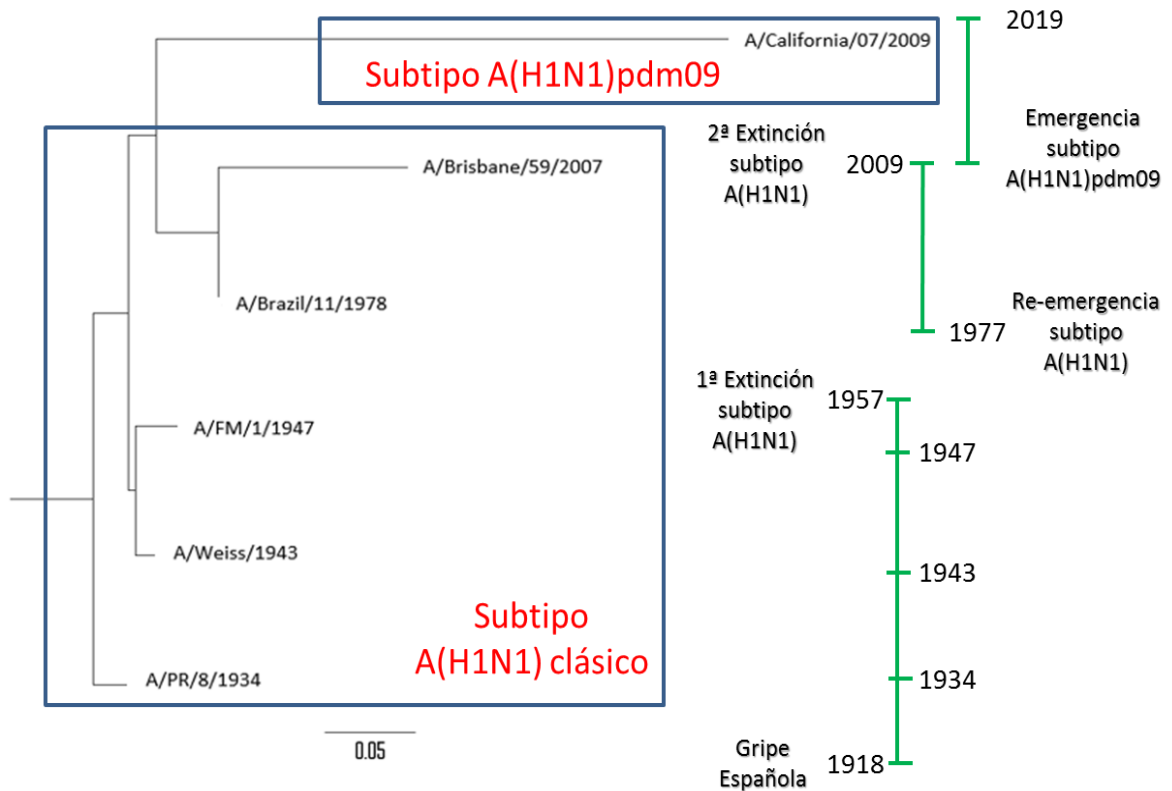


Figura 41. Árbol filogenético del gen de la NA de las cepas gripales de los subtipos A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 incluidas en el estudio. Escala temporal de los eventos más importantes del subtipo A(H1N1) clásico y del subtipo A(H1N1)pdm09 durante la historia natural de este virus en los siglos XX y XXI.

Tabla 34. Similitud genética expresada como % similitud/100 del gen de la neuraminidasa (N1) entre las diferentes cepas gripales del subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 incluidas en el estudio.

	A/California/07/2009	A/Brisbane/59/2007	A/Brazil/11/1978	A/FM/1/1947	A/Weiss/1943	A/PR/8/1934
A/California/07/2009	1,000					
A/Brisbane/59/2007	0,721	1,000				
A/Brazil/11/1978	0,762	0,909	1,000			
A/FM/1/1947	0,764	0,857	0,929	1,000		
A/Weiss/1943	0,752	0,864	0,941	0,967	1,000	
A/PR/8/1934	0,753	0,856	0,920	0,938	0,950	1,000

Análisis de Acs anti-HA previos a la vacunación

En este apartado se estudia la presencia de Acs anti-HA pre-vacunales en ambas cohortes de población analizadas (≥ 65 años y de 15-64 años) frente a las cepas gripales clásicas del subtipo A(H1N1) estacional y frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico. Para el análisis de la presencia de Acs anti-HA se utilizó únicamente el correlato de seroprotección con títulos $\geq 1/40$, que es el que tradicionalmente se ha utilizado para los análisis serológicos frente a este antígeno.

En primer lugar, en este epígrafe se analiza el nivel de Acs anti-HA pre-vacunales en la población global del estudio, y en segundo lugar, se analiza el nivel de Acs en los dos grupos etarios de población estudiados y en función de la cada temporada analizada.

- **Análisis de la presencia de Acs anti-HA pre-vacunales en la población global del estudio.**

El análisis de los títulos de Acs anti-HA de los sueros pre-vacunales frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico mostró una TSP pre-vacunal del 70,6% (n=113) en la población global estudiada (**Figura 42**). Frente a las cepas del subtipo A(H1N1) clásico se observaron las siguiente TSP pre-vacunales:

- A/PR/8/1934: 19,4% (n=31).
- A/Weiss/1943: 12,5% (n=20).
- A/FM/1/1947: 39,4% (n=63).
- A/Brazil/11/1978: 51,3% (n=82).
- A/Brisbane/59/2007: 53,1% (n=85).

La TSP pre-vacunal aumentó de forma continua en la población global desde la primera cepa analizada (A/PR/8/1934) hasta la cepa A/California/07/2009, coincidiendo las TSP pre-vacunales más bajas con los virus más antiguos y las más altas con las cepas de circulación más actual.

La cepa gripal que más sueros mostró con títulos elevados (por encima de 1/160) fue la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico (36,9%) (**Tabla 35**). Por otro lado, el porcentaje global de sueros con títulos mayores a este valor (1/160) no superó el 10% frente a ninguna de las cepas gripales del subtipo A(H1N1) clásico.

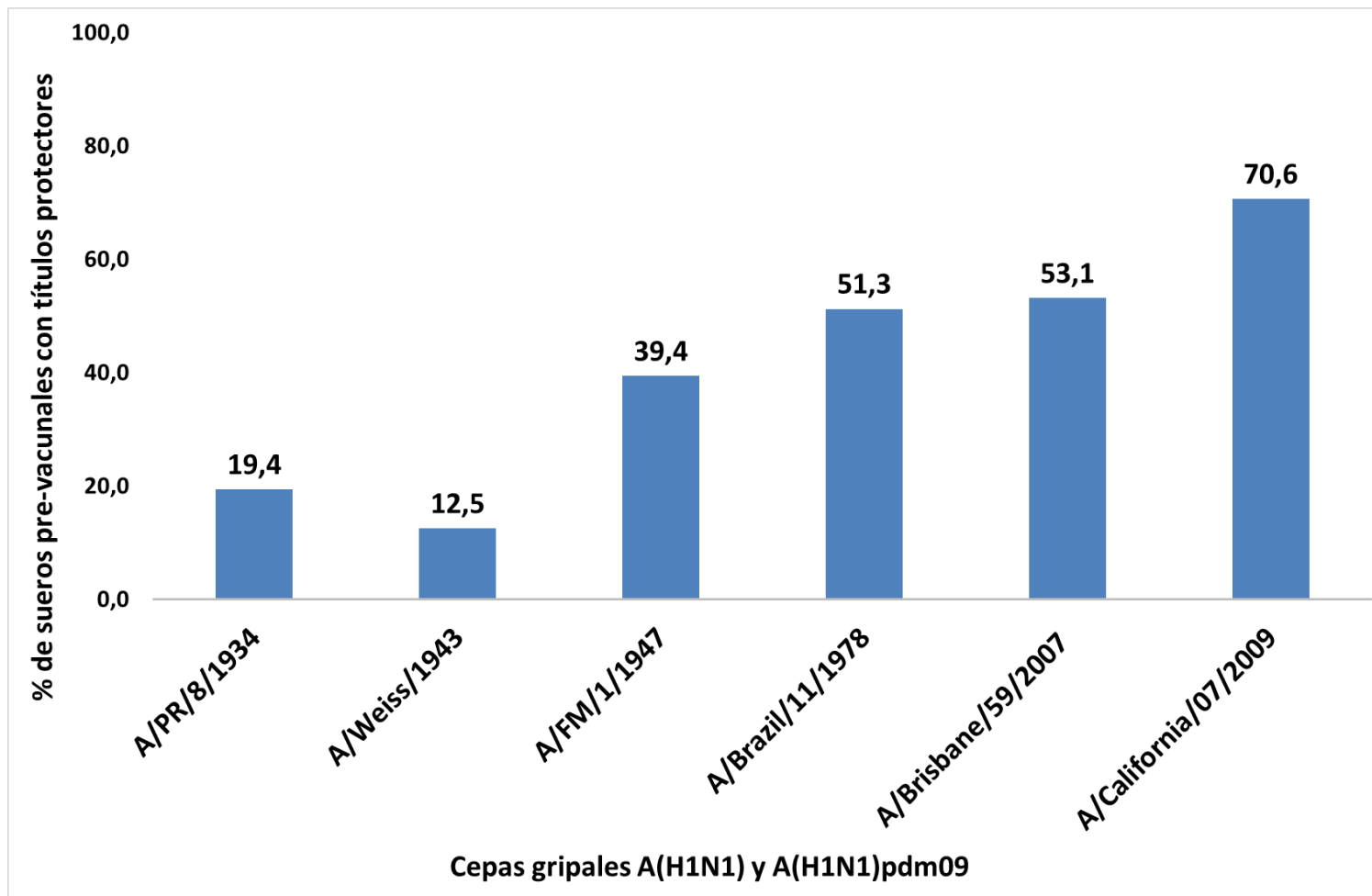


Figura 42. Tasa de seroprotección pre-vacunal global frente a la HA de cepas A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09.

Tabla 35. Distribución global de los títulos de Acs anti-HA pre-vacunales e individuos con títulos protectores de Acs anti-HA frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. Nº: número de individuos; %: distribución porcentual.

Título	A/PR/8/1934		A/Weiss/1943		A/FM/1/1947		A/Brazil/11/1978		A/Brisbane/59/2007		A/California/07/2009	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<10	58	36,3	89	55,6	29	18,1	10	6,3	1	0,6	0	0,0
10	44	27,5	36	22,5	28	17,5	15	9,4	29	18,1	29	18,1
20	27	16,9	15	9,4	40	25,0	53	33,1	45	28,1	18	11,3
40	20	12,5	14	8,8	36	22,5	43	26,9	51	31,9	24	15,0
80	8	5,0	3	1,9	17	10,6	23	14,4	24	15,0	30	18,8
160	2	1,3	3	1,9	7	4,4	16	10,0	9	5,6	20	12,5
320	1	0,6	0	0,0	3	1,9	0	0,0	1	0,6	19	11,9
640	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	20	12,5
Títulos ≥ 1 /40	31	19,4	20	12,5	63	39,4	82	51,3	85	53,1	113	70,6

- **Análisis de la presencia de Acs anti-HA pre-vacunales en función del grupo etario.**

El ensayo serológico RIH demostró la presencia de Acs anti-HA antes de la vacunación frente a todas las cepas A(H1N1) analizadas en ambos grupos etarios (**Figura 43**). En el grupo de adultos, la TSP pre-vacunal más baja fue observada frente a la cepa A/Weiss/1943 (6,3%), y la más elevada frente a la cepa A/California/07/2009 (75,0%). En el caso de los individuos mayores de 65 años, la TSP pre-vacunal más baja se observó frente a la cepa A/Weiss/43 (18,8%) y la más elevada frente a la cepa A/California/07/2009 (66,3%).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la TSP pre-vacunal entre ambos grupos etarios frente a las cepas A/PR/8/1934, A/Weiss/1943, A/FM/1/1947 y A/Brisbane/59/2007 (χ^2 de Pearson; $p < 0.05$) (**Tabla 36**); siendo la TSP pre-vacunal significativamente más elevada en el grupo ≥ 65 años frente a las dos cepas A(H1N1) clásicas A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943, y significativamente más elevada en el grupo de edad de 15-64 años frente a las cepas A/FM/1/1947 y A/Brisbane/59/2007 (χ^2 de Pearson; $p < 0.05$).

La presencia de Acs anti-HA de los sueros pre-vacunales fue analizada mediante el cálculo de la Media Geométrica de los títulos (MGTs). El test T de Student para muestras independientes se utilizó para comprobar la existencia de diferencias entre los valores MGTs pre-vacunales entre ambos grupos etarios frente a los distintos virus gripales del subtipo A(H1N1) estacional y A(H1N1) pandémico (**Tabla 37**).

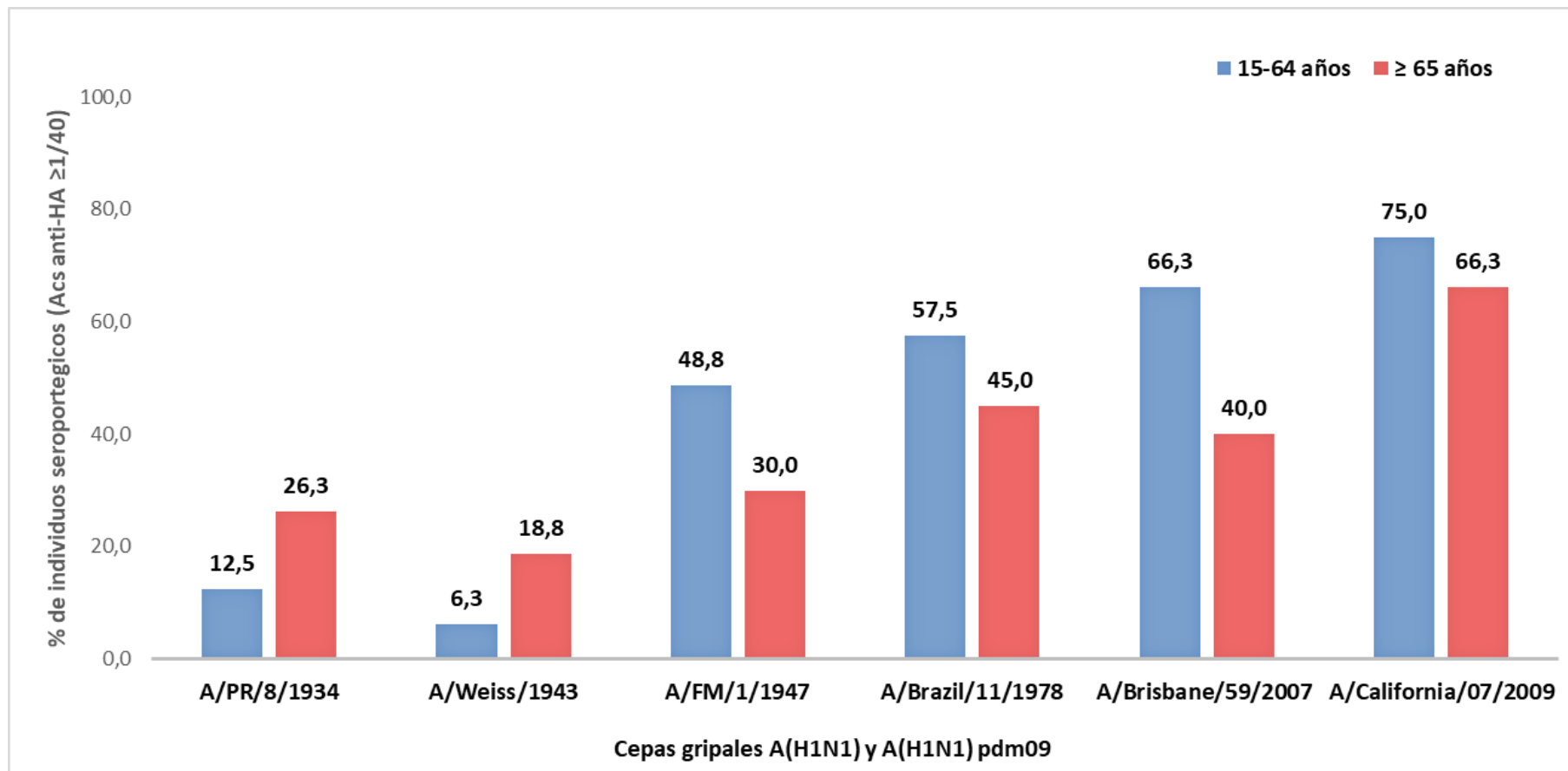


Figura 43. Distribución porcentual de individuos con títulos de Acs anti-HA protectores ($\geq 1/40$) entre grupos etarios frente a las cepas de gripe A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09.

Tabla 36. Tasa de seroprotección pre-vacunal y número total de individuos con títulos de Acs anti-HA protectores antes de la vacunación frente a cada cepa de gripe analizada por grupo etario. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de seroprotección frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. N: número de individuos pre-protectidos; % (TSP): tasa de seroprotección pre-vacunal.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	15-64 años		≥ 65 años		p-valor
	N	% (TSP)	N	% (TSP)	
A/PR/8/1934	10	12,5	21	26,3	0,003
A/Weiss/1943	5	6,3	15	18,8	0,010
A/FM/1/1947	39	48,8	24	30,0	0,013
A/Brazil/11/1978	46	57,5	36	45,0	0,316
A/Brisbane/59/2007	53	66,3	32	40,0	0,025
A/California/07/2009	60	75,0	53	66,3	0,316

Tabla 37. Media geométrica de los títulos (MGTs) de Acs anti-HA y diferencias entre los valores MGTs de los sueros pre-vacunales frente cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 por grupo etario. IC95%: intervalo de confianza al 95%; (p<0,05).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	MGTs Anti-HA (IC95%) pre-vacunales		p-valor
	15-64 años	≥ 65 años	
A/PR/8/1934	9,1 (7,8-10,7)	16,4 (13,2-20,9)	<0,001
A/Weiss/1943	7,6 (6,6-8,9)	10,6 (8,6-13,1)	0,010
A/FM/1/1947	27,6 (22,1-33,6)	16,8 (13,2-21,0)	0,002
A/Brazil/11/1978	38,0 (32,2-45,8)	25,5 (20,4-31,5)	0,005
A/Brisbane/59/2007	40,7 (34,4-49,4)	23,6 (19,8-27,9)	<0,001
A/California/07/2009	101,1 (73,0-136,8)	49,2 (37,7-65,2)	0,001

La MGTs pre-vacunales más elevada se observó frente a la cepa A/California/07/2009 en el grupo de individuos de 15-64 años (**Tabla 37**). Cabe destacar que el valor de la MGTs en el grupo de individuos ≥ 65 años frente a la cepa pandémica supone menos de la mitad del valor de MGTs correspondiente al grupo de adultos. El análisis de la MGTs demostró la existencia de diferencias significativas entre ambos grupos etarios frente a todas las cepas gripales A(H1N1) analizadas (Test T-Student; $p < 0,05$), siendo la MGTs significativamente más elevada en los ≥ 65 años frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943, y significativamente más elevada en los adultos frente a las cepas y A/FM/1/1947, A/Brazil/11/1978, A/Brisbane/59/2007 y A/California/07/2009 (Student-T; $p < 0.05$).

- **Análisis del nivel de Acs anti-HA pre-vacunales en función de la temporada estacional y grupo etario.**

La TSP pre-vacunal en función de las temporadas estacionales de gripe y en función del grupo etario poblacional queda reflejada en la **Tabla 38**. Se realizó un test Chi-cuadrado ($\alpha = 0,05$) para comprobar si la TSP pre-vacunal frente a cada una de las cepas gripales A(H1N1) estudiadas fue diferente entre las dos temporadas estacionales de gripe y entre ambos grupos etarios. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las TSP pre-vacunales entre ambas temporadas, ni para adultos ni para mayores de 65 años (χ^2 de Pearson; $p < 0.05$) (**Tablas 39 y 40**).

Tabla 38. Tasa de seroprotección pre-vacunal y número de individuos con títulos de Acs anti-HA protectores ($\geq 1/40$) en cada temporada y grupo etario frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. %-TSP: tasa de seroprotección pre-vacunal.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Temporada 2013-2014		Temporada 2014-2015	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	N (%-TSP)	N (%-TSP)	N (%-TSP)	N (%-TSP)
A/PR/8/1934	3 (7,5)	8 (20,0)	7 (17,5)	13 (32,5)
A/Weiss/1943	3 (7,5)	7 (17,5)	2 (5,0)	8 (20,0)
A/FM/1/1947	22 (55,0)	14 (35,0)	17 (42,5)	10 (25,0)
A/Brazil/11/1978	23 (57,5)	17 (42,5)	23 (57,5)	19 (47,5)
A/Brisbane/59/2007	30 (75,0)	20 (50,0)	23 (57,5)	12 (30,0)
A/California/07/2009	28 (70,0)	23 (57,5)	32 (80,0)	30 (75,0)

Tabla 39. Número de individuos seroprottegidos antes de la vacunación (Acs anti-HA $\geq 1/40$) de 15-64 años en función de la temporada estacional frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 (χ^2 de Pearson; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Individuos 15-64 años		p-valor
	Temp. 2013-14	Temp. 2014-15	
	($n_1=40$)	($n_2=40$)	
A/PR/8/1934	3	7	0,176
A/Weiss/1943	3	2	0,644
A/FM/1/1947	22	17	0,263
A/Brazil/11/1978	23	23	1,000
A/Brisbane/59/2007	30	23	0,098
A/California/07/2009	28	32	0,302

Tabla 40. Número de individuos seroprottegidos antes de la vacunación (Acs anti-HA \geq 1/40) mayores de 65 años en función de la temporada estacional frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 (χ^2 de Pearson; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Individuos \geq 65 años		p-valor
	Temp. 2013-14 (n ₁ =40)	Temp.2014-15 (n ₂ =40)	
A/PR/8/1934	8	13	0,204
A/Weiss/1943	7	8	0,775
A/FM/1/1947	14	10	0,329
A/Brazil/11/1978	17	19	0,653
A/Brisbane/59/2007	20	12	0,068
A/California/07/2009	23	30	0,098

Análisis de los Acs anti-HA tras la vacunación estacional frente al subtipo A(H1N1)pdm09

En este apartado se estudia el efecto de la vacuna trivalente anual para inducir la producción de Acs anti-HA frente a cepas gripales clásicas del subtipo A(H1N1) estacional y frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico.

- **Análisis global del efecto de la vacuna trivalente estacional sobre la generación de Acs anti-HA frente a cepas de gripe A(H1N1) clásicas y actuales.**

La distribución de los títulos de Acs anti-HA post-vacunales frente a las cepas del subtipo A(H1N1) clásico y A(H1N1)pdm09 analizadas en la población estudiada se representa en la **tabla 41**. El análisis serológico mediante RIH de los sueros pre-vacunales y post-vacunales de la población del estudio mostró un aumento en el número de individuos con títulos protectores de Acs anti-HA (\geq 1/40) tras la administración de la vacuna estacional anual frente a todas las cepas gripales A(H1N1) analizadas (**Figura 44**). La mayor TSP tras la vacunación fue de 93,1% frente a la cepa

A/California/07/2009, y la menor fue de 12,5% frente a la cepa A/Weiss/1943. La TSP post-vacunal aumentó con respecto a la pre-vacunal entre 1,31 veces frente a la cepa A/California/07/2009 (subtipo A(H1N1)pdm09) y 1,67 veces frente a la cepa A/PR/8/1934, lo que supone que la TSP post-vacunal aumentó globalmente de media un 33% con respecto a la pre-vacunal.

Los valores de la TSP, TPV y TSC obtenidos mediante el estudio RIH de los sueros pre y post-vacunales frente a las cepas gripales del subtipo A(H1N1) estacional y del subtipo A(H1N1) pandémico están expuestos en la **Tabla 42** y **Figura 45**. La mayor TSC tras la vacunación se observó frente a la cepa A/California/07/2009 (43,1%) y la menor frente a la cepa A/Weiss/1943 (4,4%). Entre los parámetros de este estudio se analizó también la tasa de protección conferida por la vacuna (TPV), calculándose como el porcentaje de individuos que adquirieron un título $\geq 1/40$ frente a un determinado virus tras la vacunación. La vacunación estacional administrada en la población global, que incluía la cepa A/California/07/2009 (pdm), indujo un aumento homólogo de los Acs anti-HA hasta títulos protectores en el 22,5% (TPV) de los individuos frente a dicha cepa pandémica. También se observó un aumento en el nivel de Acs anti-HA protectores frente a cada una de las cepas del subtipo A(H1N1) estacional incluidas en el estudio. Este aumento en el nivel de Acs anti-HA protectores tras la vacunación (TPV) fue desde un 4,4% (A/Weiss/1943) hasta un 18,8% (A/Brisbane/59/2007). Ninguna de las cepas gripales estacionales estudiadas estaba incluida como cepa vacunal en las temporadas vacunales del estudio.

Tabla 41. Distribución global de los títulos de Acs anti-HA post-vacunales frente a cepas del subtipo A(H1N1) y subtipo A(H1N1)pdm09. N: número de individuos; %: distribución porcentual.

Título	A/PR/8/1934		A/Weiss/1943		A/FM/1/1947		A/Brazil/11/1978		A/Brisbane/59/2007		A/California/07/2009	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<10	36	22,5	58	36,3	14	8,8	6	3,8	0	0,0	0	0,0
10	45	28,1	49	30,6	20	12,5	15	9,4	13	8,1	4	2,5
20	27	16,9	26	16,3	40	25,0	29	18,1	32	20,0	7	4,4
40	22	13,8	10	6,3	37	23,1	52	32,5	54	33,8	14	8,8
80	23	14,4	11	6,9	29	18,1	38	23,8	41	25,6	16	10,0
160	5	3,1	3	1,9	15	9,4	20	12,5	13	8,1	29	18,1
320	2	1,3	3	1,9	4	2,5	0	0,0	5	3,1	25	15,6
640	0	0,0	0	0,0	1	0,6	0	0,0	1	0,6	65	40,6
>640	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,6	0	0,0
Títulos ≥ 1/40	52	32,5	27	16,9	86	53,8	110	68,8	115	71,9	149	93,1

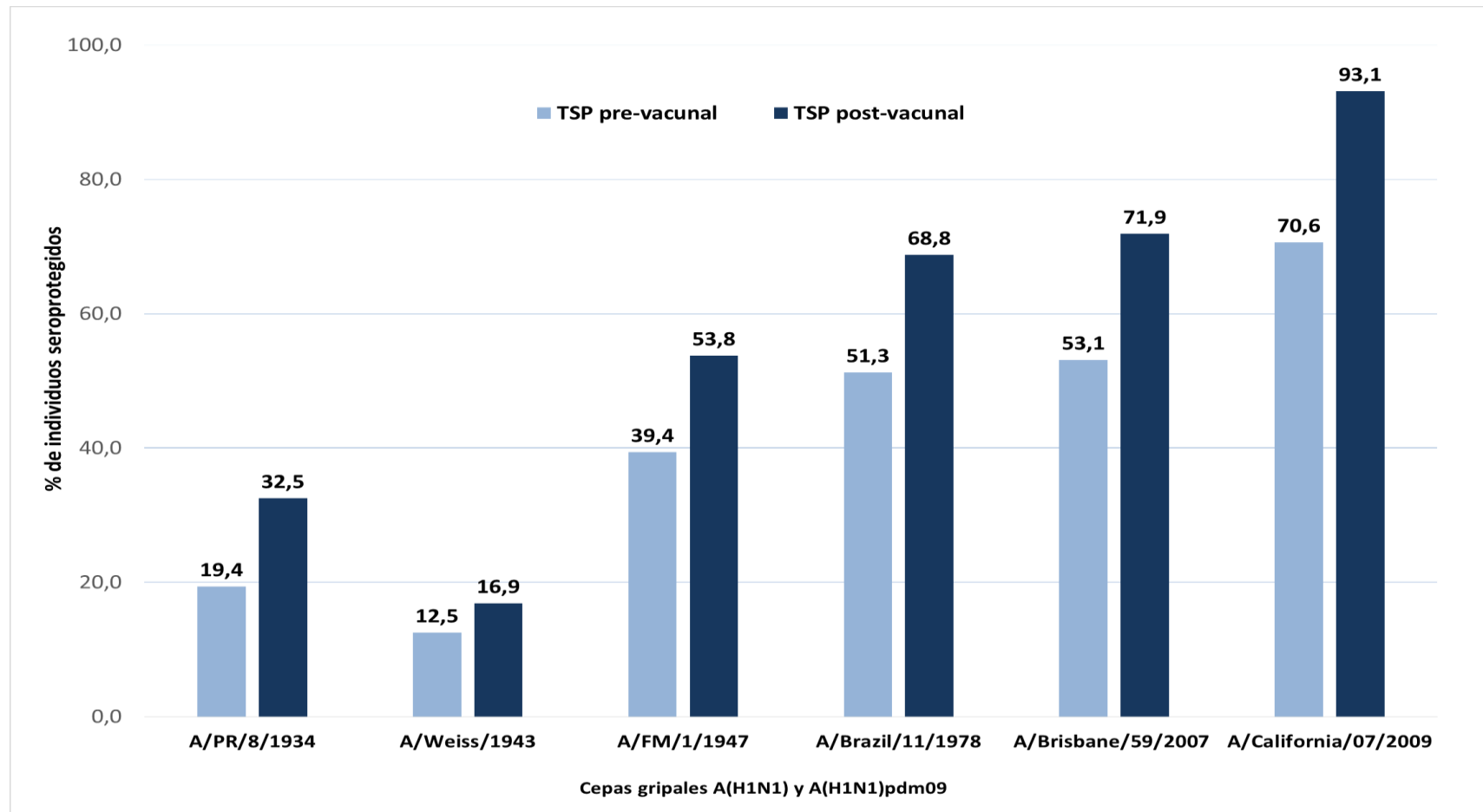


Figura 44. Tasa de seroprotección (TSP) global pre y post-vacunal frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Tabla 42. Resultados globales de la TSP pre y post-vacunal, TPV y TSC frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. TSP: tasa de seroprotección; TPV: tasa de protección vacunal; TSC: tasa de seroconversión.

	A/PR/8/1934	A/Weiss/1943	A/FM/1/1947	A/Brazil/11/1978	A/Brisbane/59/2007	A/California/07/2009
Nº total de sueros	160	160	160	160	160	160
Nº pre-protegidos	31	20	63	82	85	113
TSP pre-vacunal (%)	19,4	12,5	39,4	51,3	53,1	70,6
Nº post-protegidos	52	27	86	110	115	149
TSP post-vacunal (%)	32,5	16,9	53,8	68,8	71,9	93,1
TPV (%)	13,1	4,4	14,4	17,5	18,8	22,5
Nº seroconversiones	16	7	18	10	24	69
TSC (%)	10,0	4,4	11,3	6,3	15,0	43,1

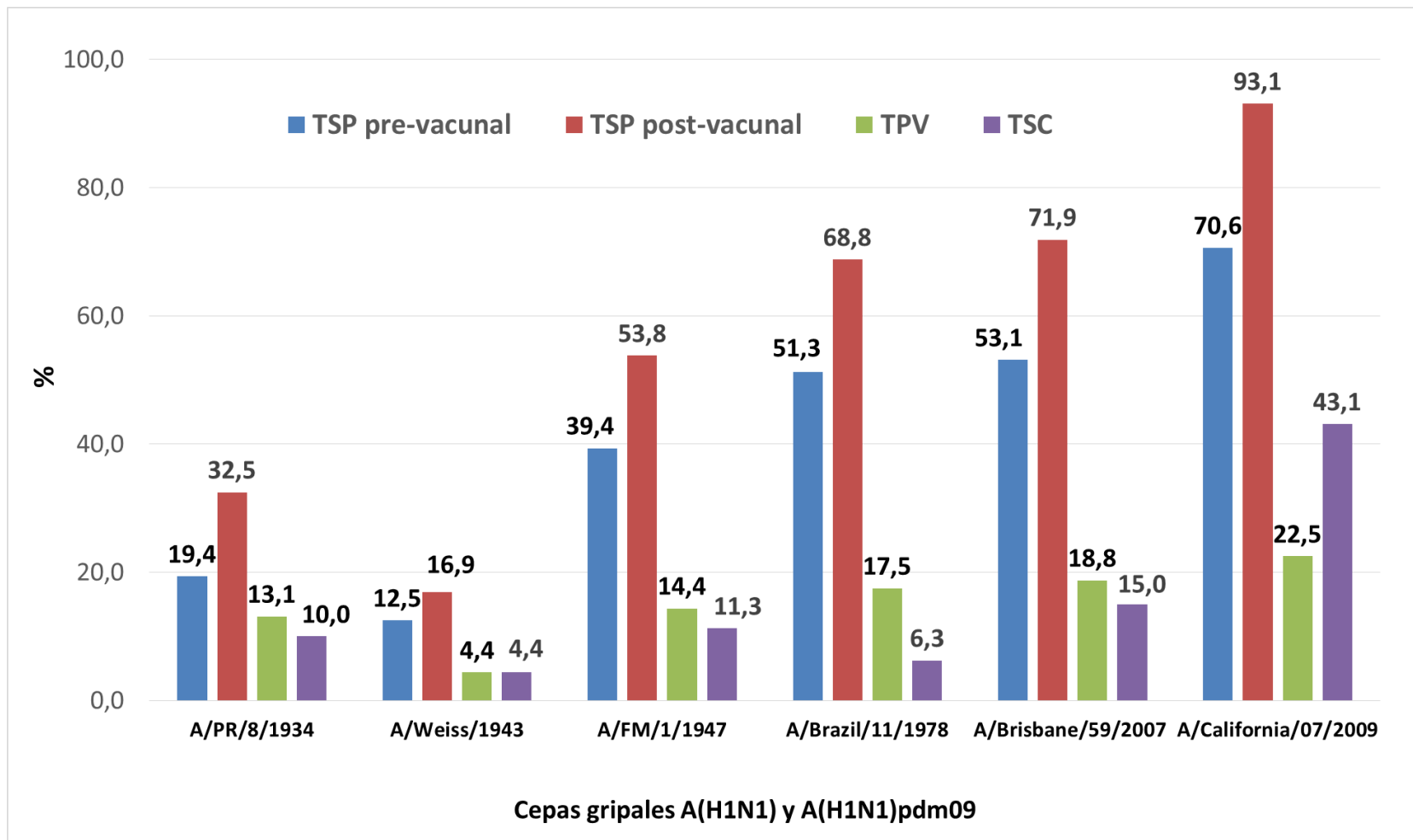


Figura 45. Valores globales de TSP, TPV y TSC frente a las cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

- **Análisis del efecto de la vacuna trivalente estacional sobre la generación de Acs anti-HA en función del grupo etario.**

De igual modo que en el análisis por grupo etario de los Acs frente a la NA, el análisis de la producción de Acs anti-HA en función del grupo etario no sólo busca mostrar las diferencias debidas a la edad de los individuos adultos y mayores de 65 años, sino también mostrar las diferencias entre dos conceptos vacunales diferentes. Es necesario recordar que el grupo de mayores de 65 años fue vacunado con una vacuna adyuvada, mientras que los adultos fueron vacunados con vacunas inactivadas sin adyuvante. Por tanto, los resultados mostrados a continuación hacen referencia tanto a las diferencias de edad como a las debidas al uso de un tipo de vacuna diferente en cada grupo. Con el fin de facilitar la redacción de los resultados, se utilizará solo la comparación etaria como referencia de ambos conceptos.

Tras la vacunación antigripal, se observó un aumento de la TSP post-vacunal en ambos grupos etarios frente a todas las cepas analizadas (**Figura 46**). Se observó una TSP post-vacunal superior al 18.8% de los individuos adultos y del 26.3% en el grupo ≥ 65 años frente a todas las cepas A(H1N1) y A(H1N1) pdm09. El aumento de la TSP fue significativo en ambos grupos etarios frente a todas las cepas (McNemar; $p < 0.05$) con excepción del grupo de individuos de 15-64 años frente a la cepa A/Weiss/1943 (**Tabla 43**).

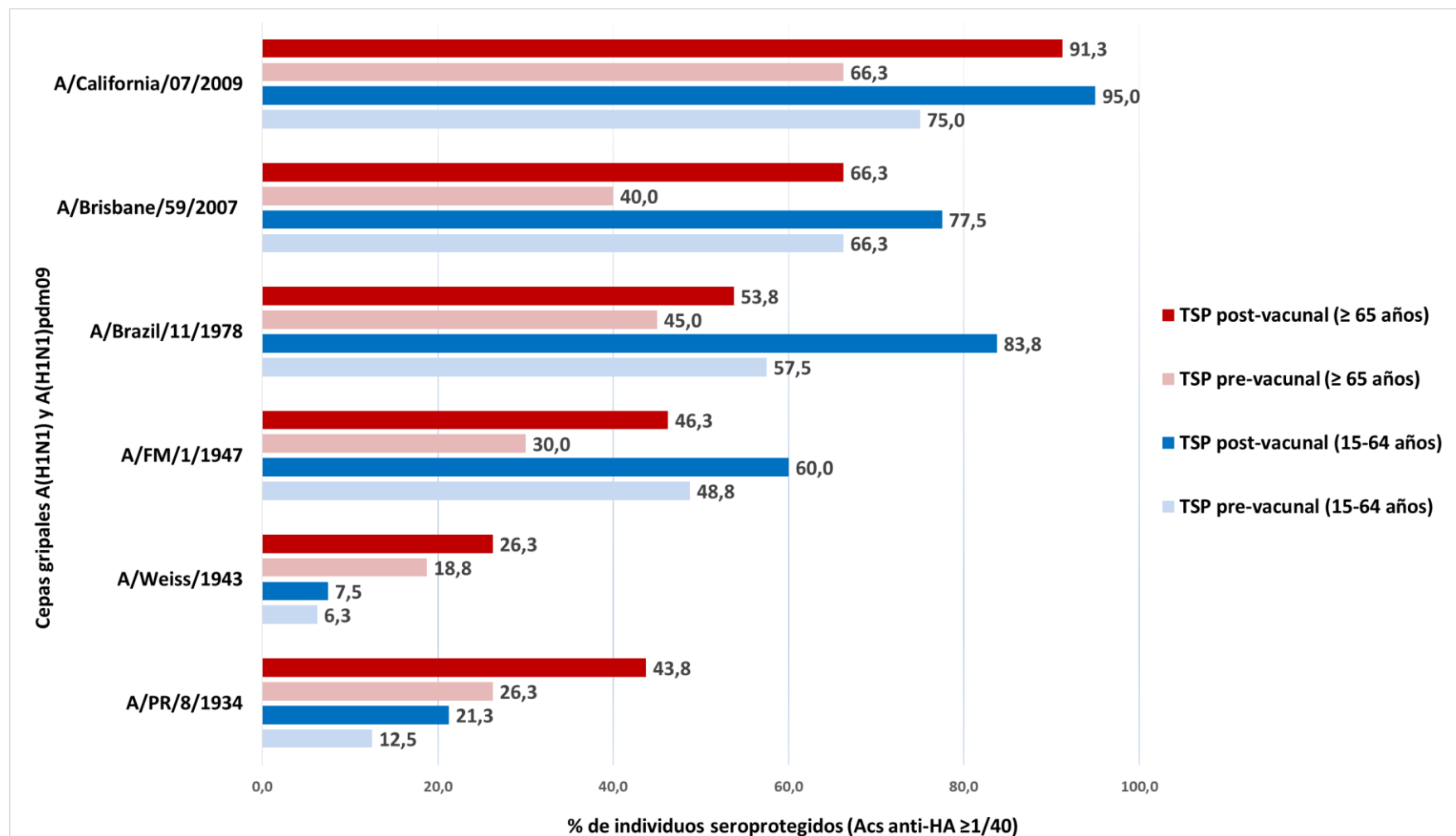


Figura 46. Tasa de Seroprotección global pre y post-vacunal en ambos grupos etarios analizados frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Tabla 43. Número de individuos con títulos de Acs anti-HA protectores ($\geq 1/40$) antes y después de la vacunación antigripal. Valores de significación estadística (p-valor) del número de individuos seroprottegidos antes y después de la vacunación frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo 15-64 años (n ₁ =80)			Grupo ≥ 65 años (n ₂ =80)		
	Nº pre- protegidos	Nº post- protegidos	p-valor	Nº pre- protegidos	Nº post- protegidos	p-valor
A/PR/8/1934	10	17	0,016	21	35	<0,001
A/Weiss/1943	5	6	1,000	15	21	0,031
A/FM/1/1947	39	49	0,002	24	37	<0,001
A/Brazil/11/1978	46	67	<0,001	36	43	0,016
A/Brisbane/59/2007	53	62	0,004	32	53	<0,001
A/California/07/2009	60	76	<0,001	53	73	<0,001

Para analizar si la vacunación estacional antigripal de la población a estudio indujo una respuesta humoral significativa en términos de seroconversión (TSC) frente a los diferentes virus analizados, se realizó un test de McNemar de muestras relacionadas ($\alpha=0,05$). La vacunación estacional frente a la cepa A/California/07/2009 (subtipo A(H1N1)pdm09) indujo una respuesta humoral heterotípica significativa ($p<0.05$) en ambos grupos etarios frente a la HA de la mayoría de las cepas gripales A(H1N1) analizadas (**Tabla 44**). Dicha seroconversión no fue significativa en el grupo de adultos frente a la cepa A/Weiss/1943 (con sólo una seroconversión), ni tampoco en el grupo de individuos mayores de 65 años frente a la cepa A/Brazil/11/1978, en el que sólo seroconvirtieron tres individuos. La mayor TSC heteróloga tras la vacunación se observó en el grupo de ≥ 65 años frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 (22,5%), seguida de la cepa A/FM/1/1947 (13,8%) en el mismo grupo etario. Por otro lado, la vacuna frente a la cepa A/California/07/2009 produjo seroconversión homóloga en el 41,3% en adultos ($n_1=33$) y del 45% en mayores de 65 años ($n_2=36$).

Se realizó un test Chi-cuadrado ($\alpha=0,05$) de variables independientes para comprobar si la seroconversión inducida por la vacunación fue diferente entre ambos grupos etarios frente a cada una de las cepas gripales A(H1N1) analizadas (**Tabla 45**). Se observó una seroconversión significativamente mayor en el grupo de individuos mayores de 65 años con respecto a los individuos adultos frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 ($p<0.05$). No se encontraron diferencias significativas en la seroconversión entre el resto de virus analizados.

Tabla 44. Número de seroconversiones (SC) y tasa de seroconversión (TSC) frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 tras la vacunación estacional de ambos grupos etarios. Valores de significación estadística del análisis de la TSC (p-valor).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo 15-64 años (n ₁ =80)			Grupo ≥ 65años (n ₂ =80)		
	SC	TSC (%)	p-valor	SC	TSC (%)	p-valor
A/PR/8/1934	7	8,8	0,016	9	11,3	0,004
A/Weiss/1943	1	1,3	1,000	6	7,5	0,031
A/FM/1/1947	7	8,8	0,016	11	13,8	0,001
A/Brazil/11/1978	7	8,8	0,016	3	3,8	0,250
A/Brisbane/59/2007	6	7,5	0,031	18	22,5	< 0,001
A/California/07/2009	33	41,3	< 0,001	36	45,0	< 0,001

Tabla 45. Comparación estadística de la tasa de seroconversión homóloga frente a la cepa A/California/07/2009 y heteróloga frente a las cepas A(H1N1) clásicas entre ambos grupos etarios (χ^2 de Pearson; p<0,05).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Tasa de Seroconversión (%)		p-valor
	15-64 años (n ₁ =80)	≥ 65años (n ₂ =80)	
A/PR/8/1934	8,8	11,3	0,580
A/Weiss/1943	1,3	7,5	0,239
A/FM/1/1947	8,8	13,8	0,303
A/Brazil/11/1978	8,8	3,8	0,198
A/Brisbane/59/2007	7,5	22,5	0,007
A/California/07/2009	41,3	45,0	0,819

Los valores de las MGTs en cada grupo etario frente a cada cepa de gripe A(H1N1) analizada así como los valores del intervalo de confianza (IC95%) para las MGTs están representados en la **Tabla 46**. La comparación de las MGTs post-vacunales en función del grupo etario se realizó mediante el uso del estadístico de contraste T-Student de muestras independientes. Este análisis mostró diferencias significativas entre ambos grupos etarios frente a todas las cepas gripales A(H1N1) analizadas. Las MGTs post-vacunales fueron significativamente más elevadas en el grupo de adultos frente a las cepas A/FM/1/1947, A/Brazil/11/978, A/Brisbane/59/2007 y A/California/07/2009, y significativamente más elevadas en el grupo de individuos mayores de 65 años frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943 (T-Student; $p < 0.05$).

Tabla 46. Media geométrica de los títulos (MGTs) post-vacunales de Acs anti-HA y diferencias entre las MGTs frente a las cepas gripales analizadas entre ambos grupos etarios (T-student; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	MGTs Anti-HA (IC95%) post-vacunales		p-valor
	15-64 años	≥ 65 años	
A/PR/8/1934	12,6 (10,4-15,2)	25,3 (20,2-32,6)	<0,001
A/Weiss/1943	9,4 (7,9-11,5)	16,1 (12,8-21,0)	0,001
A/FM/1/1947	39,6 (31,4-49,5)	26,8 (21,4-33,9)	0,020
A/Brazil/11/1978	55,1 (47,2-63,2)	29,3 (24,0-35,5)	0,000
A/Brisbane/59/2007	54,6 (45,5-66,2)	39,0 (32,5-47,2)	0,015
A/California/07/2009	298,5 (238,6-378,7)	162,8 (129,9-211,4)	0,001

Los valores de las MGTs pre y post-vacunales en ambos grupos etarios así como el incremento de estos títulos (RIC) tras la vacunación están expuestos en la **Tabla 47**. La vacunación antigripal con la cepa A/California/07/2009 (pdm) indujo un aumento de la MGTs de Acs anti-HA post-vacunales con respecto a los pre-vacunales en ambos grupos poblacionales frente a todas las cepas incluidas en el estudio. El mayor incremento en las MGTs de Acs anti-HA se observó frente a la cepa A/California/07/2009 (pdm) en ambos grupos etarios, siendo aproximadamente el doble que frente al resto de cepas A(H1N1) analizadas (RIC adultos=3,0; RIC ≥65 años=3,3). El perfil de las GMTs pre-vacunales y su incremento tras la vacunación estacional de gripe se muestra en la **Figura 47**.

Tabla 47. MGTs pre y post-vacunales y RIC de Acs anti-HA en ambos grupos etarios frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo etario	MGTs pre-vacunales (IC 95%)	MGTs post-vacunales (IC 95%)	RIC
A/PR/8/1934	15-64 años	9,1 (7,8-10,7)	12,6 (10,4-15,2)	1,4
	≥ 65 años	16,4 (13,2-20,9)	25,3 (20,2-32,6)	1,5
A/Weiss/1943	15-64 años	7,6 (6,6-8,9)	9,4 (7,9-11,5)	1,2
	≥ 65 años	10,6 (8,6-13,1)	16,1 (12,8-21,0)	1,5
A/FM/1/1947	15-64 años	27,6 (22,1-33,6)	39,6 (31,4-49,5)	1,4
	≥ 65 años	16,8 (13,2-21,0)	26,8 (21,4-33,9)	1,6
A/Brazil/11/1978	15-64 años	38,0 (32,2-45,8)	55,1 (47,2-63,2)	1,5
	≥ 65 años	25,5 (20,4-31,5)	29,3 (24,0-35,5)	1,1
A/Brisbane/59/2007	15-64 años	40,7 (34,4-49,4)	54,6 (45,5-66,2)	1,3
	≥ 65 años	23,6 (19,8-27,9)	39,0 (32,5-47,2)	1,7
A/California/07/2009	15-64 años	101,1 (73,0-136,8)	298,5 (238,6-378,7)	3,0
	≥ 65 años	49,2 (37,7-65,2)	162,8 (129,9-211,4)	3,3

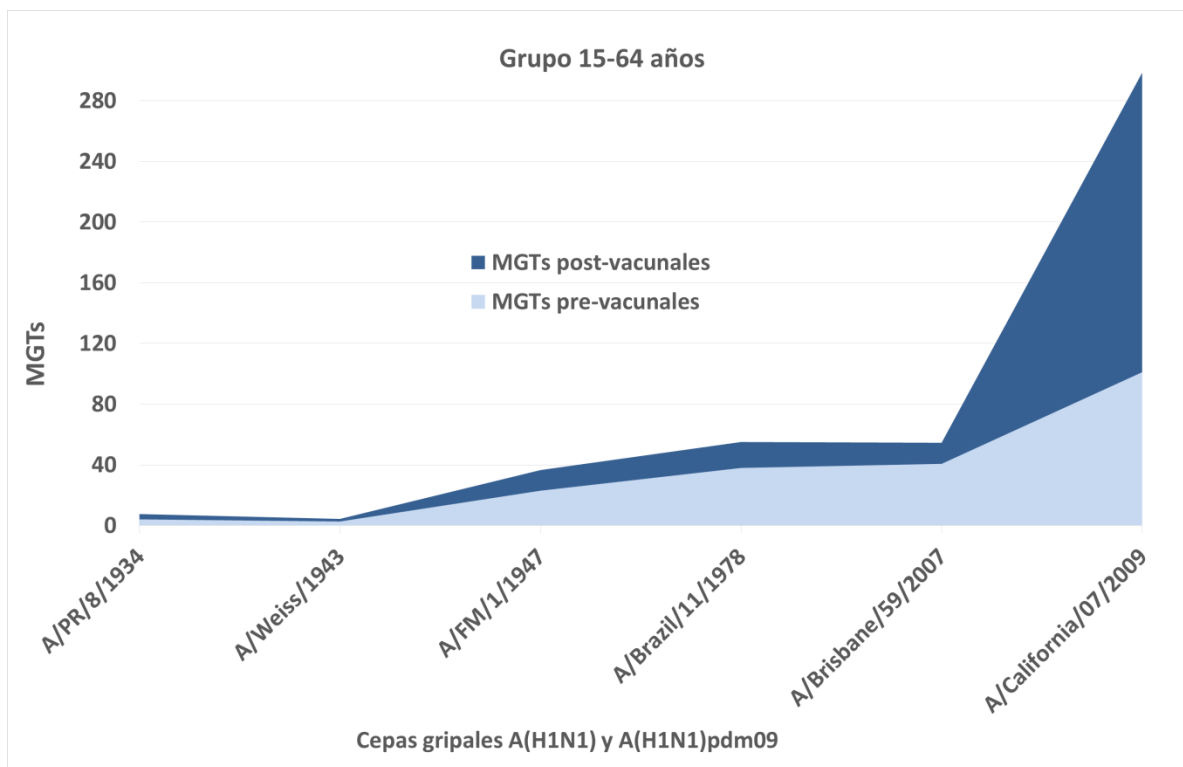
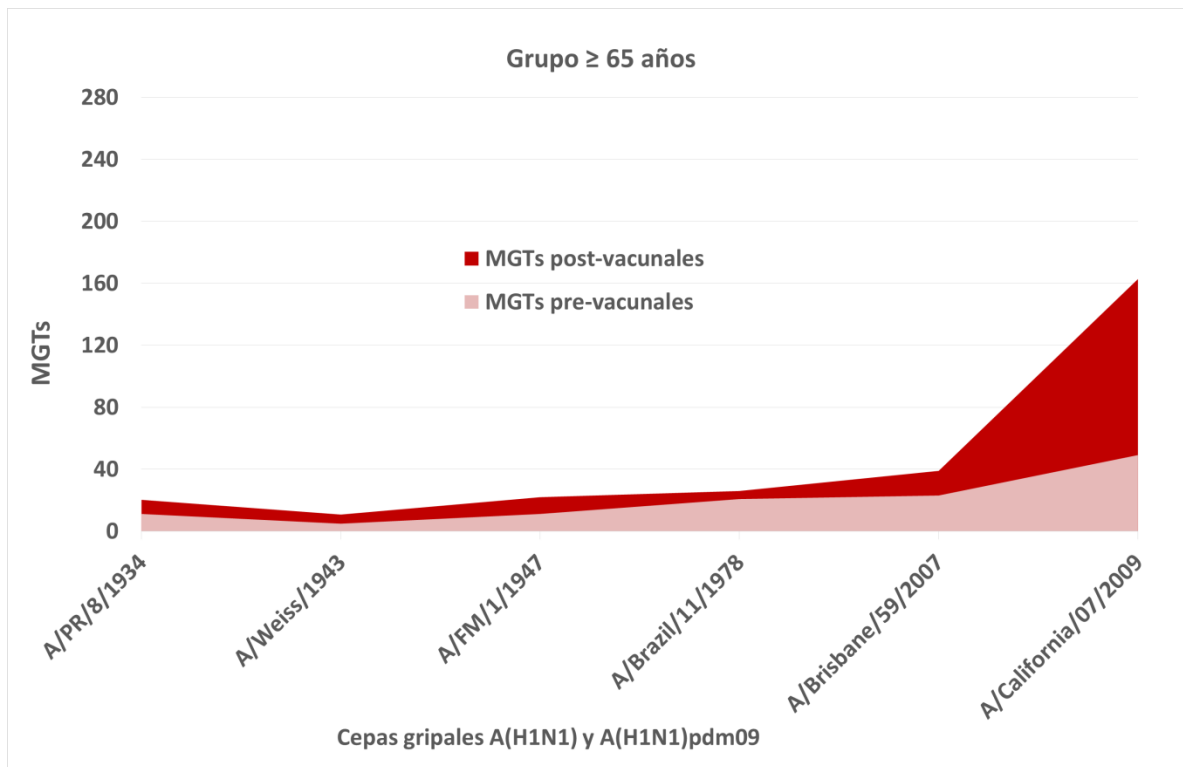


Figura 47. Perfil de las medias geométricas de los títulos (MGTs) de Acs anti-HA pre y post-vacunales en ambos grupos etarios frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

- **Análisis del efecto de la vacuna trivalente estacional sobre la generación de Acs anti-HA en función del grupo etario y de la temporada vacunal.**

En este epígrafe se analiza el efecto de la vacunación estacional antigripal sobre la generación de Acs anti-HA en función del grupo etario y de la temporada vacunal. Al igual que en el análisis de los Acs anti-HA, conviene recordar que los dos grupos mayores de 65 años fueron vacunados en las dos temporadas analizadas con la misma vacuna adyuvada. Sin embargo, los dos grupos de adultos comparados en este trabajo se vacunaron con dos vacunas distintas, ya que durante la temporada 2013-14 recibieron una vacuna inactivada fraccionada, y durante la temporada 2014-15 recibieron una vacuna inactivada de antígenos de superficie. Esta diferencia en el tipo de vacuna administrada se tuvo en cuenta para la comparación entre las dos temporadas estudiadas en las que estén implicados los dos grupos de adultos.

La TSP post-vacunal en función de las temporadas vacunales y del grupo etario poblacional queda reflejada en la **Tabla 48**. Frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico, la TSP post-vacunal observada fue de al menos un 90% en ambos grupos etarios y temporadas vacunales. Frente a las cepas gripales pertenecientes al subtipo A(H1N1), la TSP post-vacunal observada más baja fue de un 7,5% en el grupo de adultos frente a la cepa A/Weiss/1943 en ambas temporadas vacunales. Por otro lado, la TSP post-vacunal más alta (TSP: 87,5%) se observó en el grupo de adultos frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 en la temporada vacunal 2013-2014.

El número de individuos que mostraron seroconversión y la TSC de los títulos de Acs anti-HA tras la vacunación antigripal en función de las temporadas estacionales de gripe y en función del grupo etario poblacional quedan reflejados en la **Tabla 49**. Frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico, TSC observada fue de al menos un 25% en ambos grupos etarios y temporadas vacunales. Frente a las cepas gripales pertenecientes al subtipo A(H1N1), la TSC más alta fue un 22,5% en el grupo de mayores de 65 años frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 en ambas temporadas. Las TSC más bajas fueron las observadas en el grupo de adultos frente a

las cepas A/Weiss/1943 (TSC: 2,5%) y A/Brisbane/59/2007 (TSC: 2,5%) en la temporada 2014-2015. No se observó seroconversión de los títulos de Acs anti-HA en el grupo de adultos frente a la cepa A/Weiss/1943 (temporada 2013-2014) ni frente a la cepa A/PR/8/1934 (temporada 2014-2015). Tampoco se observó seroconversión de los títulos de Acs anti-HA en el grupo de mayor edad frente a la cepa A/Brazil/11/1978 en la temporada 2014-2015.

Tabla 48. Número de individuos con títulos de Acs anti-HA protectores ($\geq 1/40$) y tasa de seroprotección (%-TSP) tras la vacunación en función de la temporada vacunal y del grupo etario frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Temporada 2013-2014		Temporada 2014-2015	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	N (%-TSP)	N (%-TSP)	N (%-TSP)	N (%-TSP)
A/PR/8/1934	10 (25,0)	10 (25,0)	7 (17,5)	25 (62,5)
A/Weiss/1943	3 (7,5)	9 (22,5)	3 (7,5)	12 (30,0)
A/FM/1/1947	26 (65,0)	21 (52,5)	23 (57,5)	16 (40,0)
A/Brazil/11/1978	34 (85,0)	23 (57,5)	33 (82,5)	20 (50,0)
A/Brisbane/59/2007	35 (87,5)	27 (67,5)	27 (67,5)	26 (65,0)
A/California/07/2009	36 (90,0)	36 (90,0)	40 (100,0)	37 (92,5)

Tabla 49. Número de individuos que mostraron seroconversión y tasa de seroconversión (%-TSC) tras la vacunación en función de la temporada vacunal y del grupo etario frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Temporada 2013-2014		Temporada 2014-2015	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	N (%-TSC)	N (%-TSC)	N (%-TSC)	N (%-TSC)
A/PR/8/1934	7 (17,5)	2 (5,0)	0 (0,0)	7 (17,5)
A/Weiss/1943	0 (0,0)	2 (5,0)	1 (2,5)	4 (10,0)
A/FM/1/1947	3 (7,5)	7 (17,5)	4 (10,0)	4 (10,0)
A/Brazil/11/1978	4 (10,0)	3 (7,5)	3 (7,5)	0 (0,0)
A/Brisbane/59/2007	5 (12,5)	9 (22,5)	1 (2,5)	9 (22,5)
A/California/07/2009	10 (25,0)	19 (47,5)	23 (57,5)	17 (42,5)

Los valores de las MGTs pre y post-vacunales en ambos grupos etarios así como el incremento de estos títulos (RIC) tras la vacunación están expuestos en la **Tabla 50**. Las MGTs de Acs anti-NA observadas tras la vacunación en ambos grupos etarios aumentaron con respecto a las MGTs pre-vacunales observadas frente a todas las cepas del subtipo A(H1N1) y frente a la cepa del subtipo A(H1N1)pdm09. La RIC de las MGTs de Acs anti frente a la HA de la cepa pandémica (A(H1N1)pdm09), incluida en la vacuna, osciló desde 2,2 a 3,9 en el grupo de adultos en las temporadas 2013-2014 y 2014-15, respectivamente. Frente a las cepas del subtipo A(H1N1), cepas no incluidas en la vacuna, la RIC tras la vacunación osciló desde 1,1 a 1,8 en el grupo de adultos frente a la cepa A/PR/8/1934 en las temporadas 2014-2015 y 2013-14, respectivamente.

Tabla 50. Valores de MGTs y RIC de los sueros pre y post-vacunales en ambos grupos etarios frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 en función de la campaña vacunal.

Temporada 2013-2014				
Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo etario	MGTs pre-vacunales (IC 95%)	MGTs post-vacunales (IC 95%)	RIC
A/PR/8/1934	15- 64	4,8 (2,8-7,8)	8,6 (5,1-14,0)	1,8
	≥ 65	8,0 (4,7-13,4)	11,2 (6,6-18,8)	1,4
A/Weiss/1943	15- 64	2,7 (1,7-4,5)	3,3 (2,0-5,4)	1,2
	≥ 65	5,5 (3,1-9,5)	7,2 (4,0-12,4)	1,3
A/FM/1/1947	15- 64	27,6 (17,5-41,6)	38,7 (24,5-58,2)	1,4
	≥ 65	14,9 (9,6-22,3)	25,4 (16,3-38,0)	1,7
A/Brazil/11/1978	15- 64	38,4 (30,7-46,9)	57,5 (46,1-70,4)	1,5
	≥ 65	24,3 (17,0-34,0)	31,6 (22,1-44,2)	1,3
A/Brisbane/59/2007	15- 64	46,4 (36,2-62,1)	65,0 (50,7-87,0)	1,4
	≥ 65	28,2 (20,2-38,2)	45,2 (32,3-61,1)	1,6
A/California/07/2009	15- 64	80,7 (54,0-116,9)	177,5 (118,9-257,2)	2,2
	≥ 65	36,7 (24,9-52,4)	132,2 (92,2-193,9)	3,6

Temporada 2014-2015

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo etario	MGTs pre-vacunales (IC 95%)	MGTs post-vacunales (IC 95%)	RIC
A/PR/8/1934	15- 64	6,2 (4,0-9,5)	6,8 (4,4-10,4)	1,1
	≥ 65	21,5 (14,7-30,0)	36,5 (25,0-50,9)	1,7
A/Weiss/1943	15- 64	4,5 (2,9-7,1)	5,9 (3,8-9,2)	1,3
	≥ 65	9,5 (6,1-14,4)	16,2 (10,4-24,5)	1,7
A/FM/1/1947	15- 64	23,1 (16,3-33,2)	34,6 (24,4-49,7)	1,5
	≥ 65	12,7 (7,9-19,3)	19,0 (11,9-29,0)	1,5
A/Brazil/11/1978	15- 64	37,7 (30,6-46,5)	52,8 (42,9-65,1)	1,4
	≥ 65	19,4 (12,7-28,5)	21,3 (14,0-31,1)	1,1
A/Brisbane/59/2007	15- 64	35,3 (27,5-45,0)	45,9 (35,7-58,5)	1,3
	≥ 65	19,8 (15,9-24,4)	33,6 (27,1-41,6)	1,7
A/California/07/2009	15- 64	51,2 (41,6-61,6)	199,8 (162,3-240,4)	3,9
	≥ 65	66,1 (49,3-96,9)	200,4 (143,0-281,1)	3,0

Como se ha comentado con anterioridad, los dos grupos de adultos comparados en este trabajo se vacunaron con dos vacunas inactivadas distintas mientras que los dos grupos mayores de 65 años fueron vacunados en las dos temporadas analizadas con la misma vacuna adyuvada. Con esta razón, se realizó una comparación estadística de la TSC y RIC entre las dos temporadas estudiadas en las que estaban implicados ambos grupos etarios (**Tabla 51 y 52**).

La TSC de los títulos de Acs anti-HA frente a la cepa del subtipo A(H1N1)pdm09 fue significativamente mayor en el grupo de adultos de la temporada 2014-2015 (TSC: 57,5%) con respecto a la cohorte de la temporada 2013-2014 (TSC: 25,0%). Por otro lado, la TSC frente a la cepa A/PR/8/1934 fue significativamente mayor en la temporada 2013-2014 (TSC: 17,5%) con respecto a la cohorte poblacional de la temporada 2014-2015 (TSC: 0,0%) (**Tabla 51**). En mayores de 65 años, no se observaron diferencias significativas en la TSC frente a ninguna cepa del subtipo A(H1N1) ni frente al subtipo A(H1N1) pdm09 entre las dos temporadas vacunales.

Analizando la comparación de la RIC de las medias geométricas de los títulos de Acs anti-HA en el grupo de adultos en función de las temporadas vacunales incluidas en el estudio (**Tabla 52**), se observaron diferencias significativas frente a la cepa A/PR/8/1934 y frente a la cepa pandémica A/California/07/2009. La RIC fue significativamente mayor frente a la cepa A/PR/8/1934 en la temporada 2013-2014 (RIC: 1,8) con respecto a la RIC observada en la temporada 2014-2015 (RIC: 1,1), y significativamente mayor frente a la cepa pandémica en la temporada 2014-2015 (RIC: 3,9) con respecto a la temporada 2013-2014 (RIC: 2,2). En mayores de 65 años, no se observaron diferencias significativas en la RIC frente a ninguna cepa del subtipo A(H1N1) ni frente al subtipo A(H1N1) pdm09 entre las dos temporadas vacunales.

Tabla 51. Valores de significación estadística (p-valor) de la tasa de seroconversión (%-TSC) de los títulos de Acs anti-HA frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 en adultos y mayores de 65 años en función de la temporada vacunal considerada (χ^2 de Pearson; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Individuos 15-64 años			Individuos ≥ 65 años		
	Temp. 2013-14 n (%-TSC)	Temp. 2014-15 n (%-TSC)	p-valor	Temp. 2013-14 n (%-TSC)	Temp. 2014-15 n (%-TSC)	p-valor
A/PR/8/1934	7 (17,5)	0 (0,0)	0,006	2 (5,0)	7 (17,5)	0,070
A/Weiss/1943	0 (0,0)	1 (2,5)	0,152	2 (5,0)	4 (10,0)	0,157
A/FM/1/1947	3 (7,5)	4 (10,0)	0,692	7 (17,5)	4 (10,0)	0,114
A/Brazil/11/1978	4 (10,0)	3 (7,5)	0,692	3 (7,5)	0 (0,0)	0,081
A/Brisbane/59/2007	5 (12,5)	1 (2,5)	0,090	9 (22,5)	9 (22,5)	0,951
A/California/07/2009	10 (25,0)	23 (57,5)	0,002	19 (47,5)	17 (42,5)	0,562

Tabla 52. Valores de significación estadística (p-valor) de la razón de incremento (RIC) de las MGTs de Acs anti-HA frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 en adultos y mayores de 65 años en función de la temporada vacunal considerada (T-Student; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Individuos 15-64 años			Individuos ≥ 65 años		
	Temp. 2013-14 RIC	Temp. 2014-15 RIC	p-valor	Temp. 2013-14 ($n_1=40$)	Temp. 2014-15 ($n_2=40$)	p-valor
A/PR/8/1934	1,8	1,1	<0,001	1,4	1,7	0,820
A/Weiss/1943	1,2	1,3	0,933	1,3	1,7	0,078
A/FM/1/1947	1,4	1,5	0,455	1,7	1,5	0,720
A/Brazil/11/1978	1,5	1,4	0,077	1,3	1,1	0,067
A/Brisbane/59/2007	1,4	1,3	0,359	1,6	1,7	0,300
A/California/07/2009	2,2	3,9	0,006	3,6	3,0	0,328

- **Análisis de la eficacia vacunal según los criterios EMA.**

La eficacia serológica de las vacunas antigripales administradas se analizó utilizando los parámetros TSP, TSC y RIC, siguiendo los criterios EMA de análisis de la eficacia vacunal para ambos grupos de población entre las distintas temporadas vacunales (**Tabla 53**).

En el caso de las cepas gripales analizadas pertenecientes al subtipo A(H1N1) estacional, el análisis de la eficacia vacunal utilizando los criterios EMA mostró que se alcanzaron los valores requeridos de TSP post-vacunal:

- frente a la A/Brazil/11/1978 en el grupo de adultos (15-64 años) en ambas temporadas vacunales incluidas en el estudio.
- frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 en el grupo de adultos (15-64 años) en la temporada 2013-2014.
- frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 en los mayores de 65 años en ambas temporadas vacunales incluidas en el estudio.
- frente a la cepa A/PR/8/1934 en los mayores de 65 años en la temporada 2014-2015.

En términos de TSC y de RIC, no se alcanzaron los valores requeridos según los criterios EMA frente a ninguna de las cepas del subtipo A(H1N1) estacional en ninguno de los grupos etarios ni temporadas vacunales del estudio.

Frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico, cepa incluida en la vacunas trivalentes estacionales administradas en cada una de las temporadas del estudio, se alcanzaron los tres criterios EMA requeridos en el análisis de la eficacia vacunal (TSP, TSC y RIC) en el grupo de mayores de 65 años y en ambas temporadas vacunales. Con relación al grupo de adultos, únicamente se alcanzaron los tres criterios en la temporada 2014-2015. En el grupo de adultos de la temporada 2013-2014 sólo la TSP frente al subtipo pandémico alcanzó el cut off establecido por la EMA.

Tabla 53. Valores de TSP, TSC y RIC siguiendo los criterios EMA de eficacia vacunal frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09, distribuidos en los grupos etarios y temporadas estacionales vacunales considerados en el estudio.

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

Temporada 2013-2014

	Criterio EMA	A/PR/8/1934	A/Weiss/1943	A/FM/1/1947	A/Brazil/11/1978	A/Brisbane/59/2007	A/California/07/2009
15-64 años	TSP	25,0	7,5	65,0	85,0	87,5	90,0
	TSC	17,5	0,0	7,5	10,0	12,5	25,0
	RIC	1,8	1,2	1,4	1,5	1,4	2,2
≥ 65 años	TSP	25,0	22,5	52,5	57,5	67,5	90,0
	TSC	5,0	5,0	17,5	7,5	22,5	47,5
	RIC	1,4	1,3	1,7	1,3	1,6	3,6

Temporada 2014-2015

	Criterio EMA	A/PR/8/1934	A/Weiss/1943	A/FM/1/1947	A/Brazil/11/1978	A/Brisbane/59/2007	A/California/07/2009
15-64 años	TSP	17,5	7,5	57,5	82,5	67,5	100,0
	TSC	0,0	2,5	10,0	7,5	2,5	57,5
	RIC	1,1	1,3	1,5	1,4	1,3	3,9
≥ 65 años	TSP	62,5	30,0	40,0	50,0	65,0	92,5
	TSC	17,5	10,0	10,0	0,0	22,5	42,5
	RIC	1,7	1,7	1,5	1,1	1,7	3,0

Análisis filogenético del gen de la Hemaglutinina (H1) de las cepas gripales

Con el objetivo de conocer la distancia genética y la relación filogenética de las cepas de gripe A(H1N1) utilizadas en los estudios serológicos, se realizó un análisis de las secuencias del gen de la HA de las cepas gripales A(H1N1) incluidas en el estudio. En primer lugar, se incluyeron además cepas de gripe pertenecientes al resto de subtipos de HA descritos hasta el momento para así realizar un árbol filogenético completo (**Figura 48**). En segundo lugar, se realizó un árbol filogenético incluyendo en este caso sólo las cepas de gripe A(H1N1) que fueron utilizadas en los estudios serológicos (**Figura 49**).

Los porcentajes de similitud genética (% de similitud/100) del gen de la HA entre los diferentes virus de la gripe A(H1N1) y A(H1N1) pdm09 analizados se describen en la **Tabla 54**. La homología genética observada en el gen de la HA entre las diferentes cepas analizadas pertenecientes al subtipo A(H1N1) fue superior al 84,8%. La homología genética más alta observada fue entre las cepas A/FM/1/1947 y A/Brazil/11/1978 (95,5%) y la más baja fue la homología genética observada entre las cepas A/PR/8/1934 y A/Brisbane/59/2007 (84,8%). La cepa pandémica A/California/07/2009 (subtipo A(H1N1) pdm09) mostró una homología genética con las cepas pertenecientes al subtipo (H1N1) entre el 67,3% (A/Brisbane/59/2007) y el 72,7% (A/PR/8/1934).

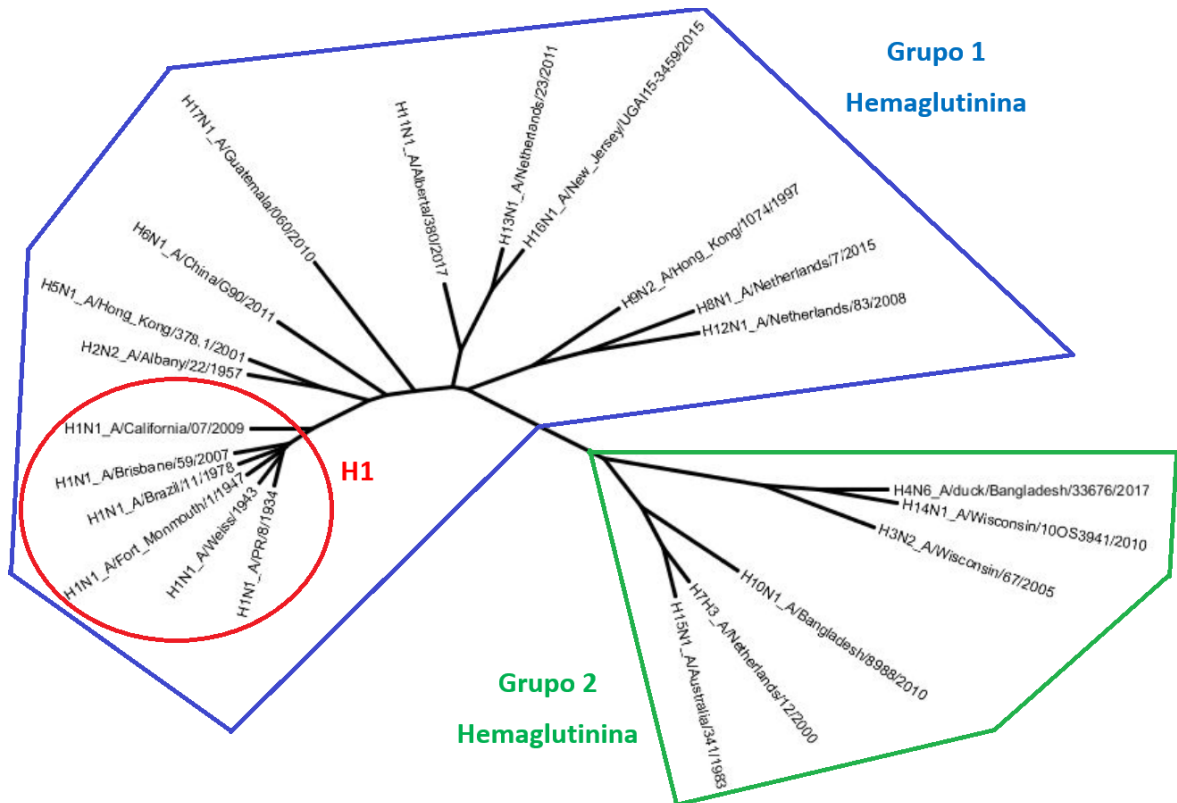


Figura 48. Árbol filogenético del gen de la HA de las cepas gripales A(H1N1) incluidas en el estudio y de cepas pertenecientes al resto de subtipos de HA descritos.

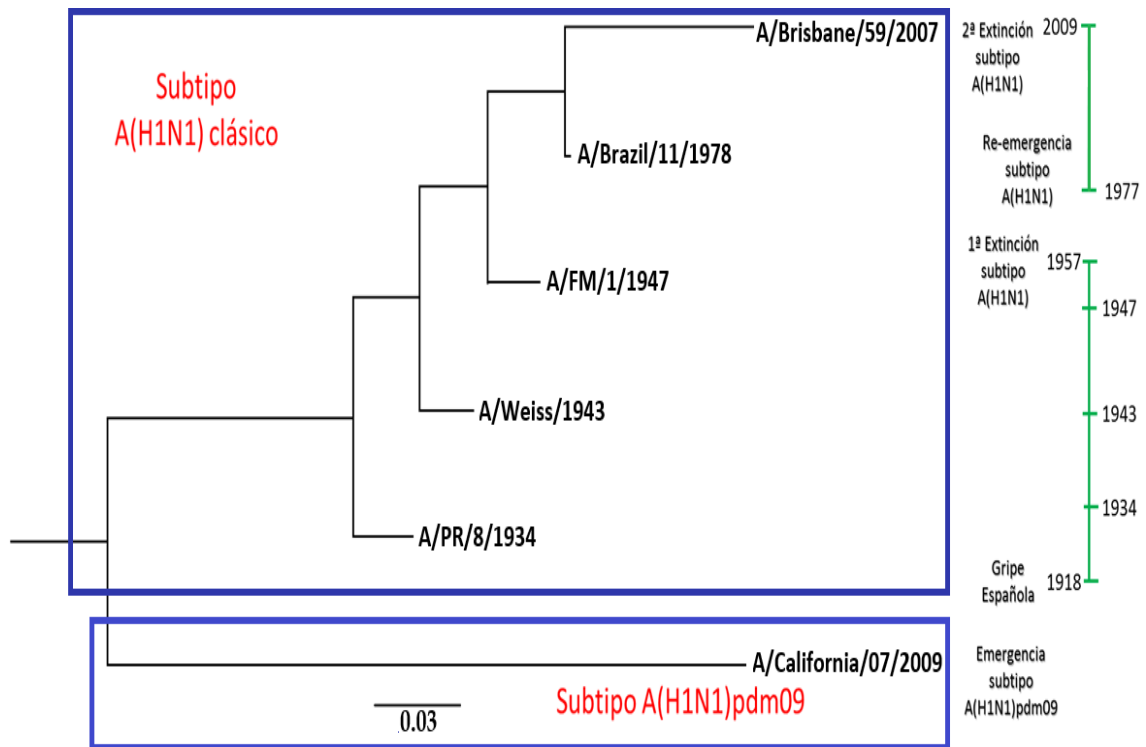


Figura 49. Árbol filogenético del gen de la HA de las cepas gripales de los subtipos A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 incluidas en el estudio. Escala temporal de los eventos más importantes del subtipo A(H1N1) clásico y del subtipo A(H1N1)pdm09 durante la historia natural de este virus en los siglos XX y XXI.

Tabla 54. Similitud genética expresada como % similitud/100 del gen de la hemaglutinina (H1) entre las diferentes cepas gripales del subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 incluidas en el estudio.

	A/California/07/2009	A/Brisbane/59/2007	A/Brazil/11/1978	A/FM/1/1947	A/Weiss/1943	A/PR/8/1934
A/California/07/2009	1,000					
A/Brisbane/59/2007	0,673	1,000				
A/Brazil/11/1978	0,708	0,915	1,000			
A/FM/1/1947	0,724	0,880	0,955	1,000		
A/Weiss/1943	0,724	0,866	0,935	0,943	1,000	
A/PR/8/1934	0,727	0,848	0,912	0,921	0,941	1,000

Análisis comparativo de los Acs pre-vacunales anti-NA y anti-HA

En este primer apartado se analizan de forma comparativa los títulos pre-existentes de Acs anti-NA como de Acs anti-HA en la población global del estudio, con el objeto de conocer si existe algún tipo de correlación en el título de anticuerpos frente a ambos antígenos. En segundo lugar, se realiza un análisis comparativo de los anticuerpos en relación con los dos grupos etarios poblacionales incluidos en el estudio.

- **Análisis comparativo de los Acs pre-vacunales anti-NA y anti-HA en la población.**

Tomando el valor $\geq 1/40$ como título seroprotector frente a ambos antígenos (HA y NA), la TSP pre-vacunal fue muy superior frente a la NA que frente a la HA en la población global estudiada (**Figura 50**). La TSP pre-vacunal frente a la HA osciló desde un 12,5% frente a la cepa A/Weiss/1943 hasta un 70,6% de los sueros frente a la cepa A/California/07/2009 (pdm09). Por su parte, la TSP frente a la NA fue de al menos un 88,8% frente a todas las cepas gripales analizadas, siendo en todos los casos superior al constatado frente a la HA. La TSP pre-vacunal frente a la NA fue 1,23 veces (para la cepa A/California/07/2009) y 7,9 veces (para la cepa A/Weiss/1943) más elevada que frente a la HA. Estas diferencias entre ambas TSP pre-vacunales fueron más elevadas entre los virus circulantes entre 1930 y 1943 y descendió paulatinamente hasta ser muy cercana al 1:1 en la cepa A/California/07/2009 del subtipo pandémico.

Para un mayor análisis de estos datos, se realizó una clasificación de los títulos de Acs pre-vacunales de ambos antígenos en títulos no protectores (aquellos por debajo de un título 1/40), títulos protectores medios ($\geq 1/40$ a 1/160) y títulos protectores altos ($> 1/160$) (**Tabla 55**). El porcentaje de individuos con títulos protectores pre-vacunales altos fue mayor frente a la NA que frente a la HA en todas las cepas analizadas, a excepción de la cepa A/California/07/2009 (pdm09), frente a la que se observó un porcentaje similar de individuos con títulos pre-vacunales elevados (24,4%

frente a la HA y 28,8% frente a la NA). En la categoría de títulos protectores medios ($\geq 1/40$ a $1/160$) fue donde se observó una mayor similitud en el porcentaje de individuos que presentaban este tipo de títulos entre los Acs anti-HA y Acs anti-NA. En la **figura 51** se puede apreciar cómo los títulos de Acs anti-HA observados fueron cada vez más elevados según estos eran referidos frente a cepas gripales más actuales, mientras que los Acs frente a la neuraminidasa se mantuvieron estables.

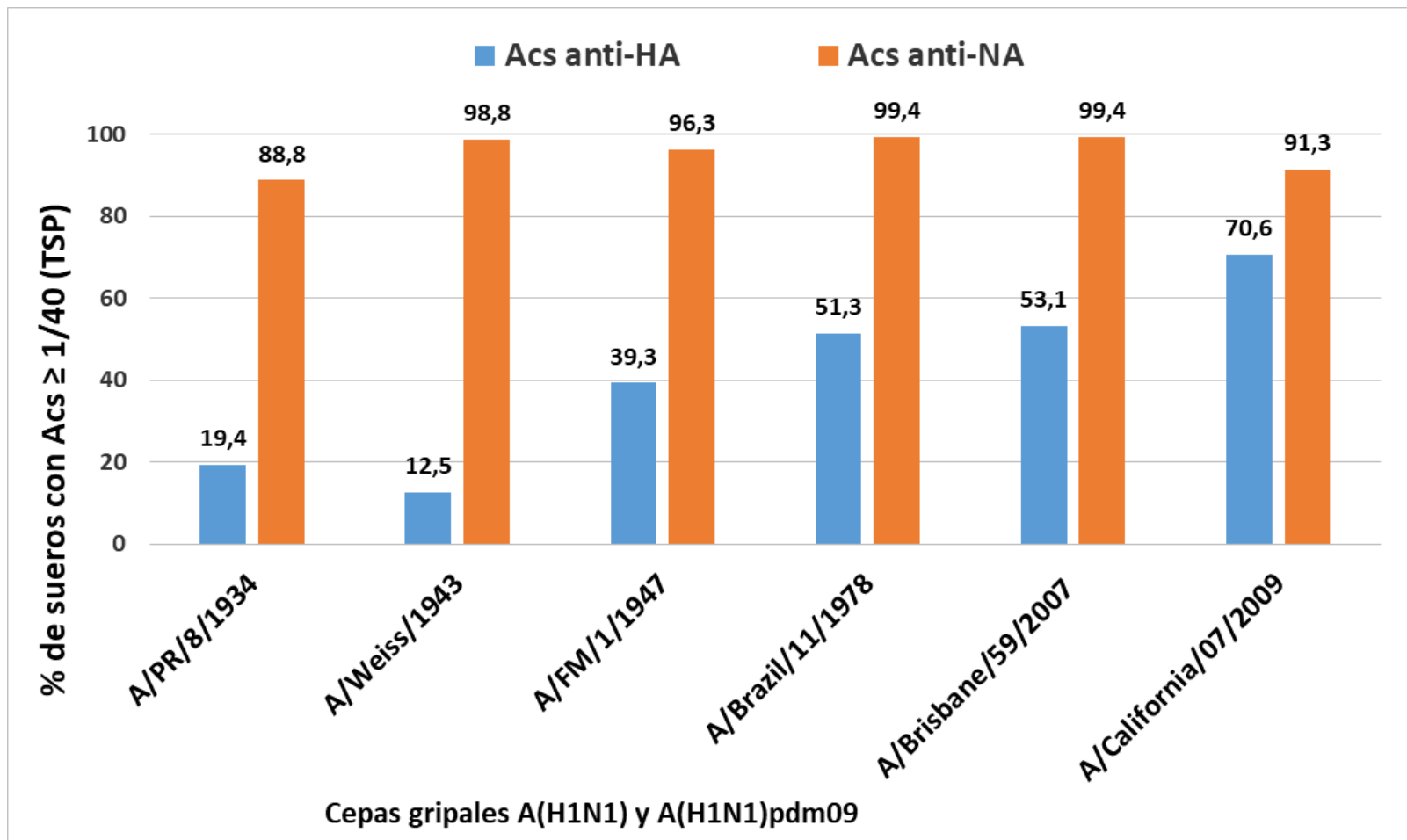


Figura 50. Tasa de seroprotección pre-vacunal de la población global frente a hemaglutinina y neuraminidasa de cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. TSP, Tasa de seroprotección.

Tabla 55. Número y porcentaje de sueros pre-vacunales en la población global con títulos de Acs anti-HA y anti-NA no protectores (<1/40), títulos protectores medios ($\geq 1/40$ a $1/160$) y títulos protectores altos (>1/160) frente a las cepas gripales analizadas.

Títulos Acs anti-HA	A/PR/8/1934		A/Weiss/1943		A/FM/1/1947		A/Brazil/11/1978		A/Brisbane/59/2007		A/California/07/2009	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<40	129	80,6	140	87,5	97	60,6	78	48,8	75	46,9	47	29,4
40-160	30	18,8	20	12,5	60	37,5	82	51,3	84	52,5	74	46,3
>160	1	0,6	0	0,0	3	1,9	0	0,0	1	0,6	39	24,4

Títulos Acs anti-NA	A/PR/8/1934		A/Weiss/1943		A/FM/1/1947		A/Brazil/11/1978		A/Brisbane/59/2007		A/California/07/2009	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<40	18	11,3	2	1,3	6	3,8	1	0,6	1	0,6	14	8,8
40-160	89	55,6	45	28,1	69	43,1	51	31,9	75	46,9	100	62,5
>160	53	33,1	113	70,6	85	53,1	108	67,5	84	52,5	46	28,8

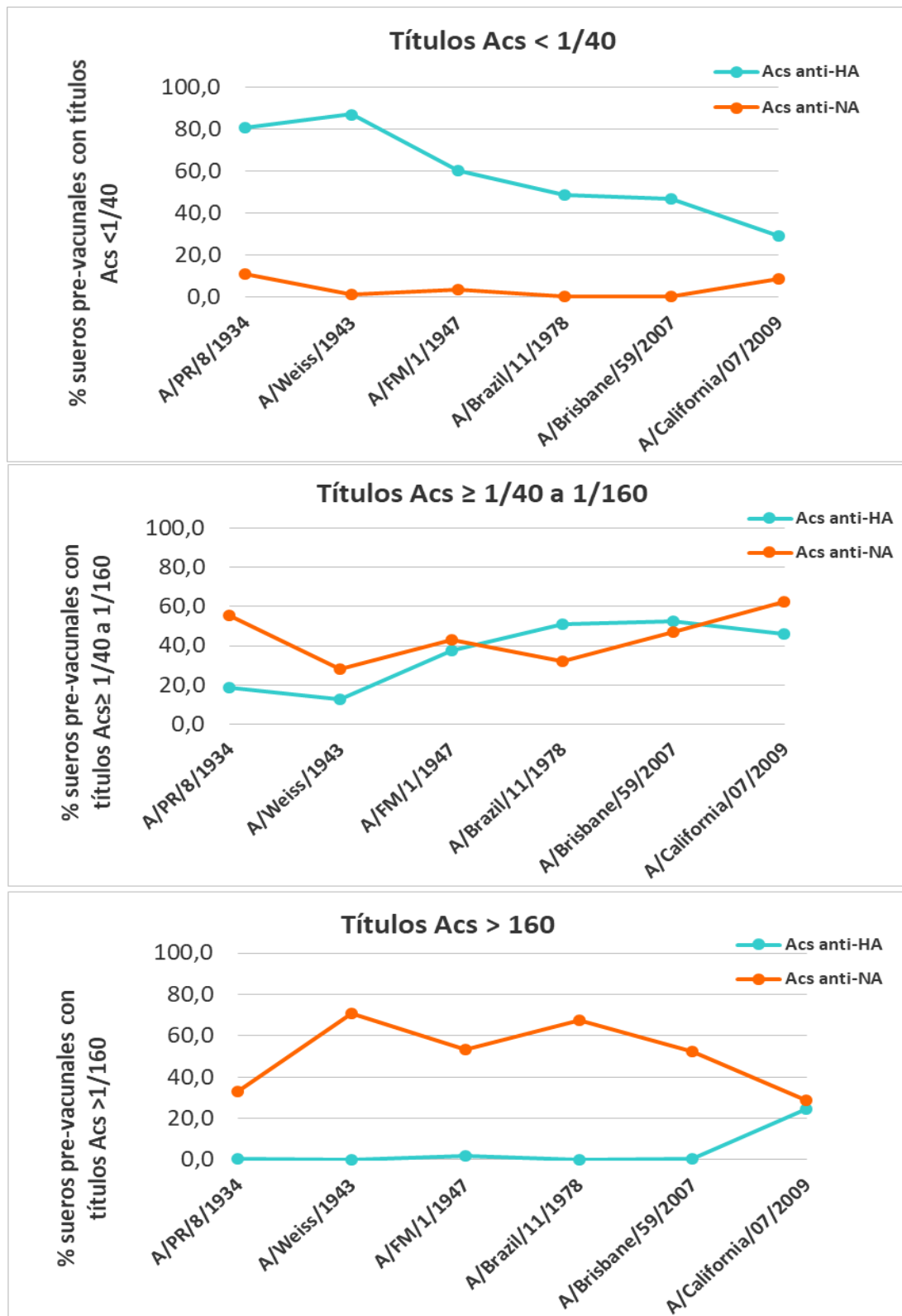


Figura 51. Distribución porcentual de sueros pre-vacunales con títulos de Acs anti-HA y anti-NA no protectores (<1/40), títulos protectores medios (≥1/40 a 1/160) y títulos protectores altos (>1/160) frente a las cepas gripales analizadas.

La correlación entre los títulos de Acs pre-vacunales anti-NA y Acs anti-HA se determinó evaluando la correlación entre las medias geométricas de los títulos mediante el test paramétrico de Pearson (**Tabla 56**). Únicamente se observó una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los títulos de Acs anti-HA y anti-NA en la población global frente a la cepa A/PR/8/1934. No obstante, la correlación entre ambos tipos de Acs antigripales fue positiva pero con un nivel de correlación bajo (0,295). No se observó significación estadística ($p < 0,05$) para el resto de cepas gripales del estudio y, por tanto, no se pudo señalar que, en general, hubiera correlación entre los títulos de Acs pre-vacunales anti-HA y anti-NA observados.

Tabla 56. MGTs de Acs anti-HA y anti-NA en la población global frente a las cepas gripales analizadas. Correlación entre las MGTS (Pearson; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	MGTs pre-vacunales (IC 95%)		Correlación	
	Acs anti-NA	Acs anti-HA	Pearson	(p-valor)
A/PR/8/1934	134,5 (112,1-159,3)	12,2 (10,5,14,0)	0,295	<0,001
A/Weiss/1943	519,6 (418,4-636,8)	9,0 (7,9-10,3)	0,152	0,055
A/FM/1/1947	246,7 (209,2-293,3)	21,5 (18,3-25,4)	0,014	0,859
A/Brazil/11/1978	347,3 (294,6-404,2)	31,1 (26,6-36,0)	0,092	0,248
A/Brisbane/59/2007	236,2 (205,6-273,7)	31,0 (27,3-35,6)	-0,043	0,589
A/California/07/2009	117,1 (98,9-137,4)	70,5 (56,8-88,0)	0,067	0,398

- **Análisis comparativo de los Acs pre-vacunales anti-NA y anti-HA en función del grupo etario.**

En este apartado, se realizó en primer lugar, un estudio comparativo descriptivo de la TSP pre-vacunal observada frente ambos antígenos gripales (HA y NA) en ambos grupos etarios poblacionales incluidos en el estudio. En segundo lugar, se realizaron dos tipos de análisis estadísticos para comprobar si existía una relación entre los dos tipos de respuesta de Acs anti-gripales. El primer análisis estadístico consistió en conocer si la presencia de un título hemaglutinante protector (Acs anti-HA $\geq 1/40$) pudiera estar relacionada con un mayor título de Acs anti-NA en la población analizada. El segundo análisis consistió en realizar una aproximación estadística del título de Acs frente a la NA que debería considerarse como correlato de seroprotección tomando como base el ya conocido para la HA.

Como ha sido comentado en el párrafo anterior, se realizó en primer lugar un estudio comparativo descriptivo de la TSP pre-vacunal. La TSP pre-vacunal frente a la NA fue muy superior que la TSP pre-vacunal frente a la HA en ambos grupos etarios (**Tabla 57**). La TSP pre-vacunal frente a la HA osciló desde un 6,3% frente a la cepa A/Weiss/1943 en los individuos adultos hasta un 75,0% en el grupo etario de mayores de 65 años frente a la cepa A/California/07/2009 (pdm09), mientras que la TSP pre-vacunal frente a la NA fue superior al 81,3% en ambos grupos etarios frente a todas las cepas gripales analizadas. El análisis de los datos muestra que todos los individuos mayores de 65 años mostraron títulos de Acs $\geq 1/40$ frente a la NA de las cepas A/Weiss/1943, A/FM/1/1947, A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007.

Tabla 57. Tasa de seroprotección (TSP) en individuos adultos y mayores de 65 años frente a la HA y la NA de las cepas de gripe A(H1N1) clásicas y A(H1N1)pdm09.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	TSP HA (Acs anti-HA $\geq 1/40$)		TSP NA (Acs anti-NA $\geq 1/40$)	
	15-64 años	≥ 65 años	15-64 años	≥ 65 años
	A/PR/8/1934	12,5	26,3	81,3
A/Weiss/1943	6,3	18,8	97,5	100,0
A/FM/1/1947	48,8	30,0	92,5	100,0
A/Brazil/11/1978	57,5	45,0	98,8	100,0
A/Brisbane/59/2007	66,3	40,0	98,8	100,0
A/California/07/2009	75,0	66,3	86,3	96,3

Como se ha enunciado anteriormente, se estudió si la presencia de títulos de Acs hemaglutinantes a título protector ($\geq 1/40$) en la respuesta inmunológica de un individuo condicionaba a que ese mismo individuo presentara un título superior de Acs anti-NA frente a aquellos individuos con títulos hemaglutinantes no protectores. Con este motivo, se realizó una comparación de la media del logaritmo de los títulos de Acs anti-NA entre aquellos individuos que presentaron títulos hemaglutinantes protectores o no. De esta forma, los dos grupos etarios considerados (adultos y mayores de 65 años) se estratificaron a su vez en dos subgrupos en función de los Acs hemaglutinantes pre-vacunales observados. En el subgrupo 1 se incluyeron aquellos individuos con títulos no protectores de HA ($< 1/40$), mientras que en el subgrupo 2 se agruparon los individuos con títulos hemaglutinantes protectores ($\geq 1/40$). Este análisis se realizó con la media logarítmica de los títulos de Acs anti-NA (Media log Acs anti-NA) con objeto de seguir una distribución normal. La distribución de las medias de los logaritmos de los Acs anti-NA en función del grupo considerado se muestra en la **Tabla 58 y Figuras 52 y 53**.

Se observaron únicamente diferencias significativas (test T-Student; $p < 0,05$) en la media logarítmica de los títulos de Acs anti-NA frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/FM/1/1947 entre los individuos seroprotegidos (subgrupo 2) y no seroprotegidos (subgrupo 1) frente a la HA de estas cepas, dentro del grupo de mayores de 65 años.

En otros términos, dentro del grupo de mayor edad, aquellos que presentaban títulos hemaglutinantes a título protector (subgrupo 2) mostraron además títulos de Acs anti-NA significativamente mayores con respecto a quienes no presentaban títulos protectores de Acs anti-HA (subgrupo 1). Frente al resto de cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 no se observaron diferencias significativas en la media del logaritmo de los títulos de Acs anti-NA entre ambos subgrupos. No obstante, cabe apreciar que la media del logaritmo de los títulos de Acs anti-NA fue ligeramente superior en el grupo de individuos que presentaban en sus sueros además Acs hemaglutinantes a título protector (subgrupo 2).

Tabla 58. Media del logaritmo de los títulos pre-vacunales de Acs anti-NA en función de los títulos de Acs anti-HA, en ambos grupos etarios. Análisis de las diferencias mediante prueba T-Student (α : 0,05)

Grupo 15-64 años

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Media log Acs anti-NA		T-Student	p-valor
	Acs anti-HA <1/40 (Subgrupo 1)	Acs anti-HA \geq 1/40 (Subgrupo 2)		
A/PR/8/1934	1,998	2,234	1,303	0,196
A/Weiss/1943	2,577	2,565	0,048	0,962
A/FM/1/1947	2,329	2,142	1,729	0,088
A/Brazil/11/1978	2,664	2,642	0,236	0,814
A/Brisbane/59/2007	2,427	2,306	1,079	0,287
A/California/07/2009	1,993	2,003	0,081	0,936

Grupo \geq 65 años

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Media log Acs anti-NA		T-Student	p-valor
	Acs anti-HA <1/40 (Subgrupo 1)	Acs anti-HA \geq 1/40 (Subgrupo 2)		
A/PR/8/1934	2,148	2,462	2,966	0,004
A/Weiss/1943	2,815	3,027	1,257	0,212
A/FM/1/1947	2,451	2,768	3,878	<0,001
A/Brazil/11/1978	2,416	2,446	0,291	0,772
A/Brisbane/59/2007	2,373	2,439	0,850	0,398
A/California/07/2009	2,093	2,159	0,623	0,535

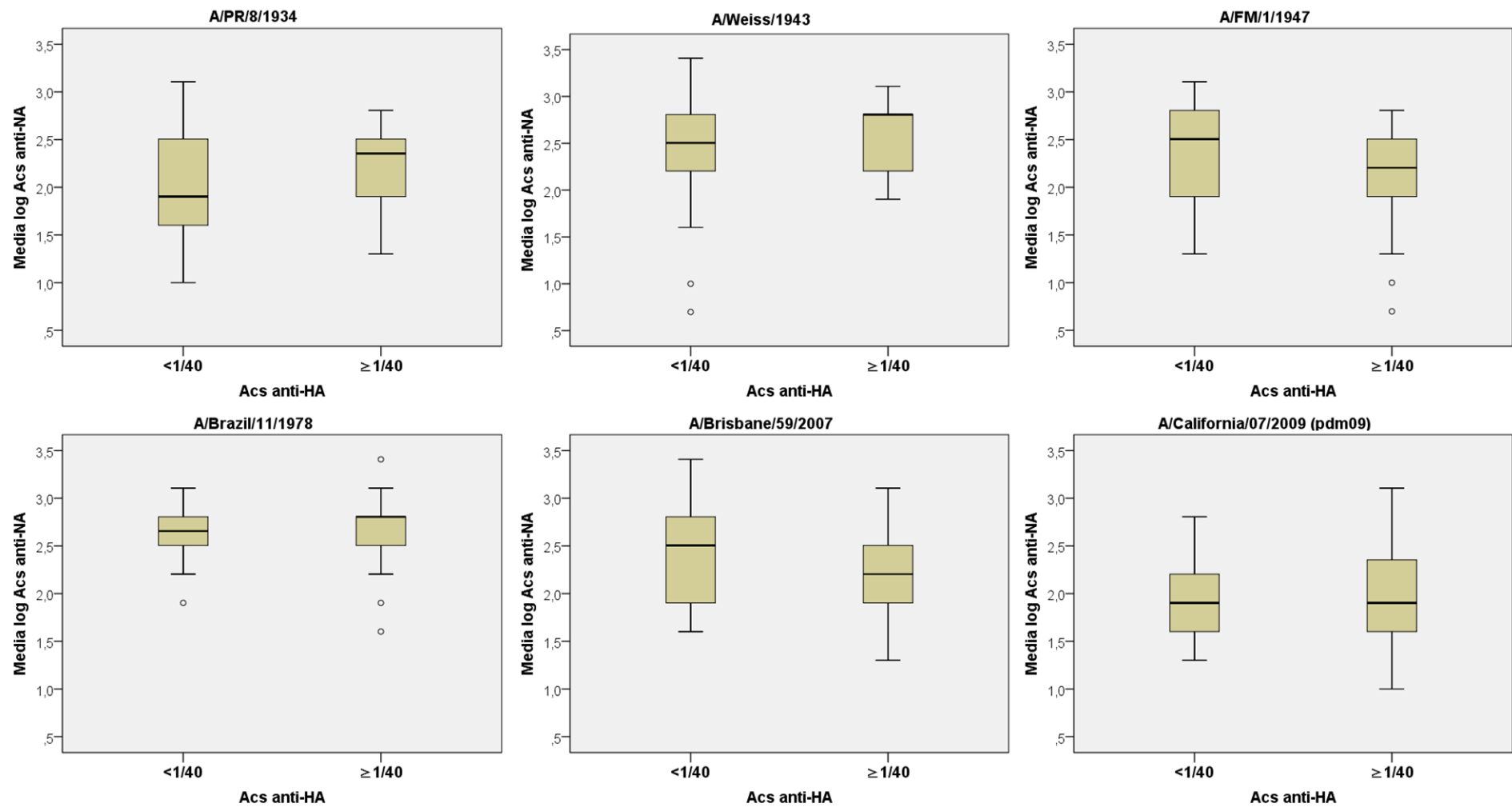


Figura 52. Análisis box-plot de la media del logaritmo y el intervalo de confianza al 95% de los títulos pre-vacunales de Acs anti-NA en función de los títulos de Acs anti-HA en el grupo de adultos.

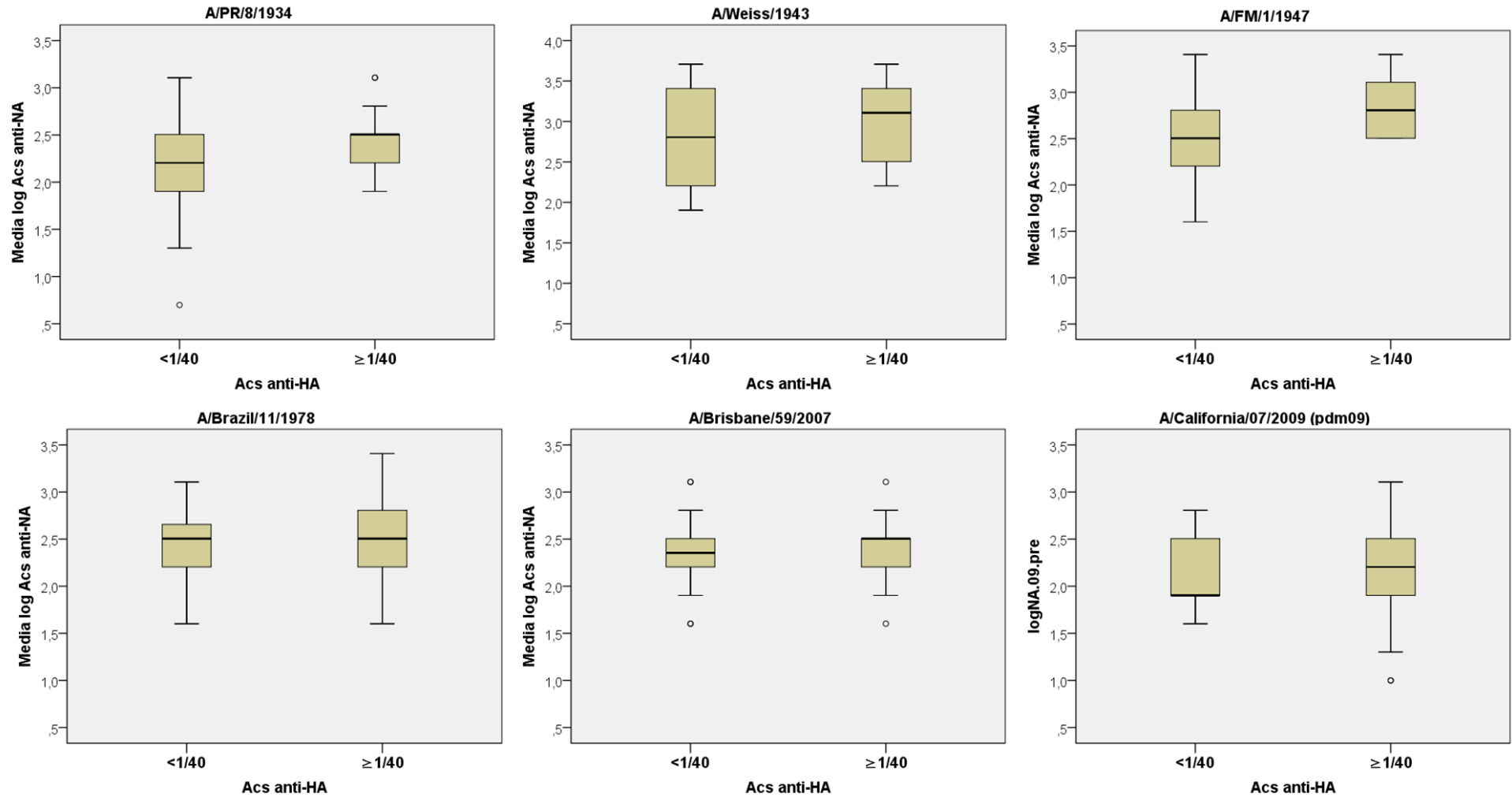


Figura 53. Análisis box-plot de la media del logaritmo y el intervalo de confianza al 95% de los títulos pre-vacunales de Acs anti-NA en función de los títulos de Acs anti-HA en el grupo de mayores de 65 años.

Como se ha comentado con anterioridad, existe consenso de que un título de Acs anti-HA igual o superior a 1/40 se considera el correlato de protección frente a este antígeno, denominándose como título protector de anticuerpos. Sin embargo, para los títulos de Acs anti-NA no existe actualmente un correlato de protección propio. En este trabajo se realizó un análisis estadístico de curvas ROC para hacer una aproximación sobre el título que debería considerarse como correlato de seroprotección frente a la NA tomando como base el ya conocido para la HA.

Mediante la construcción de estas curvas ROC se pretende conocer si existe una relación estadística entre un título 1/40 frente a la HA, considerado como seroprotector frente a este antígeno, y un título concreto frente a la NA. Esa capacidad discriminativa para el estudio de Acs a título protector ($Acs \geq 1/40$) se estudia mediante las curvas ROC, hallándose valores de sensibilidad y especificidad para cada uno de los diferentes títulos de Acs anti-NA observados en los sueros pre-vacunales frente a cada una de las cepas gripales del estudio y en función del grupo etario, con un nivel de significación estadística ($p < 0,05$).

El análisis de las curvas ROC determina unos valores de sensibilidad y especificidad concretos para cada cepa de gripe analizada, relacionando los títulos de Acs protectores y no protectores de la HA y la NA. Para determinar qué título de Acs anti-NA correlacionaba mejor con un título de Acs frente a la HA de 1/40, se seleccionaron aquellos títulos que mostraban una sensibilidad y especificidad superiores a un 50% (**Tabla 59**). Tomando como punto de partida estos valores de sensibilidad y especificidad, se valoraron sólo aquellas curvas ROC cuyo valor del área bajo la curva (ABC) fuera superior a 0,6 y además existiera significación estadística ($p < 0,05$).

En las **figuras 54 y 55** se representan las curvas ROC de los títulos de Acs anti-NA frente a las cepas gripales A(H1N1) clásicas y cepas del subtipo A(H1N1)pdm09 en ambos grupos etarios. Únicamente se observó que las curvas ROC frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/FM/1/1947 en mayores de 65 años mostraron un ABC de 0,7 (superior al 0,6 fijado anteriormente) y una significación estadística $p < 0,05$. Los títulos de Acs anti-NA que cumplieron con los parámetros establecidos de sensibilidad y especificidad superiores al 50% fueron de 1/240 para la cepa A/PR/8/1934 y de 1/480 para la cepa A/FM/1/1947 en los individuos mayores de 65 años. Este análisis

mostraría que, para el caso concreto de estas dos cepas y únicamente en mayores de 65 años, un título de Acs anti-NA de 1/240 y 1/480 podrían considerarse como correlatos de seroprotección.

Tabla 59. Valores del área bajo la curva de las curvas ROC para la selección del título de Acs anti-NA como título protector en función del grupo etario frente a cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. Valores de área bajo la curva (ABC), del título de Acs anti-NA propuesto y de significación estadística.

Cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09	Grupo etario	Curva ROC (ABC)	p-valor	Título Acs anti-NA propuesto
A/PR/8/1934	15- 64 años	0,626	0,200	120
	≥ 65 años	0,711	0,004	240
A/Weiss/1943	15- 64 años	0,504	0,976	480
	≥ 65 años	0,614	0,171	480
A/FM/1/1947	15- 64 años	0,398	0,118	480
	≥ 65 años	0,723	0,002	480
A/Brazil/11/1978	15- 64 años	0,519	0,774	480
	≥ 65 años	0,509	0,377	480
A/Brisbane/59/2007	15- 64 años	0,435	0,344	480
	≥ 65 años	0,561	0,356	240
A/California/07/2009	15- 64 años	0,506	0,938	120
	≥ 65 años	0,552	0,445	120

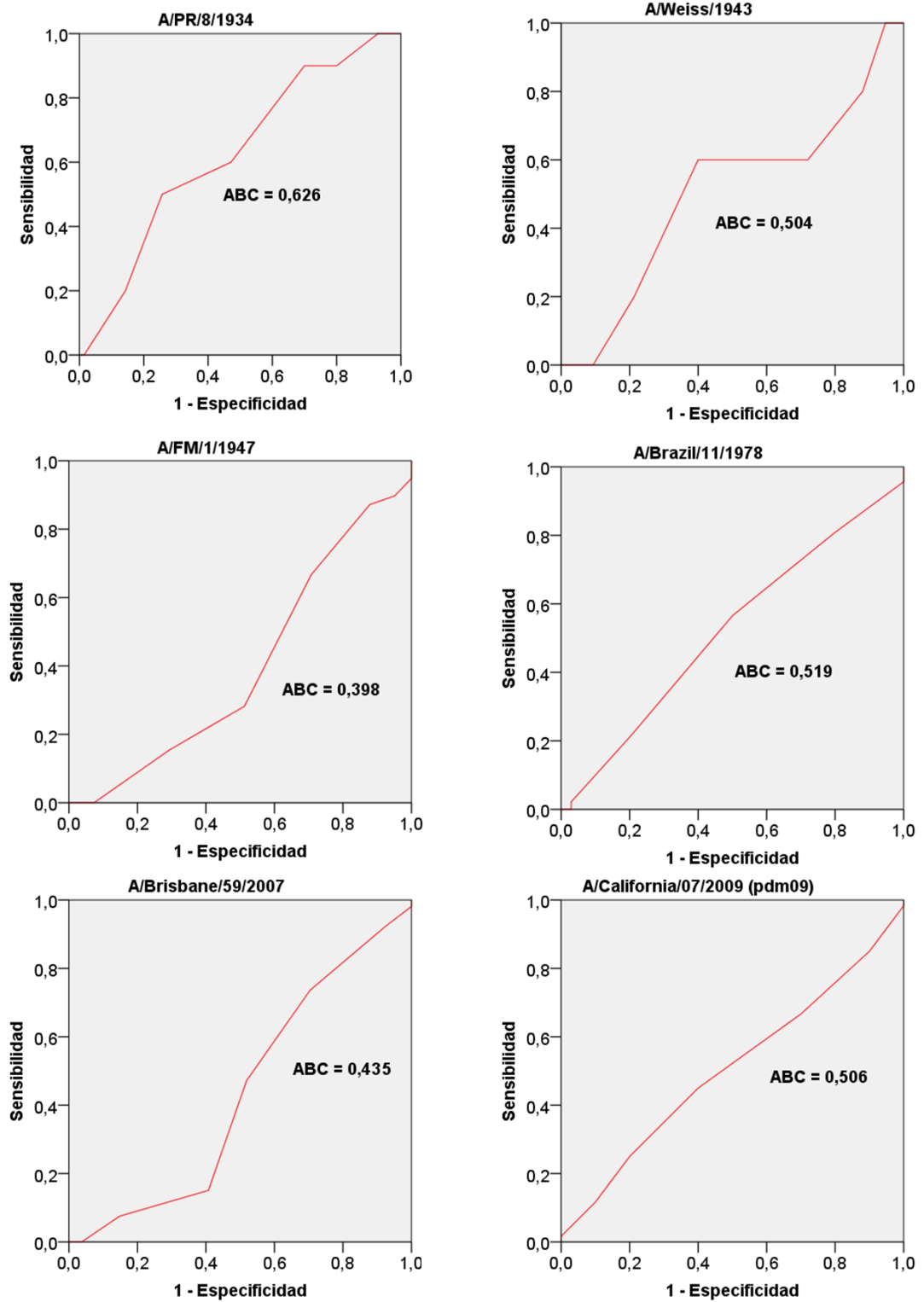


Figura 54. Curvas ROC de los títulos de Acs anti-NA frente a las cepas gripales A(H1N1) clásicas y cepas del subtipo A(H1N1)pdm09 en el grupo de adultos. ABC: valor del área bajo la curva.

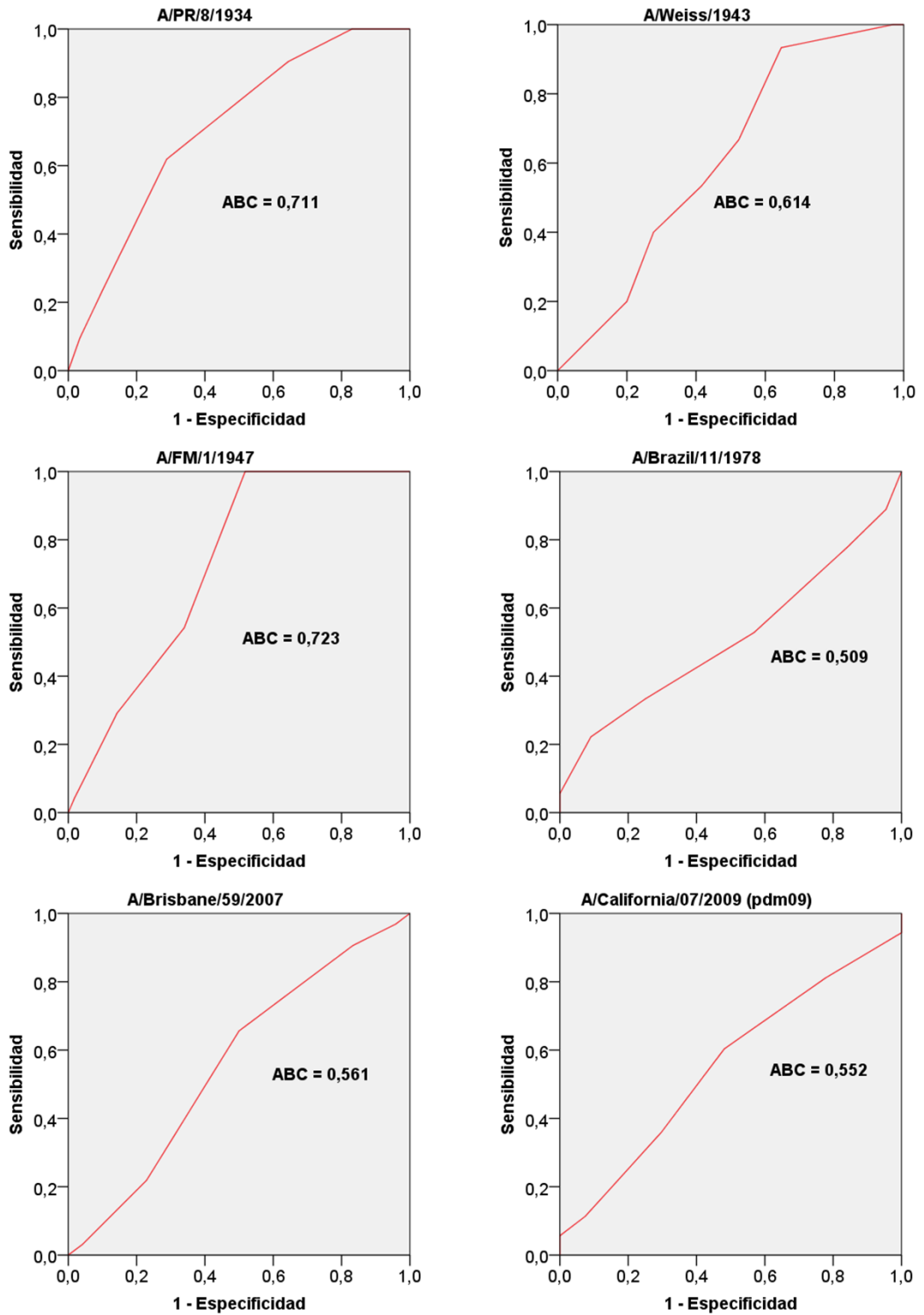


Figura 55. Curvas ROC de los títulos de Acs anti-NA frente a las cepas gripales A(H1N1) clásicas y cepas del subtipo A(H1N1)pdm09 en el grupo de mayores de 65 años). ABC: valor del área bajo la curva.

Análisis comparativo entre los Acs post-vacunales anti-NA y anti-HA

En este apartado se analiza el efecto de la vacuna trivalente anual en ambos grupos etarios (adultos y mayores de 65 años) sobre la generación de Acs específicos frente a la NA y la HA de cepas gripales de los subtipos A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. Para el estudio de la respuesta serológica a la vacunación se analizaron los valores de tasa de seroconversión (TSC) y razón de incremento (RIC) de las medias geométricas de títulos de Acs anti-NA y anti-HA frente a las cepas gripales A(H1N1) Y A(H1N1)pdm 09, valores representados en las **figuras 56 y 57**.

Los datos de este estudio muestran que la vacunación antigripal indujo una mayor seroconversión y una mayor RIC de la media geométrica de los títulos de Acs frente a la NA en comparación con la HA frente a la mayoría de las cepas analizadas, tanto en adultos como en los mayores de 65 años (**figuras 56 y 57**). Los valores más altos de TSC y RIC se observaron en ambos grupos etarios frente a la cepa pandémica A/California/07/2009, cepa incluida en la vacuna. Por otro lado, la vacunación en ambos grupos de edad indujo una mayor TSC y RIC frente a la NA con respecto a la HA de todas las cepas gripales analizadas del subtipo A(H1N1), con la única excepción de la cepa de la cepa A/PR/8/1934, frente a la cual la administración de la vacuna indujo el mismo número de seroconversiones tanto frente a la NA como frente a la HA en ambos grupos etarios.

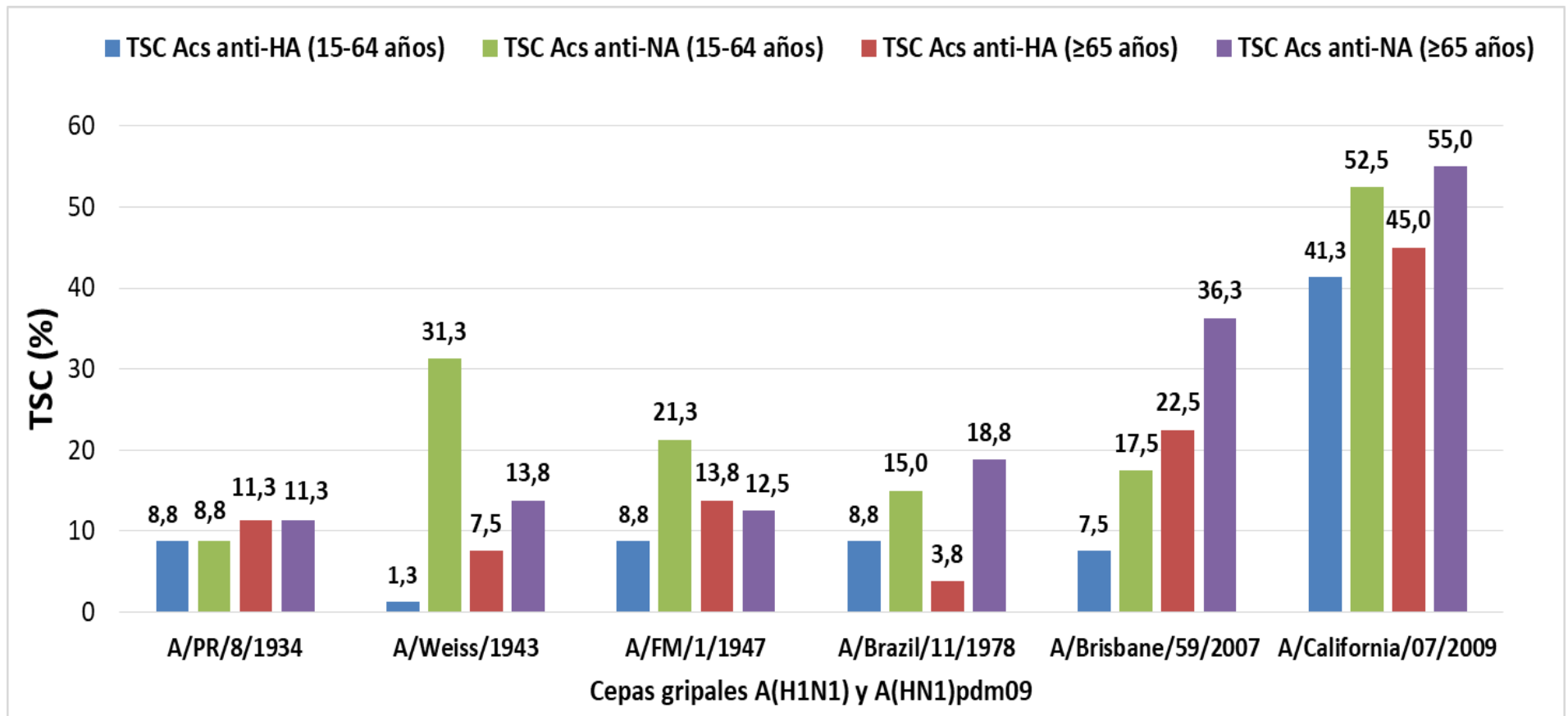


Figura 56. Valores de tasa de seroconversión (TSC-%) de los títulos de Acs anti-HA y anti-NA en individuos adultos y mayores de 65 años frente a cepas gripales del subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

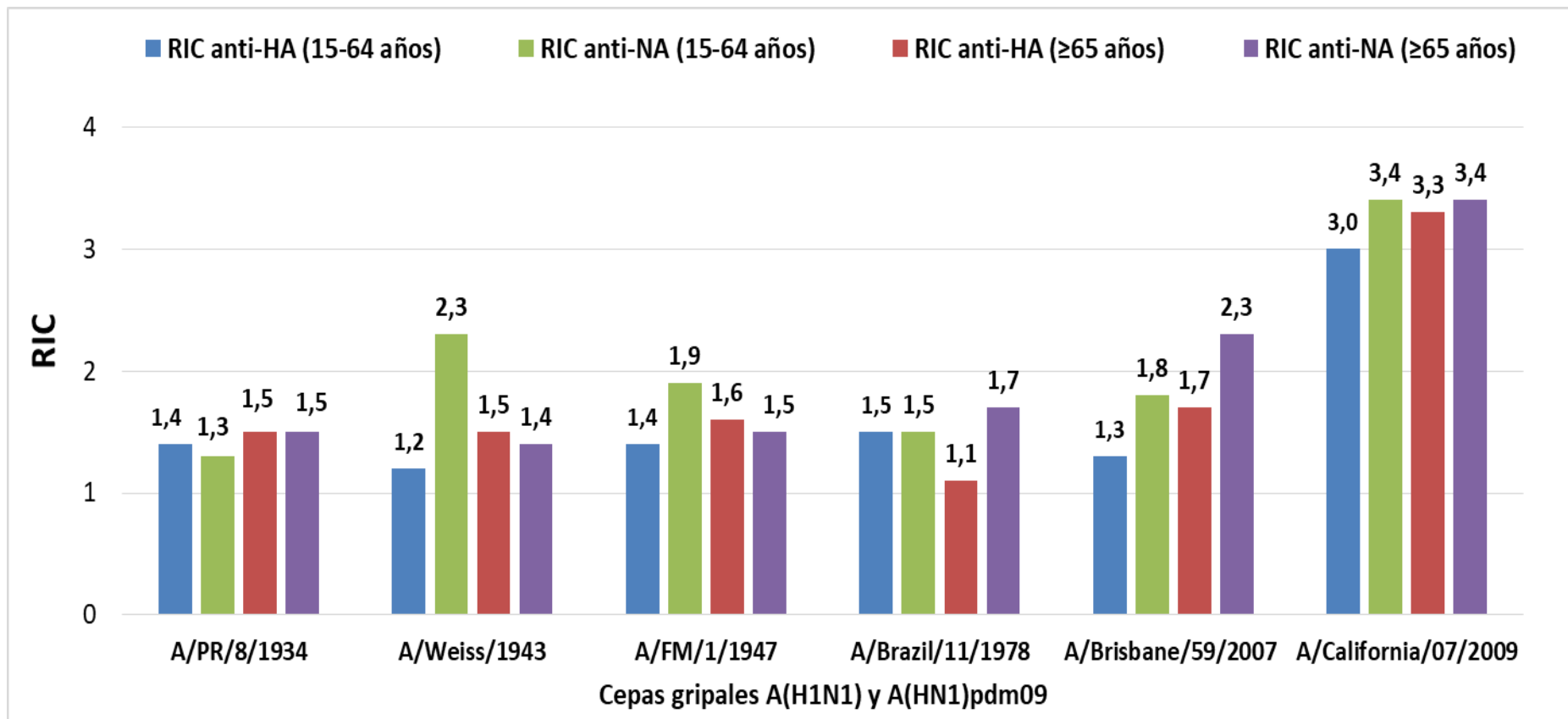


Figura 57. Valores de razón de incremento (RIC) de la media geométrica de los títulos de Acs anti-HA y anti-NA en individuos adultos y mayores de 65 años frente a cepas gripales del subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

- **Análisis del efecto de la vacuna trivalente anual sobre la generación de Acs anti-NA y anti-HA en función del tipo de vacuna administrada.**

Realizar una comparación entre ambos tipos de respuesta post-vacunal de Acs en función del grupo etario considerado supone evaluar la comparación de la respuesta de Acs frente a ambos antígenos gripales (NA y HA) en función del tipo de vacuna antigripal administrada. Esto se debe al hecho de que en el grupo de individuos adultos (15-64 años), todos recibieron vacunas inactivadas antigripales del tipo no adyuvada, mientras que los individuos mayores de 65 años recibieron vacuna inactivada antigripal de tipo adyuvada. En definitiva, se estudió la existencia de posibles diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de respuesta de Acs en términos de TSC y RIC en función del tipo de vacuna administrada: adyuvada o no adyuvada.

Se realizó un test McNemar ($\alpha=0,05$) de variables dependientes para comprobar si tras la vacunación la TSC fue significativamente diferente frente a la NA y HA de cada una de las cepas gripales A(H1N1) (**Tabla 60**). La TSC fue significativamente mayor frente a la NA (TSC: 31,3%) que frente a la HA (TSC: 1,3%) frente a la cepa A/Weiss/1943 en el grupo de individuos de 15-64 años ($p<0,05$). Por otro lado, la TSC fue significativamente mayor frente a la NA (TSC: 8,8%) que frente a la HA (TSC: 3,8%) frente a la cepa A/Brazil/11/1978 en aquellos individuos mayores de 65 años ($p<0,05$). No se encontraron diferencias significativas en la seroconversión homóloga frente a la cepa pandémica A/California/07/2009 (incluida en la vacuna) para ambos grupos etarios.

Se realizó un test T-Student ($\alpha=0,05$) de variables dependientes para comprobar si la RIC tras la vacunación fue diferente entre los títulos de Acs anti-NA y anti-HA frente a cada una de las cepas gripales A(H1N1) (**Tabla 61**). La RIC fue significativamente mayor frente a la NA que frente a la HA para las cepas A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947 en el grupo etario de 15-64 años, y frente a la cepa A/Brazil/11/1978 en el grupo de individuos mayores de 65 años.

Tabla 60. Valores de Tasa de Seroconversión (TSC) en los títulos de Acs anti-NA y anti-HA en función del grupo etario frente a las cepas gripales A (H1N1) analizadas (McNemar; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1)	Grupo etario	TSC (%) Acs anti-NA	TSC (%) Acs anti-HA	p-valor
A/PR/8/1934	15- 64 años	8,8	8,8	1,000
	≥ 65 años	11,3	11,3	1,000
A/Weiss/1943	15- 64 años	31,3	1,3	< 0,001
	≥ 65 años	13,8	7,5	0,227
A/FM/1/1947	15- 64 años	21,3	8,8	0,052
	≥ 65 años	12,5	13,8	1,000
A/Brazil/11/1978	15- 64 años	15,0	8,8	0,267
	≥ 65 años	18,8	3,8	0,008
A/Brisbane/59/2007	15- 64 años	17,5	7,5	0,057
	≥ 65 años	36,3	22,5	0,080
A/California/07/2009	15- 64 años	52,5	41,3	0,078
	≥ 65 años	55,0	45,0	0,185

Tabla 61. Valores de RIC en los títulos de Acs anti-NA y anti-HA en función del grupo etario frente a las cepas gripales A (H1N1) analizadas (T-Student; $p < 0,05$).

Cepas gripales A(H1N1)	Grupo etario	RIC (Acs anti-NA)	RIC (Acs anti-HA)	T-Student	p-valor
A/PR/8/1934	15- 64 años	1,3	1,4	1,263	0,235
	≥ 65 años	1,5	1,5	1,625	0,400
A/Weiss/1943	15- 64 años	2,3	1,2	4,063	<0,001
	≥ 65 años	1,4	1,5	1,494	0,139
A/FM/1/1947	15- 64 años	1,9	1,4	3,043	0,003
	≥ 65 años	1,5	1,6	0,801	0,425
A/Brazil/11/1978	15- 64 años	1,5	1,5	1,741	0,086
	≥ 65 años	1,7	1,1	2,403	0,019
A/Brisbane/59/2007	15- 64 años	1,8	1,3	1,602	0,113
	≥ 65 años	2,3	1,7	0,610	0,543
A/California/07/2009	15- 64 años	3,4	3,0	0,150	0,881
	≥ 65 años	3,4	3,3	2,072	0,088

Discusión

Discusión

La HA de las vacunas antigripales induce respuestas humorales y protección serológica en individuos de distintos grupos de edad y diferentes colectivos de riesgo. Los métodos empleados para su medida y los correlatos de seroprotección frente a la HA que deben utilizarse para evaluar la eficacia de las vacunas antigripales son objeto de debate actual. En el NIC de Valladolid se ha demostrado en trabajos recientes que las vacunas estacionales antigripales son capaces de producir respuestas humorales heterotípicas frente a virus no contenidos en su composición (100,141,142).

Sin embargo, los conocimientos respecto a la respuesta e inmunidad previa frente a la NA son mucho más escasos y limitados. No existe mucha literatura científica que evalúe esta inmunidad ni el efecto de las vacunas antigripales actuales frente a la NA a pesar de su implicación en la respuesta humoral frente a la gripe.

El trabajo presentado para esta Tesis doctoral demuestra la existencia, en porcentajes superiores a la HA, de Acs anti-NA previos a la vacunación, en la práctica totalidad de los individuos estudiados (143). Además, se demuestra una seroconversión apreciable homóloga y heteróloga frente a la NA tras la vacunación a pesar de que el contenido de NA de las vacunas actuales no está estandarizado.

En los apartados siguientes se tratará de explicar y describir aspectos cuantitativos y cualitativos de esa respuesta, mayor cuantitativamente la de NA que la de HA y relacionada con la posible edad de primo-infección de los individuos. Los resultados obtenidos apuntan a una respuesta serológica frente a la NA estrechamente relacionada con el Pecado Original Antigénico, formulado por Sir Thomas Francis en el año 1960 (78) para la HA. El interés por la NA es muy reciente, existiendo sólo un número limitado de publicaciones que demuestran que las vacunas antigripales basadas en la HA inducen también respuestas de Acs frente a la NA (Acs anti-NA). Estos resultados muestran el potencial de este antígeno en las vacunas estacionales, por lo que su uso en las vacunas actuales debería ser considerado y formularse un correlato de protección propio (73,108,144). En los siguientes apartados se discutirán los resultados obtenidos frente a la NA y a la HA en términos cuantitativos y

cualitativos de seroprotección, y se intentará establecer una correlación entre ambas respuestas serológicas, teniendo en cuenta los grupos etarios considerados y las vacunas empleadas.

Este trabajo ha permitido estudiar por primera vez en una población europea la respuesta serológica tanto en términos de Acs anti-NA como de Acs anti-HA conjuntamente y es uno de los pocos en estudiar conjuntamente ambas respuestas. El análisis de los Acs anti-NA y anti-HA previos a la vacunación en la población de estudio, con el fin de conocer su inmunidad previa frente a cepas gripales clásicas y más recientes del subtipo A(H1N1) estacional y de la variante pandémica A(H1N1)pdm09. En segundo lugar, se analizó la respuesta serológica en términos de producción de Acs anti-NA y anti-HA tras la administración de distintas vacunas antigripales estacional en dichas poblaciones.

En resumen, en el presente trabajo se establecerán conclusiones derivadas del análisis de la respuesta de Acs en sueros pre y post-vacunales de 160 individuos, reclutados de dos campañas vacunales antigripales post-pandémicas (2013-14 y 2014-15), frente a 5 virus de la gripe pre-pandémicos diferentes además del A(H1N1)pdm09 vacunal, lo que supuso la realización de 3.840 reacciones de inhibición de hemaglutinación (RIH) y 3.840 reacciones de ensayo enzimático ligado a lectina (ELLA) durante un periodo de 3 años.

Ámbito poblacional del estudio

En este trabajo se presentan datos de la presencia de Acs pre-vacunales y post-vacunales frente a distintos virus de la gripe A(H1N1) en dos grupos etarios de población, una población de adultos (15-64 años) y un grupo de mayores de 65 años. Esta clasificación etaria ha sido clásicamente utilizada para el estudio de la eficacia y efectividad de las vacunas antigripales (8,115,145–148), así como para el análisis de diversos indicadores utilizados en el estudio sero-epidemiológico de virus de la gripe (149–152), como la contabilización del número de casos graves hospitalizados con confirmación de gripe (CGHCG) o el número de hospitalizaciones con gripe confirmada, independientemente de su gravedad.

El grupo de mayores de 65 años constituye una de las dianas clásicas de la vacunación antigripal por considerarse uno de los grupos de riesgo de complicaciones asociadas a la gripe (153). Es por ello que muchos de los estudios de la eficacia y efectividad vacunal se centran en este segmento de la población (88,115,145–147). El diseño experimental propuesto en este trabajo permite evaluar, entre otros factores, las diferencias en los títulos de Acs en aquellos individuos más mayores, que pudieron ser primo-infectados por virus descendientes directamente de la Gripe Española de 1918, en comparación con aquellos individuos más jóvenes donde la respuesta inmune frente a los virus de la gripe pueda estar condicionada a la exposición a cepas más actuales.

Por otra parte, la diferencia en dos grupos etarios no sólo hace referencia a la edad de los individuos, sino también al tipo de vacuna que recibieron. Los mayores de 65 años analizados en este trabajo recibieron vacunas de tipo adyuvado, que refuerzan la inmunidad frente a la gripe, mientras que los adultos recibieron vacunas de tipo inactivado no adyuvado.

Características demográficas de los individuos de 15-64 años

La media de edad de los individuos incluidos en este estudio fue de 50,8 años, siendo esta media de edad similar entre ambas temporadas vacunales analizadas.

La distribución porcentual de sexos varió en función de cada temporada vacunal analizada pero la variación fue mínima de modo que no se observaron diferencias en esta proporción entre las diferentes temporadas.

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 (130). El número medio de días entre la administración de la vacuna y la extracción del suero post-vacunal fue en ambas temporadas superior a 28 días, por lo que se aseguró que la respuesta humoral ha sido completa en todos los individuos del estudio.

Características demográficas de los individuos ≥ 65 años

La media de edad de los individuos mayores de 65 años incluidos en este estudio fue de 78,6 años. Esta media de edad fue superior en la temporada 2014-2015 (81,2 años) que en la temporada 2013-2014 (76,0 años), aspecto que ha de ser tenido en cuenta a la hora de interpretar algunos de los epígrafes de este trabajo. La distribución porcentual de sexos varió mínimamente en función de cada temporada vacunal analizada, observándose valores similares entre el ratio hombre-mujer.

El número de días desde la administración de la vacuna hasta la extracción del suero post-vacunal (NDEV) fue en todos los individuos superior a 28 días, del mismo modo que en el grupo de adultos. No hubo diferencias significativas en el NDEV medio entre ambas temporadas vacunales, permitiendo la creación de subgrupos poblacionales homogéneos para su comparación.

Estudio de la respuesta serológica mediada por Acs anti-NA

Para el estudio de la inmunidad humoral frente a la gripe en una población se han evaluado tradicionalmente los títulos de Acs anti-HA (62,105,106), mientras que otros posibles correlatos de la protección inmunitaria (por ejemplo, los títulos de Acs anti-NA) no han sido examinados con detalle. Siguiendo esta línea, las estrategias actuales de vacunación se han centrado predominantemente en aumentar la respuesta humoral contra la HA. Así mismo, los Acs anti-HA se usan rutinariamente para evaluar la inmunidad humoral conferida tras la vacunación antigripal (101,102).

Cada vez son más los estudios que justifican que, además de la inmunidad conferida por la HA, se necesita de otros correlatos de protección para ofrecer una visión más completa sobre la protección frente a la gripe (62,114,129). Algunos trabajos muestran que la NA tiene relevancia en la respuesta humoral frente a la gripe (72,73,108), y en los últimos años se ha despertado un mayor interés por este antígeno con el objeto de conseguir una mejor protección con las actuales vacunas antigripales. En este epígrafe del presente trabajo se ha evaluado la protección humoral y la respuesta a las vacunas estacionales de dos poblaciones con edades diferentes frente a seis cepas A(H1N1) distintas, enmarcando la importancia de la NA dentro de la protección frente a la gripe.

Estudio de Acs anti-NA previos a la vacunación

Con el estudio del análisis pre-vacunal se pretende conocer el grado de protección e inmunización de una población frente a determinados virus de la gripe. En este epígrafe se estudia la presencia de Acs anti-NA pre-vacunales observados en la población en función de los grupos etarios y de las campañas vacunales.

- **Estudio de Acs anti-NA pre-vacunales en función del grupo etario.**

El análisis ELLA demostró presencia de Acs anti-NA a títulos $\geq 1/10$ en prácticamente la totalidad de los sueros pre-vacunales frente a todas las cepas del subtipo A(H1N1) clásico y A(H1N1)pdm09 analizadas en la población estudiada. Cabe mencionar que únicamente tres individuos mostraron títulos de Acs $< 1/10$, cada uno de ellos frente a las cepas A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947 respectivamente. Estos individuos presentaban respectivamente una edad de 68, 59 y 56 años, de modo que por edad, no habían estado expuestos a la circulación de estas cepas A(H1N1) clásicas comentadas anteriormente. No obstante, la población global estudiada mostró Acs pre-vacunales de anti-NA a títulos $\geq 1/40$ en una gran proporción frente a todos los virus gripales del subtipo A(H1N1) clásico y del subtipo pandémico A(H1N1)pdm09. Para analizar de forma más pormenorizada las posibles explicaciones de la presencia de estos Acs es necesario realizar un estudio por grupo etario, el cual se describe a continuación.

Analizando ambos grupos etarios, el porcentaje de individuos con títulos de Acs anti-NA pre-vacunales frente a todas las cepas gripales fue elevado en ambos grupos. El análisis de Acs anti-NA previos a la vacunación mostró que estos estaban presentes a títulos protectores $\geq 1/40$ en mayores de 65 años en más del 96,3% frente a todas las cepas A(H1N1) clásicas y en un 96,3% frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1)pdm09. En el grupo de adultos (15-64 años), los Acs anti-NA se encontraban en títulos $\geq 1/40$ en más del 81,3% de los individuos frente a todas las cepas A(H1N1) y en un 86,3% frente a la cepa A/California/07/2009. Los Acs anti-NA observados en este trabajo se corresponden con virus que han circulado entre 37 y 81 años antes de la obtención de los sueros pre-vacunales de los individuos estudiados, por lo que estos resultados tienen relevancia.

El origen de estos Acs puede deberse a varios factores. Por un lado, la presencia de estos Acs puede ser debida a infecciones pasadas causadas por las diferentes cepas del subtipo A(H1N1) y del subtipo A(H1N1)pdm09, o a vacunaciones anteriores a la obtención de los sueros pre-vacunales en las que estuviera presente alguna de estas cepas. En este supuesto, los Acs anti-NA que hemos observado en este trabajo estarían

presentes en estos individuos desde la exposición a estas cepas, manteniéndose como fruto de la memoria inmunológica (154,155). En este contexto, los Acs anti-NA generados desde dichas exposiciones al virus se habrían mantenido hasta el momento incluso a títulos que para la NA se han considerado como protectores en este trabajo, dando estos resultados relevancia a los contactos con la gripe que sufre un individuo durante su vida.

Estos Acs anti-NA están presentes a títulos protectores (tomando como correlato de seroprotección tanto un título $\geq 1/40$ como $\geq 1/80$) en un alto porcentaje tanto de adultos como en mayores de 65 años. Debido a la media de edad de los mayores de 65 años, es muy probable que gran parte de estos individuos hayan estado en contacto, al menos de forma natural, con todos los virus que se han estudiado en este trabajo, por lo que la hipótesis de que estos Acs estén presentes en este grupo de edad como fruto de la memoria inmunológica es plausible. Sin embargo, en el caso de los adultos, los individuos más mayores de este grupo han nacido en la década de 1950, por lo que los Acs anti-NA observados frente a las cepas circulantes antes a esta fecha (A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947) no puede tener un origen ligado a la memoria inmunológica, ya que esta población nunca estuvo expuesta a ellos. En estos casos, el origen de estos Acs debe ser diferente.

Otra de las posibles causas de la presencia de estos Acs anti-NA es que estos sean consecuencia de respuestas heterotípicas de Acs frente a cepas del mismo subtipo A(H1N1), debido a vacunaciones o exposiciones naturales a cepas relacionadas antigénicamente con los virus analizados. El análisis filogenético de este estudio mostró que la homología genética de la NA (N1) de todas las cepas A(H1N1) clásicas analizadas fue superior al 85%, y superior al 72% con respecto al subtipo A(H1N1)pdm09. Esta homología genética provoca que ciertas partes de los antígenos se encuentren más conservadas entre diferentes cepas, y puedan ser objetivo de un mismo tipo de Acs (14,109,154,155).

Las reacciones heterotípicas entre diferentes cepas de virus de la gripe, o incluso entre diferentes subtipos es frecuente. Existen trabajos que demuestran la existencia de respuestas cruzadas entre cepas diferentes de un mismo subtipo, tanto en la HA (47,100,105,141,142) como en la NA (155). La variabilidad de la HA es un logaritmo

superior en magnitud a la de la NA (11), por lo que sería esperable, y parece confirmarse en este trabajo, que las respuestas heterotípicas de Acs frente a la NA pueden ser incluso más frecuentes. Esto justifica que los resultados observados en el presente trabajo puedan ser debidos a respuestas heterólogas frente a la NA, lo que según la literatura parece más frecuente entre NAs tipo N1 (155). Estas respuestas heterotípicas son interesantes, ya que aportan información que puede ser útil para los futuros diseños de vacunas universales que buscan una respuesta de amplio espectro contra todos los virus de la gripe (98-100). En este contexto, es importante reseñar que algunos virus aviares con potencial pandémico que causan casos en humanos son virus que contienen NA del tipo N1, como el virus A(H5N1). Los datos de este estudio muestran que las exposiciones frente a NAs del tipo N1 parecen inducir respuestas heterotípicas de Acs capaces de reconocer varios virus que poseen la N1, por lo que podría ser posible que estos Acs pudieran ser útiles frente al subtipo A(H5N1), hecho que requiere de mayor investigación.

El historial de vacunaciones previas de las dos poblaciones analizadas podría haber influido en la magnitud de los títulos pre-vacunales de Acs anti-NA observados. En el caso de los individuos mayores de 65 años es probable que ya hayan sido vacunados anteriormente varias veces en su vida, debido a que pertenecen a un colectivo de riesgo y su vacunación está indicada y recomendada (83). Sin embargo, no se conocen las exposiciones anteriores a virus de la gripe, ya sean por exposición natural o por vacunación, de ninguna de las poblaciones estudiadas.

A tenor de los resultados observados sobre los títulos de Acs anti-NA en ambas poblaciones analizadas, parece probable que en el origen de estos Acs pre-vacunales estén implicadas ambas hipótesis antes descritas, tanto la memoria inmunológica como las respuestas heterotípicas.

En el caso de la cepa vacunal A/California/07/2009, cuya TSP pre-vacunal fue superior en mayores de 65 años cuando se consideró un título $\geq 1/40$ como correlato de seroprotección, es probable que esta mayor TSP pre-vacunal sea debida a las vacunaciones anteriores con la cepa pandémica de la población mayor de 65 años. Como se ha comentado con anterioridad, la población mayor de 65 años ha sido probablemente vacunada varias veces en su vida, por lo que es probable que haya sido

inmunizada frente a la cepa A/California/07/2009 varias veces en las temporadas previas a las estudiadas, justificando esa mayor TSP pre-vacunal con respecto a los adultos.

La TSP pre-vacunal (tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA $\geq 1/40$) fue significativamente superior frente a las cepas A/PR/8/1934, A/FM/1/1947 y A/California/07/2009 en mayores de 65 años. Sin embargo, cuando se tomó como correlato de seroprotección un título $\geq 1/80$, la TSP pre-vacunal fue significativamente superior en mayores de 65 años frente a las cepas A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947. Tomando cualquiera de los correlatos de seroprotección se observó que la TSP pre-vacunal fue mayor frente a los virus más antiguos en mayores de 65 años. Teniendo en cuenta que la media de edad en el grupo más envejecido fue de 78,6 años, algunos de los individuos del grupo de mayores de 65 años han nacido antes del año 1935, por lo que han estado probablemente expuestos a varias cepas A(H1N1) anteriores a la extinción de este subtipo en 1957 e incluso algunos muy cercanos a la Gripe Española (38,40,44). Esto puede justificar la mayor TSP pre-vacunal observada en este grupo de edad frente a cepas antiguas, que son probablemente unas de las cepas del subtipo A(H1N1) que primo-infectaron a esta población mayor de 65 años. En el grupo de adultos (15-64 años), estos presentaron una media de edad de 50,8 años, por lo que es probable que los primeros contactos con virus del subtipo A(H1N1) se dieran con cepas relacionadas con la cepa A/USSR/90/77 (como A/Brazil/11/1978), que apareció en el año 1977 (44,45).

La relación de la edad de los individuos con las cepas con las que probablemente tuvieron sus primeros contactos también se observó en el análisis de las MGT entre ambos grupos etarios. La MGT pre-vacunal fue significativamente más elevada en el grupo de mayor edad frente a los virus A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947, y significativamente mayor en los adultos frente a la cepa A/Brazil/11/1978, resultados muy semejantes a los observados en el estudio de la TSP-prevacunal. De este modo, los resultados de este trabajo mostraron que, tanto evaluando la TSP como la MGTs se vió una relación directa de la seroprotección con las primeras exposiciones a virus de la gripe. En otros términos, aquellos virus gripales que probablemente infectaron por primera vez a un individuo marcan su sistema inmune y le condicionan para el resto de

su vida, de tal manera que cuando vuelven a tener infecciones frente a virus de la gripe, esto tiene una influencia en el sentido de que el individuo produce Acs frente al nuevo virus que le infecta, pero además produce una respuesta Acs de mayor magnitud frente al virus que le infectó la primera vez. Este fenómeno inmunológico, denominado bajo el término de pecado original antigénico (78–81) e inicialmente descrito por Sir Thomas Francis en el año 1960 (78), ha sido ampliamente descrito en la respuesta inmune humoral frente a virus de la gripe y ha obtenido gran importancia a la hora de entender la respuesta a las vacunas de gripe. El pecado original antigénico ha sido descrito en numerosas ocasiones en la respuesta humoral frente a la HA gripal (79,80,157), pero hasta el momento no había sido estudiado en la inmunidad basada en la NA. Los datos de este trabajo así como un estudio recientemente publicado (157) muestran por primera vez que este interesante efecto inmunológico también ocurre frente a la NA.

En conclusión, los datos de este trabajo mostraron títulos pre-vacunales de Acs anti-NA a título protector ($\geq 1/40$) en una gran proporción de la población frente al subtipo A(H1N1) clásico y frente al subtipo A(H1N1)pdm09. El origen de estos Acs parece ser multifactorial y estar relacionado con la memoria inmunológica basada en experiencias pasadas con virus de la gripe, y también en la presencia de Acs heterotípicos fruto de la relación antigénica entre las diferentes cepas analizadas. Las MGTs de Acs anti-NA pre-vacunales fueron más elevadas frente a virus antiguos A(H1N1) en mayores de 65 años y en virus más actuales en adultos, coincidiendo con las cepas de dicho subtipo que probablemente primo-infectaron a estos individuos.

- **Estudio de Acs anti-NA pre-vacunales en función de la temporada vacunal y del grupo etario.**

Cuando se analizó la TSP en ambos grupos etarios entre cada campaña vacunal y tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA $\geq 1/40$, se observó que el grupo de adultos mostró una TSP pre-vacunal frente a la cepa A/PR/8/1934 significativamente mayor en la temporada 2014-15 (TSP: 97,5%) que en la temporada

2013-14 (TSP: 65,0%). No se encontraron diferencias frente al resto de cepas. Tampoco se encontraron diferencias en el grupo de mayores de 65 años.

La media de edad de los adultos fue similar entre ambas temporadas, no encontrándose diferencias significativas. Por ello, la edad no parece justificar las diferencias observadas en la TSP pre-vacunal. Por otro lado, se desconoce el historial previo de vacunación de los individuos reclutados, del mismo modo que se desconoce si un mismo individuo fue vacunado en las dos temporadas vacunales consecutivas. De este modo, no es posible atribuir que esa diferencia en la TSP pre-vacunal se deba a que el índice de vacunaciones previas en la población reclutada en la temporada 2014-15 fuera mayor, o bien, que parte de los individuos reclutados en esta temporada fueran vacunados en la temporada anterior. Descartadas estas posibles justificaciones, este hecho es probablemente un sesgo causado por el tamaño de la muestra poblacional incluida para el estudio.

Cuando se compararon estos resultados tomando como correlato de seroprotección un título Acs anti-NA $\geq 1/80$, en el grupo de mayores de 65 años, la TSP pre-vacunal fue significativamente mayor en la temporada 2013-14 frente a la cepa A/Brazil/11/1978 (TSP: 100%) que en la temporada 2014-2015 (TSP: 85,0%). Cabe destacar que la media de edad en este grupo fue significativamente mayor en la temporada 2014-15 (81,2 años) que en la temporada 2013-14 (76,0 años). Una posible explicación a esta menor TSP pre-vacunal en la temporada 2014-15 es la mayor media de edad que presentó el grupo reclutado en la campaña vacunal 2014-2015. En este contexto, el factor biológico de la inmunosenescencia puede haber contribuido a una menor producción de Acs anti-HA en este grupo de población (158–162). Es cierto pensar que aquellos individuos de mayor edad son los que probablemente más experiencias de exposición a los virus de la gripe han tenido en su vida, y por tanto en los que debería observarse un mayor título 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 (158–162). 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 (158–162).

En definitiva, cuando se estudió la seroprotección en mayores de 65 años en ambas temporadas, la cohorte de mayor edad aún (temporada 2014-15) mostró una menor producción de Acs frente a la cepa A/Brazil/11/1978, justificada por una mayor inmunosenescencia en este grupo. No obstante, cuando se analizó en el epígrafe anterior de este trabajo la TSP pre-vacunal entre adultos y mayores de 65 años, cabe recordar que las diferencias en la seroprotección entre los diferentes grupos de población obedecían además a otros conceptos como es el pecado original antigénico, de modo que aquellos individuos de mayor edad presentaban incluso títulos mayores de Acs frente a cepas gripales más antiguas con respecto a los individuos más jóvenes. En opinión del autor de este trabajo, el origen de estas diferencias en la inmunidad protectora de una población no puede atribuirse únicamente a un solo concepto sino que todo ello depende de un contexto multifactorial en el que están implicados varios factores como pueden ser el pecado original antigénico y el factor de la inmunosenescencia.

Estudio de Acs anti-NA tras la vacunación

A pesar de que existe evidencia científica de que la respuesta de Acs anti-NA contribuye en la protección frente a la gripe (138,144,154,157), el contenido de NA no ha sido estandarizado en las actuales vacunas antigripales. Es por ello que hasta el momento, la respuesta serológica mediada por Acs anti-NA no se analiza de forma rutinaria para el estudio de la respuesta humoral tras la vacunación. En el presente trabajo se evaluó la respuesta serológica de Acs anti-NA en ambas poblaciones analizadas tras su vacunación.

- **Estudio del efecto de la vacuna trivalente estacional sobre la generación de Acs anti-NA en función del grupo etario.**

La vacunación antigripal con la cepa A/California/07/2009 (pdm09) indujo respuestas humorales homólogas frente a la NA de la cepa del subtipo A(H1N1)pdm09,

pero también respuestas heterólogas frente a la NA de los virus gripales analizados del subtipo A(H1N1) estacional, que se corresponden con virus no incluidos en la vacuna. Estas respuestas homólogas y heterólogas fueron observadas tanto en los adultos como en mayores de 65 años aunque en diferentes magnitudes. Cabe mencionar que incluso en los tres individuos que mostraban títulos pre-vacunales de Acs anti-NA <1/10 (cada uno de ellos frente a las cepas A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947 respectivamente), tras la vacunación vieron aumentados los títulos de Acs anti-NA en al menos dos unidades. Cabe destacar que esta respuesta serológica a la vacunación ocurre a pesar de que la vacuna administrada no posee una cantidad estandarizada de NA en su composición. Las actuales vacunas antigripales están estandarizadas únicamente en base a la cantidad de HA, pero debido a los procesos de manufacturación pueden presentar cantidades variables de NA (112,114,163–165). En consonancia con estudios previos (64,104,166), los resultados de este trabajo muestran que este tipo de vacunas estacionales pueden inducir respuestas humorales que induzcan e incrementen el título de Acs frente a la NA.

Si bien es importante que la NA contenida en las vacunas estacionales induzca respuestas homólogas frente a la cepa vacunal, también es relevante que estas vacunas induzcan respuestas heterotípicas de producción de Acs anti-NA frente a todas las cepas del subtipo A(H1N1) clásico analizadas en este estudio. Cabe recordar que algunas de las cepas analizadas circularon hace más de 70 años antes de la cepa vacunal con la que se está inmunizando a ambas poblaciones a estudio. Como se ha comentado anteriormente, la NA presenta una variabilidad antigénica menor que la HA, lo que permite la existencia de epítomos conservados en la NA que favorecen las reacciones heterotípicas entre cepas gripales pertenecientes a un mismo subtipo o incluso dentro del mismo tipo N1 (7,114).

Los resultados de este estudio muestran que la NA puede ser una interesante diana vacunal para los futuros diseños vacunales, los cuales buscan inducir respuestas humorales de amplio espectro frente a muchos tipos y subtipos de virus de la gripe (8,86). En este sentido, las respuestas heterotípicas observadas son importantes, ya que pueden ser útiles para que los diseños en los que se incluya la NA como antígeno vacunal induzcan protección frente a diferentes virus de la gripe, incluso frente a

algunos que no son estacionales. Dado que uno de los principales objetivos del diseño de las futuras vacunas contra la gripe es aumentar las respuestas heterotípicas (concepto de “vacuna universal”) y también incluir nuevas dianas virales para inducir respuestas humorales más amplias (8,86), los resultados de este trabajo demuestran que la NA es una diana prometedora para abordar estos requisitos. No obstante, se necesita más investigación para determinar cómo estas vacunas podrían inducir una protección humoral heterotípica contra otros virus que contienen neuraminidasa NA1, como es el caso del virus aviar A(H5N1), como se ha descrito frente a la hemaglutinina viral (100,141).

Cabe recordar que ambas poblaciones analizadas mostraban ya altas TSP pre-vacunales frente a la NA de todas las cepas gripales analizadas. No obstante, la administración de la vacuna antigripal logró aumentar globalmente esta TSP en un 6,9% y un 2,5% frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/FM/1/1947 del subtipo A(H1N1), respectivamente; y en un 8,1% frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1)pdm09, obteniéndose TSP post-vacunales superiores a un 95% frente a la NA (tomando como correlato de seroprotección un título $\geq 1/40$). En otros términos, la vacuna trivalente anual fue capaz de aumentar la seroprotección en la población vacunada frente a cepas A(H1N1) clásicas que no circulaban desde hace más de 70 años.

Uno de los problemas actuales de la vacunación frente a la gripe es que con cierta frecuencia existe una discordancia o *mismatch* antigénico entre las cepas vacunales y los virus circulantes, fruto de las propias limitaciones de los métodos de producción actuales fundamentados en la producción en huevos embrionados (167). Esto repercute negativamente en la efectividad de la vacuna (167–169). Los datos de nuestro estudio muestran que las respuestas heterotípicas frente a la NA son frecuentes, y permiten alcanzar tasas de seroprotección muy elevadas (tomando como correlatos de seroprotección los valores estandarizados para la HA) frente a virus alejados antigénicamente con respecto a la cepa vacunal. Debido a esto, la NA podría ser una interesante diana vacunal también para limitar la discordancia antigénica entre cepas vacunales y circulantes.

La vacuna con la cepa A/California/07/2009 (pdm09) produjo seroconversión homóloga frente al subtipo A(H1N1)pdm09 en más de la mitad de los individuos adultos (52,5%) y mayores de 65 años (55,0%). La vacunación produjo también seroconversión heteróloga frente a todas las cepas analizadas del A(H1N1) clásico en ambos grupos etarios, observándose TSC en adultos de entre 8,8% (A/PR/8/1934) y 31,3% (A/Weiss/1943), y en mayores de 65 años de entre 11,3% (A/PR/8/1934) y 36,3% (A/Brisbane/59/2007). A pesar de que la respuesta serológica mediada por Acs anti-NA no se analiza de forma rutinaria para el estudio de la respuesta humoral tras la vacunación, los resultados de este estudio muestran interesantes respuestas homóloga y heterólogas frente a la NA debida a la vacunación, y que por tanto, es interesante conocer este tipo de respuesta además del estudio de la hemaglutinina.

Analizando el efecto de la vacuna en la población en función del grupo etario, la TSC tras la vacunación fue significativamente mayor frente a la cepa A/Weiss/1943 en el grupo de adultos (TSC: 31,3%) que en el grupo ≥ 65 años (TSC: 13,8%), y mayor frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 en mayores de 65 años (36,3%) que en adultos (17,5%). No se encontraron diferencias en la TSC heteróloga entre ambos grupos etarios frente al resto de virus, ni tampoco frente al subtipo pandémico A(H1N1)pdm09 incluido en la vacuna. Esto supone un hecho anecdótico ya que, por edad, los adultos nunca han debido estar en contacto con esta cepa (A/Weiss/1943) debido a que ninguno de estos individuos nació antes del año 1960. Este hecho es probablemente un sesgo causado por los altos títulos pre-vacunales de Acs anti-NA que presentaba el grupo de mayores de 65 años, lo que podría haber atenuado el aumento de los títulos de Acs anti-NA tras la vacunación en este grupo. En comparación con el grupo de mayor edad, los adultos mostraron un menor título de Acs anti-NA previos a la vacuna, por lo que la respuesta de Acs tras la vacunación fue significativamente mayor.

La segunda observación fue que la TSC frente a la cepa A/Brisbane/59/2007 fue significativamente más elevada en el grupo de mayor edad (36,3%) que en adultos (17,5%). Aunque no se conozca el historial de vacunación, esta población mayor de 65 años probablemente hubiera sido vacunada en temporadas anteriores. En nuestro medio, durante las temporadas 2008-2009 y 2009-2010, se administraron vacunas que incluyeron como cepa vacunal la cepa en cuestión (A/Brisbane/59/2007). Por tanto, la

seroconversión heterotípica observada en este estudio puede ser fruto de un efecto tipo *booster* mediante la vacunación.

Tal como se ha comentado con anterioridad, esta respuesta serológica heteróloga frente a la NA de cepas que no están incluidas en la vacuna puede ser consecuencia de respuestas cruzadas de Acs frente a epítomos antigénicos conservados en el antígeno de la NA de las distintas cepas del subtipo A(H1N1) estacional con la cepa del subtipo A(H1N1) pandémico.

Las MGTs de Acs anti-NA tras la vacunación estacional se duplicaron con respecto a las MGTs pre-vacunales frente a casi todas las cepas gripales analizadas en ambos grupos etarios considerados. Esto demuestra la capacidad de la vacuna estacional contra la gripe, actualmente sólo basada y estandarizada para la HA, para elevar los títulos de Acs contra la NA, un aspecto que debería tenerse en cuenta para el diseño de futuras vacunas contra la gripe.

La comparación de las MGTs post-vacunales en función de los dos grupos etarios considerados en la población del estudio mostraron diferencias interesantes que merecen ser comentadas. En el grupo de mayores de 65 años, la MGT de Acs anti-NA fue significativamente mayor con respecto a la de los adultos frente a las cepas A/PR/8/1934, A/FM/1/1947 y A/Brisbane/59/2007. Por otro lado, se observó una MGT significativamente mayor en los adultos frente a la cepa A/Brazil/11/1978. Teniendo en cuenta la media de edad de cada grupo etario (50,8 y 78,6 años en el grupo de adultos y ancianos, respectivamente), los resultados de este estudio concluyen que tras la vacunación se produjo una respuesta serológica de una forma más acusada frente a la primera cepa o cepas que probablemente primo-infectaron a estos individuos. Este fenómeno inmunológico notable que se produce sobre el primer virus que infectó a un individuo, descrito por diversos autores como “pecado original antigénico”, tiene sin duda repercusión en la respuesta humoral frente a la NA de virus de la gripe de igual modo que ha sido estudiado para la HA (78–82) y despierta un especial interés en la formulación de vacunas futuras en las que se pretende obtener una respuesta más amplia.

El análisis de la respuesta post-vacunal de Acs anti-NA en función del grupo etario no sólo buscó mostrar las diferencias debidas a la edad de los individuos adultos y mayores de 65 años, sino también mostrar las diferencias entre dos conceptos vacunales diferentes. Es necesario recordar que el grupo de mayores de 65 años fue vacunado con una vacuna adyuvada, mientras que los adultos fueron vacunados con vacunas inactivadas sin adyuvante.

La respuesta serológica a la vacunación en términos de razón de incremento de la MGT de Acs anti-NA fue más elevada en los mayores de 65 años con respecto al grupo de adultos frente a varias de las cepas analizadas del subtipo A(H1N1), concretamente A/PR/8/1934, A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007. Frente a la cepa A/California/07/2009 (pdm09), dicha respuesta serológica a la vacunación fue similar en ambos rangos etarios. Esta observación contrasta con el fenómeno de inmunosenescencia ampliamente descrito en la respuesta a la vacunación en población anciana (158–160,162), por el que cabe esperar una menor respuesta de Acs post-vacunales en este rango de población. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la vacuna administrada en los mayores de 65 años fue de tipo adyuvada, que se corresponde con la estrategia vacunal actual en este grupo de población envejecida con el que se consigue mitigar el efecto de la inmunosenescencia mediante el uso de adyuvantes como el MF-59 (88). Por tanto, esta consideración puede justificar lo observado. De ser así, los datos de este trabajo concluyen que el uso de adyuvantes contribuye a optimizar la inmunidad contra la NA presente en la vacuna, sin olvidar que las vacunas antigripales diseñadas por el momento no cuentan con un contenido estandarizado de NA vacunal. Resulta interesante poder contar en futuras investigaciones con vacunas antigripales diseñadas con un contenido estandarizado de NA y estudiar con detalle cómo influye el uso de adyuvantes en la inmunogenicidad de la NA presente en la vacuna antigripal.

Los resultados de este estudio demuestran que la vacuna estacional antigripal aumenta los títulos de Acs anti-NA en un gran porcentaje de la población analizada a pesar de que estas vacunas no incluyen un contenido estandarizado de NA en su composición. No obstante, la valoración de esta respuesta serológica mediada por Acs anti-NA en términos de “protección conferida tras la vacunación” no puede evaluarse

utilizando únicamente la metodología utilizada, sino que es necesario realizar estudios *in vivo* para determinar la eficacia de una hipotética vacuna contra la gripe que contenga una cantidad estandarizada de NA. Estudios anteriores han evaluado la presencia de Acs anti-NA y su relación con la protección inmunológica frente a la gripe, tanto en modelos animales (154) como en ensayos controlados en humanos (108,144). Los datos de este trabajo y de estudios anteriores apoyan que la inmunidad serológica basada en la NA juega un papel importante en la protección frente a la gripe y que el antígeno de NA debe tenerse en cuenta para el diseño de futuras vacunas antigripales.

En conclusión, la vacunación antigripal estacional produjo seroconversión homóloga frente a la NA del subtipo A(H1N1)pdm09 en más de la mitad de los individuos, y además seroconversión heteróloga frente a la NA de todas las cepas del subtipo A(H1N1) clásico en aproximadamente una cuarta parte de la población analizada. Esta respuesta serológica a la vacunación demuestra que las vacunas estacionales actuales, sin una cantidad estandarizada de NA, inducen respuestas homólogas y heterólogas de producción de Acs frente a la NA. Por otra parte, esa respuesta post-vacunal de Acs anti-NA fue diferente en función del grupo etario considerado, demostrando que el efecto *booster* de la vacunación es mayor frente a las cepas que probablemente primoinfectaron a los individuos, consecuencia de un efecto relacionado con el pecado original antigénico descrito para la HA, siendo la primera vez que se demuestra para la NA en población europea.

- **Estudio de Acs anti-NA post-vacunales en función de la temporada vacunal y del grupo etario.**

En este epígrafe se analizó la respuesta inducida por la vacuna en las dos campañas vacunales estudiadas, tanto en adultos como en mayores de 65 años. Cabe recordar que los dos grupos de adultos comparados en este trabajo se vacunaron con dos vacunas distintas, ya que durante la temporada 2013-14 recibieron una vacuna inactivada fraccionada preparada en cultivo de huevos embrionados de gallina, mientras que en la temporada 2014-15 el grupo de adultos se inmunizó con una vacuna inactivada de antígenos de superficie preparada en cultivos celulares.

Los resultados de este estudio muestran que la vacuna de antígenos de superficie preparada en cultivo celular (temporada 2014-2015) indujo una seroconversión homóloga significativamente superior (TSC: 65,0%) frente a la NA de la cepa pandémica A/California/07/2009 (pdm09), con respecto a la vacuna de tipo fraccionada administrada en los adultos vacunados en la campaña vacunal 2013-2014 (TSC: 40,0%). No obstante, cuando se analizó la respuesta a la vacunación en términos de RIC, ambos tipos de vacuna mostraron una respuesta serológica similar (RIC; huevo embrionado=3,4; cultivo celular=3,5). La TSP pre-vacunal tomando como correlato de seroprotección un título de Acs anti-NA $\geq 1/40$, fue similar en las dos poblaciones vacunadas en distintas campañas vacunales, y mayor en la campaña vacunal 2014-2015 cuando se tomó un correlato de $\geq 1/80$. A pesar de esta mayor seroprotección basal de la población adulta reclutada en la campaña vacunal 2014-2015, la vacuna celular logró una TSC mayor que la producida en huevos embrionados.

Desconocemos las causas de por qué esta respuesta serológica homóloga frente a la NA del subtipo pandémico fue superior cuando se vacunó con vacuna celular. Sin embargo, la mayor respuesta de la vacuna celular demostrada en este trabajo ofrece ciertas ventajas en comparación con la producida en huevo embrionado debido a la naturaleza de estas vacunas. Las vacunas producidas en cultivo celular permiten que los virus vacunales no experimenten tantas variaciones antigénicas como sí ocurren en el cultivo en embrión de pollo (93). Estas variaciones suceden como consecuencia de que el virus vacunal, aislado del ser humano, debe adaptarse a las células aviares del huevo, lo que selecciona cierto tipo de mutaciones de adaptación a este soporte biológico (94,170). De este modo, los virus cultivados en líneas celulares de mamíferos pueden ser más parecidos a los virus humanos salvajes (170), lo que favorecerá una mayor efectividad de la vacuna.

Ante la disponibilidad de estas dos vacunas producidas en soportes biológicos diferentes, nuestros datos demuestran que el uso de vacuna celular es más ventajoso para los individuos adultos frente al subtipo pandémico A(H1N1). Aparte de la mayor concordancia antigénica entre los virus vacunales y salvajes utilizando soportes celulares para la fabricación de la vacuna celular, ésta tiene otras ventajas que se muestran a continuación. En primer lugar, la fabricación de la vacuna celular requiere

de líneas celulares fáciles de manejar, escalar y requieren una logística menor que el uso de huevos embrionados de gallina (95,96). Además, se evita que en casos de mortalidad de gallinas por enfermedades infecciosas existan desabastecimientos de huevos embrionados. En segundo lugar, la producción de vacuna en líneas celulares es mucho más rápida, y no requiere de varios meses para su fabricación como si sucede con los huevos embrionados, por lo que los virus vacunales podrían ser seleccionados mucho más tarde, siendo más concordantes con los virus salvajes que circularan en la siguiente temporada gripal.

En relación con la respuesta heteróloga de Acs anti-NA tras la vacunación en la población adulta frente a cepas del subtipo A(H1N1) clásico, los datos de este estudio muestran que tanto la vacuna elaborada en embrión de pollo (temporada 2013-2014) como la vacuna preparada en cultivo celular (temporada 2014-2015) indujeron una respuesta serológica similar en términos de TSC y RIC de As anti-NA frente a la mayoría de las cepas analizadas del subtipo A(H1N1) clásico. A este respecto, se observaron únicamente dos excepciones. En primer lugar, la vacuna elaborada en embrión de pollo indujo una seroconversión heteróloga superior (TSC: 17,5%) frente a la NA de la cepa A/PR/8/1934 con respecto a la vacuna celular (TSC: 0,0%). En segundo lugar, la vacuna celular indujo una respuesta heteróloga significativamente superior frente a la cepa A/Weiss/1943 (TSC: 52,5% y RIC: 3,4) con respecto a la vacuna de tipo fraccionada (TSC: 10,0% y RIC: 1,6). Dado que la media de edad de las dos cohortes de adultos analizadas es similar, en opinión del autor de este trabajo estas diferencias en la respuesta serológica frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/Weiss/43 tras la vacunación se deben a varios factores, como las vacunaciones previas de la población adulta y la memoria inmunológica particular de estas dos poblaciones, no pudiendo sólo atribuirse a las diferentes vacunas utilizadas. En general, salvo estas dos excepciones frente a las cepas clásicas más antiguas, el uso de vacuna fabricada en huevos embrionados o en cultivo celular no induce respuestas heterotípicas diferentes frente a virus A(H1N1) clásicos.

En relación con el grupo de mayores de 65 años, esta población fue vacunada en las dos temporadas con el mismo tipo de vacuna adyuvada. Sin embargo, la cohorte reclutada en la temporada 2014-2015 tenía una media de edad significativamente

mayor (81,2 años) que en la temporada 2013-2014 (76,0 años), lo que puede haber repercutido en la respuesta serológica a la vacunación. Los datos de este estudio mostraron que la vacunación con vacuna adyuvada indujo una mayor RIC de la MGTs frente a la cepa pandémica vacunal en la cohorte de la temporada 2013-2014 (RIC:3,6) que en la cohorte 2014-2015 (RIC:3,0), siendo la población de la temporada 2013-2014 más joven dentro de los mayores de 65 años. Estos datos parecen mostrar que la mayor edad de la cohorte de la temporada 2014-2015 parece haber influido negativamente en la respuesta homóloga a la vacunación. La menor respuesta serológica a las vacunas en población de edad avanzada ya se ha descrito anteriormente, tanto frente a virus estacionales como antiguos y aviares (100). Este aspecto ha de ser tenido en cuenta a la hora de diseñar futuras vacunas de gripe, las cuales deben encontrar formas de proteger a los más mayores, incluso mejor que los más jóvenes de su propio grupo etario.

Por otra parte, cuando se comparó la respuesta heteróloga frente a cepas del subtipo clásico A(H1N1) tras la vacunación en mayores de 65 años, los datos de este estudio mostraron que la vacuna adyuvada indujo una mayor seroconversión y RIC en la población más envejecida (temporada 2014-2015) frente a las cepas A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007. Esta observación contrasta con el fenómeno de inmunosenescencia descrito con anterioridad. Sin embargo, estas diferencias en la respuesta pueden explicarse observando los títulos medios de ambas poblaciones antes de la vacunación. Las MGTs pre-vacunales en la cohorte de mayores de 65 años para la temporada 2013-2014 eran muchos más elevadas, de modo que es más difícil elevar el título de Acs tras la vacunación con respecto a otra población que posee un menor título basal. Esto puede evitar que la TSC y RIC sea tan elevada, haciendo un sesgo que dificulte la interpretación de estos datos.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que la vacuna de antígenos de superficie preparada en cultivo celular produjo una seroconversión homóloga superior frente a la NA del subtipo A(H1N1)pdm09 con respecto a la vacuna de tipo fraccionada, ambas administradas en adultos. La vacuna celular también produjo una respuesta heteróloga superior frente a la NA de dos cepas clásicas, A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943.

- **Eficacia serológica de la respuesta homóloga y heteróloga a la vacuna en términos de producción de Acs anti-NA.**

En el presente trabajo, para la evaluación de la eficacia en la respuesta serológica a la vacuna en términos de Acs anti-NA, se evaluaron la TSP, TSC y RIC de la media geométrica de los títulos de Acs anti-NA siguiendo los mismos *cut-offs* establecidos por la EMA para el estudio de Acs hemaglutinantes tras la vacunación antigripal (117,119,130). Para evaluar la eficacia serológica de la vacuna, la EMA considera que si tras la vacunación se cumple uno de los tres criterios evaluados, la vacunación es serológicamente eficaz. Sin embargo, para este trabajo se ha realizado una valoración conjunta de los tres parámetros (117), ya que por ejemplo, los valores tan elevados de la TSP pre-vacunal observada frente a la NA de la mayoría de las cepas gripales analizadas podrían estar sobreestimando mediante este análisis la eficacia de las vacunas utilizadas. Algunos autores aclaran además que la evaluación de la RIC y la TSC en solitario pueden infraestimar la inmunogenicidad de la vacuna, y sin embargo, la TSP puede sobreestimar ésta.

Los resultados de este trabajo mostraron que en los dos rangos etarios poblacionales analizados y en ambas temporadas, la vacunación estacional frente al subtipo A(H1N1)pdm09 logró superar los valores umbral de eficacia vacunal para los tres parámetros EMA (TSP, TSC y RIC) frente a la cepa A/California/07/2009, demostrando que la vacuna produjo una respuesta serológica homóloga eficaz frente a la NA del subtipo A(H1N1) pandémico. Una observación a este respecto es que para considerar que la vacunación fue serológicamente eficaz, en este trabajo se emplearon los mismos requerimientos EMA establecidos para el estudio de Acs hemaglutinantes (117,119,130) ante la falta de consenso de correlatos de seroprotección para la NA por el momento. Con esta razón, se plantea la necesidad de establecer parámetros de la EMA específicos para la NA al considerar este antígeno como un nuevo objetivo o diana vacunal.

En lo que respecta a la respuesta serológica heteróloga inducida por la vacuna, cabe destacar que se cumplieron varios de los criterios EMA frente a varias cepas del

subtipo A(H1N1) estacional analizadas, observándose en mayor medida en el grupo de ≥ 65 años.

Tras la vacunación de la cohorte poblacional de mayores de 65 años, la TSP y RIC (temporada 2013-2014) y la TSP, TSC y RIC (temporada 2014-2015) superaron el valor umbral EMA frente a la cepa estacional A/Brisbane/59/2007. También frente a la cepa clásica A/Brazil/11/1978, la vacunación en mayores de 65 años en la temporada 2014-2015 elevó la TSP y RIC, superando los valores de corte EMA. El origen de esta respuesta post-vacunal de Acs anti-HA frente a las cepas comentadas anteriormente ya ha sido justificada en apartados anteriores. Los datos de este trabajo muestran que la vacuna adyuvada administrada a la población mayor de 65 años indujo una respuesta heteróloga eficaz frente a la NA de dos de las cepas antiguas del subtipo A(H1N1).

En relación con la población adulta (15-64 años), la vacunación estacional consiguió superar los valores umbrales EMA para los tres parámetros (TSP, TSC y RIC) únicamente frente a la cepa estacional A/Weiss/1943 en la cohorte vacunada en la temporada 2014-2015. Como se ha comentado en el epígrafe anterior, la vacuna inactivada de tipo fraccionado y de elaboración en embrión de pollo no fue serológicamente eficaz en términos de TSC ni RIC en la cohorte poblacional de la temporada 2013-2014. Esta diferencia ya ha sido justificada en el apartado anterior de acuerdo con el tipo diferente de vacuna inactivada administrada en cada una de estas cohortes poblacionales.

La aplicación de los criterios EMA es un paso fundamental para comprobar que la vacuna antigripal administrada haya sido eficaz frente a la cepa vacunal (en este caso fue la cepa pandémica A/California/07/2009), pero además permite evaluar la respuesta serológica heteróloga post-vacunal frente a diferentes cepas gripales pertenecientes a un mismo subtipo (34,127) o frente a otros subtipos gripales (128,129), como es el caso evaluado en el presente trabajo sobre la respuesta cruzada de Acs anti-NA entre cepas del subtipo A(H1N1) estacional y A(H1N1)pdm09. No obstante, como se ha descrito con anterioridad, los valores tan elevados de la TSP pre-vacunal observada frente a la NA de la mayoría de las cepas gripales analizadas podrían estar sobreestimando mediante este análisis la eficacia de las vacunas utilizadas. Los elevados títulos de Acs NA pre-vacunales encontrados en la población hacen necesario

establecer parámetros EMA específicos para la NA al considerar este antígeno como un nuevo objetivo o diana vacunal.

En conclusión, aplicando los tres criterios EMA, la vacunación estacional fue serológicamente eficaz en términos de Acs anti-NA frente al subtipo A(H1N1) pandémico en ambos grupos etarios y temporadas analizadas. La vacuna adyuvada administrada en mayores de 65 años produjo además una respuesta heteróloga eficaz frente a dos de las cepas gripales del subtipo A(H1N1) clásico analizadas, concretamente A/Brisbane/59/2007 y A/Brazil/11/1978.

Estudio de la respuesta serológica mediada por Acs anti-HA

El estudio de la respuesta serológica de Acs anti-HA en la población antes y después de su vacunación antigripal permitió conocer el estado de seroprotección basal de la población analizada así como la respuesta de producción de Acs tras la administración de la vacuna antigripal. Se evaluó la presencia de Acs pre-vacunales y la respuesta tras la vacunación de la población frente a la cepa gripal A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1), cepa incluida en las vacunas administradas, pero además se evaluó la respuesta frente a cepas del subtipo A(H1N1) clásico no incluidas en esta vacuna.

Estudio de Acs anti-HA previos a la vacunación

En el estudio de la inmunidad previa en una población frente a virus de la gripe se han evaluado tradicionalmente los títulos de Acs anti-HA (62,105,106). Con el estudio del análisis pre-vacunal se pretende conocer el grado de seroprotección e inmunización de una población frente a determinados virus de la gripe. En este epígrafe se estudia la presencia de Acs anti-HA pre-vacunales observados en la población en función de los grupos etarios y de las campañas vacunales analizados.

Los datos de este trabajo muestran la presencia de Acs anti-HA pre-vacunales a título protector ($\geq 1/40$) en tres de cada cuatro individuos frente al subtipo A(H1N1)pdm09. Por otra parte, la tasa de seroprotección (TSP) observada en la población frente a las cepas analizadas del subtipo A(H1N1) clásico fue menor que frente al virus pandémico. Como anotación a destacar, los valores más bajos de TSP pre-vacunal fueron los observados frente a aquellas cepas estacionales de circulación más antigua (TSP de 12,5% y 19,4% frente a las cepas A/Weiss/1943 y A/PR/8/1934, respectivamente), mientras que se observó un aumento en el valor de la TSP pre-vacunal a medida que la cepa estacional estudiada era de circulación más reciente. La mayor TSP pre-vacunal observada fue frente la cepa A/Brisbane/59/2007 (TSP: 53,1%).

El origen de estos Acs puede deberse a varios factores. Por un lado, la presencia de estos Acs puede ser debida a infecciones pasadas causadas por las diferentes cepas del subtipo A(H1N1) y del subtipo A(H1N1)pdm09, o a vacunaciones anteriores donde estuvieran presentes algunas de estas cepas. En este supuesto, los Acs anti-HA observados en este trabajo estarían presentes en estos individuos desde la exposición a estas cepas, manteniéndose como fruto de la memoria inmunológica (154,155).

Otra de las posibles causas de la presencia de estos Acs anti-NA es que estos sean consecuencia de respuestas heterotípicas de Acs frente a cepas del mismo subtipo A(H1N1), debido a vacunaciones anteriores o exposiciones naturales a cepas relacionadas antigénicamente con los virus analizados. El análisis filogenético de este estudio mostró que la homología genética de la HA (H1) de todas las cepas A(H1N1) analizadas fue superior al 84%, y superior al 67% con respecto al subtipo A(H1N1)pdm09. Esta homología genética provoca que ciertas partes de los antígenos se encuentren más conservadas entre diferentes cepas, y puedan ser objetivo de un mismo tipo de Acs (14,109,154,155).

Las reacciones heterotípicas entre diferentes cepas de virus de la gripe, o incluso entre diferentes subtipos es frecuente. Existen trabajos que demuestran la existencia de respuestas cruzadas de Acs frente a la HA de diferentes virus dentro de un mismo subtipo o entre diferentes subtipos (47,100,105,141,142). Esto justifica que los resultados observados en el presente trabajo puedan ser debidos a respuestas heterólogas frente a la HA, lo que según la literatura parece frecuente entre HAs tipo H1 (155).

A tenor de los resultados observados sobre los títulos de Acs anti-HA en la población, parece probable que en el origen de estos Acs pre-vacunales estén implicadas ambas hipótesis antes descritas, tanto la memoria inmunológica como las respuestas heterotípicas. No obstante, para analizar de forma más pormenorizada las posibles explicaciones de la presencia de estos Acs es necesario realizar un análisis por grupo etario, el cual se comenta en el siguiente epígrafe.

- **Estudio de Acs anti-HA pre-vacunales en función del grupo etario.**

Analizando la presencia de Acs anti-HA pre-vacunales en función de los distintos grupos de edad, adultos (15-64 años) y mayores de 65 años, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de individuos con títulos protectores ($\geq 1/40$) frente a la mayoría de las cepas gripales del subtipo A(H1N1) estacional. Cada una de estas diferencias va a ser debidamente justificada a continuación. Frente al virus pandémico A/California/07/2009, la TSP pre-vacunal fue similar entre ambos grupos etarios.

En primer lugar, cabe destacar el pequeño porcentaje de población joven-adulta con títulos de Acs anti-HA protectores frente a cepas muy antiguas, como fueron las cepas A/PR/8/1934 (12,5%) y A/Weiss/1943 (6,5%). Este grupo de adultos (15-64 años) presentaron una media de edad de 50,8 años, por lo que no han podido estar en contacto con estos virus durante su circulación en la década de 1930 y 1940. La presencia de estos Acs anti-HA a títulos protectores en este grupo de población es probable que sea fruto de respuestas heterotípicas frente a otras cepas del mismo subtipo A(H1N1) clásico, e incluso del subtipo A(H1N1)pdm09. Esta respuesta heterotípica de Acs anti-HA puede haber sucedido gracias a la similitud genética que comparte el gen de la hemaglutinina de cada una de las diferentes cepas gripales del subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 incluidas en el estudio, aspecto ya comentado en el epígrafe anterior.

La TSP pre-vacunal frente a la cepa A/FM/1/1947 fue diferente entre los distintos grupos etarios. Frente a esta cepa, la población joven-adulta mostró una TSP pre-vacunal moderada (48,8%), incluso mayor que en mayores de 65 años (30,0%). Es evidente que por la edad de los individuos adultos, ninguno pudo estar en contacto con esta cepa durante su circulación. Sin embargo, los individuos más mayores de este grupo sí que pudieron estar en contacto con cepas A(H1N1) clásicas circulantes durante la década de 1950 y que eran descendientes de la cepa A/FM/1/1947, pudiendo ser los Acs detectados fruto de reacciones heterotípicas por estos virus circulantes durante la década de 1950. Por otro lado, en aquellos individuos de este grupo etario de adultos que nacieron tras la extinción del subtipo A(H1N1) en 1957 (43), su primer contacto con el subtipo A(H1N1) probablemente sucedió con virus

derivados de la cepa A/USSR/90/77, que fue la cepa del subtipo A(H1N1) clásico que re-emergió en 1977 (44). La cepa A/Brazil/ 11/1978, estrechamente emparentada con A/USSR/90/77, guarda una homología genética con la cepa A/FM/1/1947 de más del 95%. Siguiendo este razonamiento, los Acs observados a títulos protectores frente a la cepa A/FM/1/1947 podrían proceder tanto de reacciones heterotípicas por virus circulantes en la década de 1950 como de los virus relacionados con la re-emergencia del subtipo A(H1N1) clásico en la década de 1970.

Frente a la cepa A/Brisbane/59/2007, la población joven-adulta mostró una TSP pre-vacunal (66,3%) mayor que en mayores de 65 años (40,0%). Por edad resulta evidente que incluso la población más joven pudo haber estado expuesta a la circulación de este virus, lo que parece una justificación plausible a la presencia de Acs frente a esta cepa en ambos segmentos etarios de la población. Por otro lado, la menor TSP observada en el grupo de mayores de 65 años se puede justificar con la inmunosenescencia propia de los individuos de mayor edad, en comparación con la inmunocompetencia de los adultos (158–162). La inmunosenescencia de los individuos mayores de 65 años, y sobre todo de aquellos mayores de 85 años , es un proceso que impacta negativamente en el desarrollo del sistema inmune y en su funcionamiento (158–160). 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 (88,161).

La evaluación de la inmunidad preexistente de ambos grupos de edad también se analizó mediante el estudio de la MGT pre-vacunal. Los datos analizados en este trabajo mostraron diferencias significativas en las MGTs en relación con el grupo etario frente a todas las cepas gripales incluidas en el estudio.

Los individuos ≥ 65 años presentaron una MGT de Acs anti-HA significativamente mayor frente a las cepas clásicas A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943, mientras que en el grupo de adultos la MGT de Acs anti-HA fue significativamente mayor frente a las cepas clásicas A/FM/1/1947, A/Brazil/11/1978 y A/Brisbane/59/2007, y también frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo pandémico.

Las diferencias observadas en la magnitud de los títulos pre-existentes de Acs anti-HA entre ambos grupos etarios frente a cepas del subtipo A(H1N1) clásico pueden ser consecuencia de las primeras exposiciones o contactos con virus de la gripe a lo largo de la vida de un individuo, fenómeno anteriormente descrito y conocido como pecado original antigénico (77–80,169). En este contexto, las primeras veces en las que un individuo se expone a virus de la gripe pueden condicionar las siguientes interacciones con otros virus gripales, del mismo o de otros subtipos. Así se observa en los datos de este trabajo en los que los mayores de 65 años muestran los mayores títulos frente a los virus más antiguos, mientras que los individuos más jóvenes muestran los mayores títulos frente a las cepas más actuales, frente a las cuales probablemente se primoinfectaron.

Frente al subtipo pandémico el valor más elevado de las MGTs de Acs anti-HA pre-vacunales se observó en el grupo de individuos de 15-64 años, siendo esta MGT el doble de la observada en mayores de 65 años. La aparición del subtipo pandémico es muy reciente (año 2009) por lo que en este caso la hipótesis del pecado original antigénico no parece ser la opción más plausible que explique estos datos. En este caso, la inmunosenescencia en los individuos de mayor edad pueda haber contribuido a una menor MGTs pre-vacunales, en comparación con la inmunocompetencia de los adultos (158–162).

En conclusión, los datos de este trabajo representan un reflejo de la memoria inmunológica de la población y su correlación con la edad y las primeras exposiciones a virus de la gripe durante la vida del individuo. Los mayores de 65 años muestran mayores títulos HA frente a los virus más antiguos del subtipo A(H1N1), mientras que los individuos adultos muestran los mayores títulos frente a las cepas clásicas A(H1N1) más actuales, coincidiendo con las cepas que probablemente primo-infectaron a estos individuos.

- **Estudio de Acs anti-HA pre-vacunales en función de la temporada vacunal y del grupo etario.**

La media de edad del grupo de adultos (15-64 años) fue similar entre las diferentes temporadas vacunales analizadas permitiendo así la creación de subgrupos poblacionales homogéneos para su comparación. Los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas en la TSP pre-vacunal en adultos entre las dos cohortes vacunales analizadas (2013-14 y 2014-15) frente a ninguna de las cepas gripales de los subtipos A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

En el grupo ≥ 65 años, la media de edad observada en este grupo sí fue significativamente diferente entre las temporadas vacunales analizadas, oscilando desde los 76,0 años (temporada 2013-14) hasta los 81,2 años (temporada 2014-15). Sin embargo, no se observaron diferencias en la proporción de individuos seroprotectidos frente a ninguna de las cepas gripales analizadas de los subtipos A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 entre las dos temporadas estacionales consideradas 2013-14 y 2014-15. Este resultado es relevante puesto que es presumible que la segunda población mayor de 65 años, perteneciente a la temporada 2014-2015, mostrara una menor TSP pre-vacunal debido a la inmunosenescencia. Sin embargo esto no fue observado en los datos de este estudio.

Estudio de Acs anti-HA tras la vacunación

En el presente trabajo se estudió la presencia de Acs anti-HA observados tras la administración de la vacuna estacional en la población. Para la evaluación de la respuesta inmune humoral homóloga y heteróloga a la vacuna trivalente estacional en términos de Acs anti-HA frente a los virus gripales analizados, se han utilizado fundamentalmente los siguientes parámetros: tasa de seroprotección (TSP), tasa de seroconversión (TSC) y el análisis de la media geométrica de los títulos (MGT). Para el análisis de la eficacia vacunal según los criterios EMA se estudiaron los parámetros

anteriormente considerados además de la razón de incremento de la media geométrica de los títulos (RIC).

- **Estudio del efecto de la vacuna trivalente estacional sobre la generación de Acs anti-HA en función del grupo etario.**

Los resultados de este trabajo muestran que las vacunas estacionales son capaces de reforzar la seroprotección en adultos y mayores de 65 años frente al subtipo A(H1N1)pdm09, pero además frente a cepas clásicas del subtipo A(H1N1) que no circulan desde varias décadas. Este refuerzo de la seroprotección podría favorecer al resto de la población mediante la inmunidad de grupo ante la re-emergencia de cepas clásicas o similares a éstas. Tras la vacunación antigripal se observó un aumento en la TSP en ambos grupos etarios frente a todas las cepas analizadas. La TSP post-vacunal fue superior al 18% en adultos y al 26% en el grupo ≥ 65 frente a los subtipos A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. El aumento de la TSP post-vacunal con respecto a la pre-vacunal fue significativo en ambos grupos etarios frente a todas las cepas analizadas, con excepción del grupo de individuos de 15-64 años frente a la cepa A/Weiss/1943.

La vacunación estacional con el subtipo A(H1N1)pdm09 produjo respuestas homólogas y heterólogas en términos de seroconversión de los títulos de Acs anti-HA frente a los subtipos A(H1N1) y A(H1N1)pdm09, siendo estas significativas en ambos grupos etarios. Estas respuestas heterotípicas son interesantes porque muestran que tanto en adultos como en mayores de 65 años las vacunas estacionales actuales inducen la producción de Acs anti-HA frente a virus recientes y antiguos del subtipo A(H1N1) clásico.

Esta seroconversión heteróloga fue de similar magnitud frente a todas las cepas A(H1N1) clásicas en adultos, rondando una TSC de entre 7,5% y 8,8%, a excepción de la cepa A/Weiss/1943, frente a la que la seroconversión no fue significativa. En mayores de 65 años la TSC fue diferente en función de la cepa analizada, variando desde una TSC del 7,5% frente a la cepa A/Weiss/1943 hasta un 22,5% frente a la cepa A/Brisbane/59/2007, no hayándose significación frente a la cepa A/Brazil/11/1978. Por su parte, la respuesta homóloga a la vacuna frente a la cepa A/California/07/2009

(pdm09) produjo seroconversión homóloga en más del 40% de los individuos en ambos grupos etarios. Cabe destacar la excelente inmunización inducida frente a este subtipo en los mayores de 65 años (TSC=45%), siendo incluso superior que en el grupo de adultos (TSC=40%). Estos resultados muestran que las vacunas estacionales son capaces de producir respuestas heterotípicas en una magnitud muy similar entre adultos y mayores de 65 años a pesar de la inmunosenescencia de estos últimos. En este sentido, es necesario recordar que la vacuna administrada a los mayores de 65 años fue vacuna adyuvada, teniendo en cuenta que es una de las estrategias actuales para mitigar el efecto de la inmunosenescencia mediante el uso de adyuvantes, mientras que los adultos recibieron vacunas de tipo inactivado fraccionadas y de antígenos de superficie.

Las MGTs de Acs anti-HA tras la vacunación estacional se triplicaron tanto en adultos como en mayores de 65 años con respecto a las MGTs observadas antes de la vacunación frente a la cepa pandémica A/California/07/2009, cepa que estaba incluida en las vacunas trivalentes estacionales administradas en esta población. Además, la vacunación indujo un incremento en menor medida en las MGTs frente a la HA de la mayoría de cepas gripales analizadas del subtipo A(H1N1) estacional. Esto demuestra la capacidad de la vacuna estacional de elevar los títulos de Acs contra la HA de otros virus gripales, confiriendo así una protección heteróloga, en este caso, frente a cepas clásicas del subtipo A(H1N1) que llevan sin circular en la población más de 60 años (A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947) y otras más recientes desde su reaparición en 1977.

La comparación de las MGTs post-vacunales en función de los dos grupos etarios mostraron diferencias interesantes que merecen ser comentadas. En el grupo de adultos (15-64 años), las MGTs post-vacunales fueron significativamente más elevadas frente a las cepas A/FM/1/1947, A/Brazil/11/1978, A/Brisbane/59/2007 y A/California/07/2009 con respecto a las MGTs observadas en el grupo de mayores de 65 años. Por otro lado, en el grupo de mayor edad, las MGTs fueron significativamente más elevadas frente a las cepas clásicas A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943 con respecto a las observadas en el grupo de adultos.

La cepa estacional frente a la cual los individuos adultos mostraron la MGT de Acs anti-HA más elevada fue frente a A/Brazil/11/1978. Por otro lado, en el grupo de mayor edad, las MGTs fueron significativamente más elevadas frente a las cepas clásicas A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943 con respecto a las observadas en el grupo de adultos. Teniendo en cuenta la media de edad de cada grupo etario, los resultados de este estudio muestran que tras la vacunación se produjo una respuesta humoral de una forma más acusada frente a las cepas que más probablemente primo-infectaron a cada grupo de individuos. Este fenómeno inmunológico notable que se produce sobre el primer virus que infectó a un individuo, descrito por diversos autores como “pecado original antigénico” (78–82), tiene sin duda repercusión en la respuesta humoral frente a virus de la gripe, y despierta un especial interés en la formulación de vacunas futuras en las que se pretende obtener una respuesta más amplia.

Cabe destacar que en el grupo de menor edad, la generación de altos títulos de Acs anti-HA frente al virus A/FM/1/1947 tras la vacunación es probablemente fruto de reacciones cruzadas. Estos individuos adultos presentaron una media de edad de 50,8 años, por lo que es probable que los primeros contactos con virus de la gripe se dieran con cepas que circularan a partir de los años 60 y 70, y quizás en los más mayores de este grupo frente a cepas circulantes en la década de 1950. La presencia de Acs anti-HA frente a cepas anteriores debe ser fruto, por tanto, de una respuesta heterotípica entre cepas del mismo subtipo A(H1N1) debido a la gran homología genética comentada anteriormente de la proteína HA evaluada entre las diferentes cepas del subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 (171,172).

Después de la vacunación se observó una menor inmunización en términos de RIC de la media geométrica de los títulos de Acs anti-HA en el grupo de adultos frente al virus A/Brisbane/59/2007 y frente al virus pandémico A/California/07/2009 en comparación con el grupo ≥ 65 años. Estos datos de la razón de incremento confrontan con lo esperable para una población en la que la inmunosenescencia puede disminuir la respuesta a las vacunas. Sin embargo, esta respuesta puede explicarse observando los títulos medios de ambas poblaciones antes de la vacunación. Las MGTs prevacunales en el grupo de adultos frente a estas dos cepas eran más elevadas que en los mayores de 65 años, de modo que es más difícil elevar el título de Acs con respecto a

otra población que posee un menor título basal. Esto puede evitar que la RIC sea tan elevada, haciendo un bias que dificulte la interpretación de estos datos.

Como ya se ha descrito con anterioridad en este trabajo, el estudio de la respuesta humoral tras la vacunación puede servir para conocer la capacidad de la vacuna antigripal de inducir la producción de Acs heterotípicos en la población frente a cepas gripales dentro de un mismo subtipo (34,127) o frente a otros subtipos (128,129). En consonancia con los datos de este trabajo, estudios previos matizaron que tras la vacunación de una población mayor de 65 años ocurrían respuestas humorales heterólogas frente a virus de la gripe no incluidos en la vacuna estacional, como algunos de los virus de gripe aviar A(H5N1) y A(H9N2), frente a los cuales dicha población jamás haya estado expuesta (100). La existencia de estas respuestas cruzadas entre virus gripales dentro de un mismo subtipo (34,127) o frente a otros subtipos (128,129) sienta las bases para el diseño de futuras vacunas universales cuyo objetivo es conferir protección amplia y duradera frente a la mayor parte de los tipos y subtipos de gripe.

En resumen, la respuesta humoral homóloga tras la vacunación fue significativa en ambos grupos etarios frente al subtipo A(H1N1)pdm09. Cabe destacar la excelente inmunización inducida frente a este subtipo en los mayores de 65 años. La vacunación estacional anual también indujo una interesante respuesta humoral heteróloga en términos de seroprotección y seroconversión de los títulos de Acs anti-HA frente a cepas del subtipo A(H1N1) estacional en ambos grupos etarios.

- **Estudio de Acs anti-HA post-vacunales en función de la temporada vacunal y del grupo etario.**

Del mismo modo en que se evaluó el estudio de los Acs anti-NA post-vacunales, en este epígrafe se evaluó el efecto de la vacunación estacional antigripal sobre la generación de Acs anti-HA en función del grupo etario y de la temporada vacunal. Para una correcta discusión de los resultados, cabe recordar los tipos de vacunas administradas en ambos grupos etarios y en las distintas temporadas vacunales

reclutadas. Los dos grupos mayores de 65 años fueron vacunados en las dos temporadas con la misma vacuna adyuvada. Sin embargo, los dos grupos de adultos comparados en este trabajo se vacunaron con dos vacunas distintas, ya que durante la temporada 2013-14 recibieron una vacuna inactivada fraccionada preparada en cultivo de huevos embrionados de gallina, mientras que en la temporada 2014-15 el grupo de adultos se inmunizó con una vacuna inactivada de antígenos de superficie preparada en cultivo celular. Esta diferencia en el tipo de vacuna administrada se tuvo en cuenta en la comparación entre las dos temporadas estudiadas en las que estén implicados los dos grupos de adultos.

Los resultados de este estudio muestran que la vacuna preparada en cultivo celular (temporada 2014-2015) indujo una seroconversión homóloga y una RIC significativamente superiores (TSC: 57,5%; RIC: 3,9) frente a la HA de la cepa vacunal A/California/07/2009 (pdm09) con respecto a la vacuna elaborada en huevo administrada en la cohorte poblacional adulta de la temporada 2013-2014 (TSC: 25,0%; RIC: 2,2). Teniendo en cuenta que los dos grupos de adultos presentaban una media de edad similar, esta mayor respuesta serológica de Acs atribuible a la vacuna preparada en cultivo celular puede justificarse como consecuencia de la ventaja que ofrece este tipo de vacunas. Las vacunas producidas en cultivo celular permiten que los virus vacunales no experimenten tantas variaciones antigénicas como sí ocurren en el cultivo en embrión de pollo (93). Estas variaciones suceden como consecuencia de que el virus vacunal, aislado del ser humano, debe adaptarse a las células aviares del huevo, lo que selecciona cierto tipo de mutaciones de adaptación a este soporte biológico (94). De este modo, los virus cultivados en líneas celulares de mamíferos pueden ser más parecidos a los virus humanos salvajes (95,96), lo que favorecerá una mayor efectividad de la vacuna. Ante la disponibilidad de estas dos vacunas producidas en soportes biológicos diferentes, nuestros datos demuestran que el uso de vacuna celular es más ventajoso para los individuos adultos frente al subtipo pandémico A(H1N1).

En relación con la respuesta heteróloga de Acs anti-HA tras la vacunación en la población adulta frente a cepas del subtipo clásico A(H1N1), los datos de este estudio muestran que tanto la vacuna elaborada en embrión de pollo (temporada 2013-2014)

como la vacuna preparada en cultivo celular (temporada 2014-2015) indujeron una respuesta serológica similar en términos de TSC y RIC de As anti-HA frente a la mayoría de las cepas analizadas del subtipo A(H1N1) clásico, con la única excepción de la cepa A/PR/8/1934. Frente a dicha cepa, la vacuna fraccionada elaborada en huevo indujo una respuesta heteróloga significativamente superior (TSC: 17,5% y RIC: 1,8) con respecto a la vacuna preparada en cultivo celular (TSC: 0% y RIC 1,1). Dado que la media de edad de las dos cohortes de adultos analizadas es similar, en opinión del autor de este trabajo esta diferencia en la respuesta serológica frente a la cepa A/PR/8/1934 tras la vacunación se debe a varios factores, como las vacunaciones previas de la población adulta y la memoria inmunológica particular de estas dos poblaciones, no pudiendo sólo atribuirse a las diferentes vacunas utilizadas. En general, salvo esta excepción frente a la cepa clásica más antigua, el uso de vacuna fabricada en huevos embrionados o en cultivo celular no induce respuestas heterotípicas diferentes frente a virus A(H1N1) clásicos.

En relación con el grupo de mayores de 65 años incluidos en este estudio, esta cohorte fue vacunada en las dos temporadas analizadas con el mismo tipo de vacuna adyuvada. A pesar de que la media de edad de los individuos incluidos en este estudio fue significativamente superior en la temporada 2014-2015 (81,2 años) que en la temporada 2013-2014 (76,0 años), la respuesta serológica de Acs anti-HA a la vacunación fue similar en ambas cohortes poblacionales frente a las cepas gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09.

En conclusión, la vacunación en adultos mediante vacuna elaborada en cultivo celular produjo una mayor respuesta serológica homóloga de Acs anti-HA frente al subtipo A(H1N1)pdm09 con respecto a la vacuna elaborada en huevo. Ambos tipos de vacuna inducen además respuestas heterólogas en menor medida frente a cepas del subtipo A(H1N1) clásico, no mostrándose en general respuestas muy diferentes entre ambos tipos de vacuna, salvo para la cepa más antigua analizada en este trabajo. En mayores de 65 años, la respuesta serológica de Acs anti-HA a la vacunación con vacuna adyuvada fue similar en ambas temporadas vacunales.

- **Eficacia serológica de la respuesta homóloga y heteróloga a la vacuna en términos de producción de Acs anti-HA.**

Con objeto de evaluar la respuesta homóloga y heteróloga a la vacuna trivalente estacional frente a los virus gripales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09, se evaluaron los parámetros descritos por la EMA: tasa de seroprotección (TSP), tasa de seroconversión (TSC) y Razón de Incremento de la media geométrica de los títulos (RIC) (117,119,130). Cumplir estos requisitos establecidos por la EMA sirven para evaluar si la vacuna antigripal administrada ha sido o no eficaz en términos serológicos frente a distintos virus de la gripe. La EMA establece como requisito que una vacuna es eficaz cuando cumple como mínimo uno de los tres requisitos establecidos (119,130). Sin embargo, en este trabajo se ha considerado la evaluación de los tres parámetros en conjunto para disponer de una conclusión más completa. Cabe recordar que estos puntos de corte o *cut-offs* establecidos por la EMA para cada parámetro son diferentes según en qué segmento etario de población los estemos evaluando (población de 15-64 años o en individuos mayores de 65 años).

Frente a la cepa A/California/07/2009 del subtipo A(H1N1) pandémico, cepa incluida en la vacunas trivalentes estacionales administradas en cada una de las temporadas del estudio, se alcanzaron los tres criterios EMA requeridos en el análisis de la eficacia vacunal (TSP, TSC y RIC) en mayores de 65 años en ambas temporadas vacunales.

La vacunación fue también serológicamente eficaz en adultos frente al subtipo (H1N1) pandémico en la temporada 2014-2015. Sin embargo, la vacunación estacional en el grupo de adultos de la temporada 2013-2014 no consiguió superar los valores de corte EMA para los parámetros de TSC (25,0%) ni RIC (2,2).

Los datos de este trabajo muestran por tanto que las vacunas estacionales administradas en ambas poblaciones produjeron una respuesta homóloga eficaz frente a la HA de la cepa A(H1N1) pandémica incluida en la formulación de estas vacunas, a excepción de la vacuna inactivada fraccionada en adultos en la temporada 2013-2014. Estos datos muestran que la vacuna fraccionada de elaboración en huevo tiene una menor eficacia vacunal en la generación de anticuerpos anti-HA con respecto a la vacuna de antígenos de superficie elaborada en cultivo celular.

Frente al subtipo A(H1N1) clásico, no se alcanzaron los valores requeridos según los criterios EMA en términos de TSC o RIC frente a ninguna de las cepas del subtipo A(H1N1) estacional en ninguno de los grupos etarios ni temporadas vacunales. Por otra parte, la vacunación provocó que la TSP post-vacunal superara el valor umbral EMA únicamente frente a dos de las cepas clásicas incluidas en el estudio. Concretamente se superó el *cut-off* en la TSP del grupo de adultos (TSP \geq 70%) frente a A/Brazil/11/1978 en ambas temporadas vacunales. Por otro lado, se superó también el *cut-off* de TSP (TSP \geq 60%) en el grupo de mayor edad frente a A/Brisbane/59/2007 en ambas temporadas vacunales. A este respecto, cabe hacer una crítica conjunta de los tres parámetros EMA usados, ya que al exigir el cumplimiento de uno solo de estos criterios, esto puede a veces sobrevalorar o minusvalorar el efecto inmunizante de la vacuna. En este sentido, algunos autores aclaran que la RIC y la TSC pueden infraestimar la inmunogenicidad de la vacuna, y sin embargo, la TSP puede sobreestimar ésta. En opinión del autor de este trabajo, la valoración individual de la TSP post-vacunal en este caso puede sobrevalorar la eficacia serológica de la vacuna cuando, por los otros parámetros considerados, se concluye que la eficacia serológica de la vacuna fue baja. Se debe valorar por tanto la intensidad de los otros dos parámetros para tener una conclusión razonada sobre la eficacia de la vacuna estacional antigripal, apunte que también se encuentra reflejado en la literatura científica (117).

En conclusión, en todos los mayores de 65 años la vacuna adyuvada cumplió los tres criterios EMA de eficacia frente a la HA del subtipo pandémico A(H1N1). Sólo la vacuna de gripe elaborada en cultivo celular cumplió los tres criterios EMA de eficacia en adultos frente al subtipo pandémico A(H1N1).

Estudio comparativo de la respuesta mediada por Acs anti-NA y Acs anti-HA

Aunque diversos autores han demostrado que los anticuerpos dirigidos frente a la NA de los virus gripales desempeñan un papel en la protección (72,73,108), se ha prestado poca atención a este antígeno sobre su posible papel como diana de las futuras vacunas contra la gripe. De hecho, la NA viral ha sido recientemente denominada como "el antígeno olvidado"(63). Parte de la ausencia de resultados de calidad frente a este antígeno ha sido la ausencia de ensayos serológicos estandarizados, lo que ha limitado disponer de datos comparativos sobre la función diferenciada de los anticuerpos contra la NA gripal en la protección, relegando a un segundo lugar el papel de los Acs anti-NA dada la importante función de los anticuerpos contra la HA.

Por otro lado, la respuesta inducida por las vacunas estacionales actuales en términos de creación de Acs anti-NA puede ser variable, debido fundamentalmente a que este antígeno no está estandarizado en las vacunas antigripales (107,173). No obstante, dado el interés por diseñar vacunas que aumenten la inmunogenicidad frente a la gripe y potencien las respuestas heterotípicas ya demostradas frente a varios virus, recientemente se ha realizado un esfuerzo de colaboración para estandarizar el ensayo ELLA para la determinación de Acs anti-NA (66,126).

La aplicación reciente del ensayo ELLA como técnica serológica estandarizada para la determinación de Acs contra la NA gripal, implica que actualmente existan pocos estudios realizados para la comparación entre ambos tipos de respuesta serológica (73,108,157). Los resultados del presente trabajo aportan información relevante sobre esta línea de investigación (174). A este respecto, cabe realizar una discusión crítica de los resultados observados a modo de estudio comparativo de la respuesta serológica tanto en términos de Acs anti-HA como de Acs anti-NA con lo actualmente descrito por otros autores.

Estudio comparativo entre Acs anti-HA y anti-NA previos a la vacunación

El análisis conjunto de los datos obtenidos en el estudio de Acs anti-NA y anti-HA de este trabajo pretende evaluar de forma global la inmunización frente a virus del subtipo A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. De este modo se pretende entender el tipo de relaciones inmunológicas o de correlaciones que existen entre ambos antígenos.

Los datos presentados en este trabajo mostraron que el número de sueros pre-vacunales que presentaron títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$ fue muy superior al de sueros con títulos Acs anti-HA $\geq 1/40$ en la población global estudiada. El porcentaje de sueros pre-vacunales que presentaban títulos de Acs anti-NA $\geq 1/40$ fue superior al 80% frente a todas las cepas analizadas, mientras que frente a HA se encontraron Acs a títulos protectores en muy bajo porcentaje frente a las cepas A(H1N1) clásicas más antiguas, incrementándose este porcentaje paulatinamente hasta la cepa pandémica A/California/07/2009, con un 70,6% de TSP pre-vacunal. Estos resultados muestran que, mientras los títulos de Acs frente a la NA parecen mantenerse durante mucho tiempo a títulos protectores, los de la HA parecen disminuir a medida que pasa el tiempo desde la exposición a una determinada cepa. La diferencia observada en la seroprotección frente a ambos antígenos es notable, suscitando el interés por analizar de forma conjunta ambos tipos de Acs. Estos resultados además demuestran que utilizar vacunas con NA en su composición puede tener interés de cara a mantener buenos valores de seroprotección frente a virus actuales y antiguos. A pesar de esta interesante información, es complejo desde esta perspectiva conocer la implicación de estos Acs en la protección del individuo, por lo que se requiere experimentación in vivo para determinar el alcance de su actividad.

Para realizar un estudio comparativo de ambos tipos de Acs antigripales (HA y NA), se realizó una estratificación de los títulos de Acs observados en diferentes rangos según el nivel de estos Acs. Cabe destacar que la proporción de títulos protectores altos ($>1/160$) fue significativamente superior en el caso de los Acs anti-NA frente a todas las cepas analizadas con respecto a los Acs anti-HA. Esto se debe probablemente a que la estructura antigénica de la NA está mucho más conservada que la de la HA durante la evolución del subtipo A(H1N1) (77). Los análisis filogenéticos de este

estudio mostraron que la HA y la NA difieren aproximadamente en un logaritmo de variabilidad genética entre ellas (13), lo que se traduce en que la NA está mucho más conservada durante esta historia natural del subtipo A(H1N1).

Al considerarse la NA una proteína más conservada que en el caso de la HA, es probable que la respuesta humoral generada por el contacto con un virus gripal provoque respuestas cruzadas de Acs anti-NA más frecuentemente frente a otros virus gripales dentro de un mismo subtipo, e incluso entre diferentes subtipos, al menos dentro del mismo clado de la NA (114). Esto se ve plasmado en nuestros resultados, ya que se observan valores de seroprotección frente a la NA muy elevados y similares entre todas las cepas analizadas. Esta particularidad puede ser interesante para generar respuestas humorales más duraderas y reducir la discordancia antigénica entre virus de temporadas consecutivas debido a la rápida evolución de la HA (113). En definitiva, los Acs dirigidos contra proteínas gripales más conservadas, como es el caso de la NA, podrían ayudar a proporcionar un nivel significativo de seroprotección frente a la infección gripal (74–77,108,144), duradera, de amplio espectro, y complementaria a la inducida por la HA gripal.

En este trabajo se examinó además la correlación entre las medias geométricas de los títulos de Acs anti-NA y Acs anti-HA pre-vacunales de la población analizada. En relación con estas MGTs pre-vacunales, se identificó únicamente una correlación positiva significativa entre los títulos de Acs anti-NA y anti-HA frente a la cepa A/PR/8/1934. No obstante, esa correlación fue muy baja, con un valor de 0,295. Frente al resto de cepas clásicas del subtipo A(H1N1) así como frente a la cepa del subtipo A(H1N1)pdm09 no se encontraron correlaciones positivas significativas entre los títulos de Acs anti-HA y anti-NA. En otros términos, los resultados de este trabajo muestran que los títulos de Acs anti-NA no guardan una correlación significativa con aquellos títulos de Acs anti-HA en la población analizada frente a las cepas gripales A(H1N1) ni A(H1N1)pdm09 estudiadas, con excepción de la cepa A/PR/8/1934. De acuerdo con estos resultados, estudios en esta línea demuestran también que la contribución de los Acs anti-NA a la protección de la población ocurre de forma independiente de la respuesta a la HA (72,144). A este respecto, un estudio reciente ha demostrado que la presencia de títulos previos de Acs anti-NA en sueros de pacientes

se comporta como un factor de protección frente a la infección gripal, independientemente del título de Acs anti-HA en el suero de los mismos (73).

Existen trabajos que determinan una correlación entre el título de Acs hemaglutinantes (Acs anti-HA) y el nivel de protección que presenta una persona ante la infección por un virus de la gripe. En relación a ello, se ha considerado tradicionalmente que aquellos títulos de Acs anti-HA por encima del valor 1/40 se consideran un correlato de protección. La evidencia científica de este correlato proviene de un ensayo con virus vivos de gripe realizado en 1972 por Hobson y colaboradores (62) que estableció que un título de Acs anti-HA en suero previo a la inoculación del virus de entre 1/18 y 1/36 estaba asociado con un 50% de protección contra la infección. Un estudio similar demostró una tasa de infección del 29% en aquellos individuos con títulos de Acs de 1/40 a 1/60 (175). Sin embargo, históricamente otros estudios dentro de este ámbito de investigación *in vivo* mediante la inoculación de virus gripales han sido menos concluyentes (176–178).

Por otra parte, cada vez son más los estudios que demuestran que para alcanzar esos niveles de protección se requieren de títulos hemaglutinantes más altos (62,175), e incluso trabajos que justifican que la protección prevista no es completa y que otros correlatos, como el título de Acs anti-NA, pueden ofrecer una información predictiva adicional importante sobre la protección que si se analizan únicamente los títulos de Acs anti-HA (62,114,129).

En este trabajo se quiso conocer si la presencia de un título hemaglutinante protector (Acs anti-HA $\geq 1/40$) estaba correlacionado con un mayor título de Acs anti-NA en la población analizada. Con este objetivo, se compararon los títulos de Acs anti-NA observados entre aquellos individuos que presentaban títulos hemaglutinantes protectores frente a aquellos individuos que presentaban títulos hemaglutinantes no protectores. No se observaron diferencias significativas en la magnitud de los títulos de Acs anti-NA entre ambas categorías en ninguno de los dos grupos etarios analizados, mostrando una vez más la independencia de la seroprotección entre ambos antígenos. Los datos de este trabajo muestran que la protección analizada únicamente mediante la determinación de títulos de Acs hemaglutinantes no es completa y que otros

correlatos, como pueden ser los Acs anti-NA, pueden ofrecer una información predictiva adicional.

Con relación a la inmunidad basada en la NA, varios autores (64,70,72,73,179) han demostrado que los títulos de Acs anti-NA se correlacionan con la protección frente a la enfermedad gripal en humanos. No obstante, por el momento no se han definido correlatos de protección para los títulos de Acs anti-NA así como actualmente existen para los títulos de Acs hemaglutinantes (62,120,180).

Atendiendo a esta consideración, en virtud de los resultados observados en este trabajo, se quiso hacer una aproximación de qué título de Acs anti-NA se podía correlacionar con el correlato de seroprotección aceptado actualmente frente a la HA ($\geq 1/40$) frente a cada una de las cepas gripales analizadas. Para ello, en cada grupo etario se segregó la población en aquellos individuos que poseían Acs a títulos protectores frente a la HA y aquellos que no, y se correlacionaron con los Acs anti-NA utilizandoun análisis de curvas ROC (área bajo la curva). Mediante este test se pudo estimar que en el grupo de individuos mayores de 65 años, el título de Acs anti-NA que puede considerarse como seroprotector frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/FM/1/1947 es 1/240 y 1/480 respectivamente. No se encontraron correlaciones significativas frente al resto de virus en mayores de 65 años, ni frente a ningún virus en adultos.

A tal efecto, de estos resultados se puede inferir que para alcanzar un nivel de seroprotección en términos de Acs anti-NA frente a las cepas A/PR/8/1934 y A/FM/1/1947 en mayores de 65 años, se van a necesitar generalmente títulos de Acs anti-NA muy superiores a aquellos valores requeridos para la HA (tomando como correlato para la HA un título $\geq 1/40$). Como limitación, esta consideración es únicamente una aproximación para conocer a partir de qué nivel de Acs anti-NA, estos títulos pueden considerarse como protectores en la población. No obstante, hasta donde se conoce, es de las primeras aproximaciones en las que se pretende establecer equivalencias entre los títulos de Acs observados frente a la HA y la NA para determinar de forma indirecta los correlatos de protección necesarios para la NA. Por ello, se hacen necesarias futuras investigaciones en este campo con el objeto de comprobar algunos indicadores como son los correlatos de seroprotección de la NA

para distintos grupos de población y estudiar en detalle la relación de los Acs frente a la NA y los observados frente a la HA.

Este es uno de los primeros trabajos en donde se realiza una aproximación para definir los correlatos de seroprotección para la NA. No obstante, se hacen necesarios además estudios observacionales poblacionales donde se determine la eficacia y efectividad de una hipotética vacuna contra la gripe que contenga una cantidad estandarizada de NA para conseguir de este modo definir qué títulos de Acs anti-NA se correlacionan con la protección. Son necesarias futuras investigaciones en este campo con el objeto de comprobar algunos indicadores como son los correlatos de seroprotección de la NA para distintos grupos de población y estudiar en detalle la relación de los Acs frente a la NA y los observados frente a la HA.

En conclusión, la correlación de Acs anti-NA y anti-HA utilizando el correlato de protección Acs $\geq 1/40$ muestra una correspondencia baja, demostrando que la dinámica de producción de Acs anti-NA ocurre de forma independiente de la respuesta a la HA, por lo que se necesita formular un correlato de protección propio para los Acs títulos de Acs anti-NA. Los títulos de HA son inferiores por lo general a los títulos de NA para cualquier correlación que se trate de establecer. No se ha podido encontrar un título de Acs HA que anticipe la presencia de Acs anti-NA a títulos $\geq 1/40$.

Análisis comparativo entre los Acs post-vacunales anti-NA y anti-HA

Otro de los objetivos del presente trabajo fue comparar la respuesta humoral frente a la HA así como frente a la NA tras la vacunación estacional de la población en función del tipo de vacuna antigripal administrada en la población analizada. El tipo de vacuna que había recibido la población incluida en el estudio fue del tipo de vacuna trivalente inactivada en ambas temporadas vacunales consideradas. Concretamente, en el grupo reclutado de 15-64 años, todos los individuos se vacunaron con vacuna inactivada no adyuvada en las dos campañas vacunales consecutivas. Por otro lado, los mayores de 65 años fueron vacunados con vacuna inactivada de tipo adyuvada.

Los resultados de este trabajo muestran que la vacuna sin adyuvante indujo una mayor respuesta de incremento entre los títulos pre y post-vacunales respecto a la vacuna adyuvada frente a las cepas A/Weiss/1943 y A/FM/1/1947. Esta diferencia parece estar vinculada a que la población ≥ 65 años que recibió la vacuna de tipo adyuvada ya presentaba títulos muy altos de Acs anti-NA previos a la vacunación frente a estas dos cepas, por lo que no se concluye que la vacuna adyuvada presente un menor efecto inductor de Acs frente a HA ni NA que las inactivadas no adyuvadas. Tampoco parece estar implicado en este caso el fenómeno de la inmunosenescencia, ya que considerando que el título pre-vacunal es tan elevado, es muy difícil incrementar sustancialmente el título de Acs. Esto parece haber limitado el aumento de los títulos en este grupo de mayor edad, por lo que no sólo el tipo de vacuna administrada parece relevante en la respuesta de Acs anti-NA tras la vacunación antigripal, sino además la inmunidad previamente adquirida frente a las primeras infecciones durante la vida de un individuo, demostrando de nuevo que el pecado original antigénico está estrechamente relacionado con la respuesta serológica basada en la NA y la HA. En general, los títulos de Acs anti-NA eran más altos frente a aquellos virus que circulaban durante la infancia de los individuos examinados, lo que sostiene la importancia del pecado antigénico original. De este modo, este fenómeno pudo mitigar la respuesta tras la vacunación frente a dichas cepas, independientemente del tipo de vacuna administrada.

Será interesante determinar en detalle en estudios futuros, de igual modo que se ha estudiado para los Acs hemaglutinantes, cómo los títulos de Acs anti-NA se generan tras la vacunación con vacunas estandarizadas para la NA, y cómo los adyuvantes influirían en la inmunidad contra la NA incluida en la vacuna. No obstante, inicialmente habría que contar con vacunas antigripales diseñadas con un contenido estandarizado de NA vacunal. Comprender las características de la respuesta específica de la NA ayudará a los investigadores a diseñar vacunas que induzcan títulos altos y de reacción cruzada de Acs anti-NA en todos los grupos de edad y contra todos los subtipos.

En conclusión, los datos de este trabajo ponen de manifiesto la presencia conjunta de los Acs anti-HA así como de Acs anti-NA en la respuesta humoral homóloga y heteróloga frente a los subtipos de gripe A(H1N1) y A(H1N1)pdm09 tras la vacunación

estacional antigripal. No sólo el tipo de vacuna administrada parece relevante en ambos tipos de respuesta de Acs tras la vacunación antigripal, sino además la inmunidad previamente adquirida frente a las primeras infecciones durante la vida de un individuo.

Limitaciones del estudio

En opinión del autor y directores de este trabajo, se cree conveniente apuntar ciertas limitaciones encontradas durante la realización del presente trabajo y que se piensa que pueden contribuir a una mejor interpretación de los resultados obtenidos, además de servir de ayuda para posibles futuras investigaciones en este campo.

Limitaciones con el ensayo serológico ELLA para determinar el título de Acs anti-NA

Entre las limitaciones de este estudio, cabe señalar que se han utilizado virus vivos completos (a excepción de la cepa A/PR/8/1934 que se utilizó inactivado con formas nativas de HA y NA de cepas humanas estacionales A(H1N1) y A(H1N1)pdm09. Según algunos autores, la determinación del título de Acs anti-NA en el ensayo ELLA puede ser interferido por Acs anti-HA preexistentes a través de diferentes mecanismos de impedimento estérico entre los Acs anti-HA y la NA (181), aumentando artificialmente los títulos de Acs anti-NA. Por ello, algunos resultados de nuestro estudio pueden sobreestimar los títulos de Acs anti-NA por la posible presencia de Acs contra la hemaglutinina H1 (126).

Para solventar esta limitación, el protocolo del ensayo ELLA estandarizado por la iniciativa CONSISE recomienda utilizar virus quiméricos H6Nx para disponer de una hemaglutinina exótica frente a la cual el ser humano no disponga de Acs anti-HA. Sin embargo, a juicio de los autores de esta tesis, el uso de virus quiméricos que contienen hemaglutinina exótica como H6Nx para la evaluación de Acs anti-NA también puede estar limitado por la presencia de Acs heterotípicos en la población analizada. En un trabajo previo del Dr. I. Sanz y colaboradores se demostró que un porcentaje moderado de la población ≥ 65 años tiene Acs heterotípicos a títulos protectores contra

la cabeza globular de la HA de virus de la gripe no estacionales como el H5 y el H9 (141). Estos Acs estaban presentes como resultado de una respuesta cruzada con Acs frente a virus de gripe estacional, como H1 y H2, durante su vida. Estos Acs heterotípicos también han sido observados por otros autores (105). Los subtipos H5 y H9 pertenecen al clado 1 de la HA y presentan una homología genética similar o incluso menor (en el caso del subtipo H9) que el subtipo H6 con respecto a los virus H1 y H2 de la gripe estacional humana. Dado que estos Acs heterotípicos se encuentran comúnmente en poblaciones expuestas y vacunadas, es difícil evaluar el grado de interacción de estos Acs heterotípicos en el ensayo ELLA cuando se utilizan hemaglutininas exóticas y nativas. Debido a esto, se decidió finalmente utilizar los virus nativos completos para evaluar con exactitud que ocurre a nivel serológico frente a los dos antígenos principales de la superficie de los virus de la gripe, la HA y la NA.

A pesar de que los Acs anti-HA podrían estar aumentando artificialmente el título de Acs anti-NA en este estudio por impedimento estérico, en opinión del autor y directores de este trabajo, este efecto es limitado. En este sentido, vale la pena comentar algunos aspectos de la arquitectura de la envoltura de los virus de la gripe en relación con la HA y la NA.

En primer lugar, algunos autores sugieren que la capacidad de neutralización de los Acs anti-HA específicos del tallo de la hemaglutinina podría verse limitada por la disposición de la HA en la superficie del virus de la gripe, debido al limitado acceso de estos Acs a ciertos epítomos antigénicos de la HA (13,156). La compactación de las hemaglutininas entre ellas en la superficie del virus gripal puede limitar el acceso de los Acs contra el tallo, hecho que ya ha sido discutido con respecto a la limitación del uso de estos Acs y el diseño de una futura vacuna universal basada en la región conservada del tallo de la HA (182). Este problema también afecta al obstáculo estérico entre la HA y la NA, ya que este efecto puede ser mitigado por el acceso limitado de los Acs al tallo. Por otro lado, el tallo de la HA es menos inmunogénico que la cabeza globular de la HA, por lo que no hay tanta diversidad de Acs como contra la cabeza globular, y su producción no es tan numerosa (183). Mientras que algunos autores demuestran por métodos computacionales que la estructura de la HA en la superficie del virión no limita el acceso de los Acs específicos del tallo a los epítomos próximos a

la membrana (172), la subdominancia inmunogénica de la región del tallo de la HA implica una menor producción y variedad de Acs con respecto a la cabeza globular HA.

En segundo lugar, la disposición de HA y NA en la superficie del virión se produce en forma de parches, en los que se disponen varias proteínas de la misma clase (HA en un lado y NA en otro). En estos parches hay varias NA juntas y sólo las que forman parte del exterior de un parche son las que pueden sufrir el efecto estérico con las HA que están inmediatamente cerca de NA. De hecho, en algunos casos incluso las NA están situadas cerca de un canal de iones o de proteína M2. Por ello, el efecto estérico producido por los Acs anti-HA presentes en el suero humano sólo se produciría contra las NA situadas fuera de estos parches.

Falta de consenso para determinar correlatos de protección referidos a los títulos de Acs anti-NA

Otra de las observaciones a destacar en este trabajo es que se han utilizado dos correlatos de seroprotección frente a la NA que no están aceptados actualmente y que dependen de los ya propuestos para la HA. En nuestro trabajo se utilizó un título $\geq 1/40$ como correlato de seroprotección frente a la NA, completando el estudio con un correlato $\geq 1/80$ para verificar títulos más elevados. Existen algunos estudios que han determinado correlaciones de seroprotección equivalentes entre ambas proteínas (73,108,144), por lo que los resultados de este estudio proporcionan información sobre este tipo de comparación con los estudios ya disponibles. El análisis de los Acs anti-NA en un modelo humano previo a la vacunación y los inducidos por la vacuna estacional en este trabajo de investigación, ofrecen un punto de vista interesante sobre cómo se produce la respuesta inmunitaria humoral en un modelo humano y en condiciones reales tras la vacunación. La publicación de nuevos estudios como éste permitirá la comparación y el análisis de la respuesta de Acs anti-NA en términos de protección humoral y eficacia serológica de la vacuna.

Virus gripales

El presente trabajo se ha limitado al estudio de las infecciones por gripe A (H1N1). Sin embargo, los hallazgos deben aplicarse a otras infecciones por el virus de la gripe A y posiblemente a las infecciones por gripe B en humanos. El título de Acs anti-HA $\geq 1/40$ en suero se ha establecido como un correlato de seroprotección frente a todos los virus de la gripe de interés humano, como A(H1N1), A(H2N2), A(H3N2) y B (108,185,186). Se ha demostrado que los Acs anti-NA en suero predicen la protección frente a la infección y la enfermedad por el virus de la gripe A(H3N2) en estudios con modelos humanos (108). También se ha demostrado que los Acs anti-HA y anti-NA presentes en secreciones nasofaríngeas se correlacionan con la seroprotección a la infección de gripe en personas que se exponen a los virus de la gripe A y B (70,187).

La presentación de esta tesis amplía los hallazgos sobre las respuestas de Acs anti-HA y anti-NA frente a virus gripales del subtipo clásico A(H1N1) y subtipo pandémico A(H1N1) que se producen tras la vacunación antigripal estacional. Este trabajo añade un valor importante para que los anticuerpos anti-NA puedan considerarse como un predictor independiente de inmunidad humoral cuando éstos están presentes. Esto es interesante porque la proteína NA presenta una tasa de variación antigénica más baja que la HA, de modo que la inmunidad inducida por la NA podría ser de mayor duración y de más amplio espectro (13,16,188). También se ha demostrado en este trabajo que la inmunización con la NA en cantidad no estandarizada presente en las actuales vacunas induce una seroprotección que se extiende a otros virus no incluidos en la vacuna. Por estas razones, es interesante considerar la posibilidad de desarrollar vacunas contra la gripe estandarizadas para el contenido de NA que sean capaces de producir dichos Acs. No sólo ello podría aumentar la protección conferida tras la vacunación en los años en que la HA de las cepas incluidas en la vacuna coincida con los virus circulantes, sino que también existiría la posibilidad de obtener cierta protección en aquellos años en los que exista un *mismatch* antigénico de la HA, pero con poca deriva antigénica de la NA.

Conclusiones

Conclusiones

1. Toda la población estudiada mostró en una gran proporción títulos altos de Acs anti-NA ($\geq 1/40$) previos a la vacunación frente a todos los virus gripales del subtipo clásico A(H1N1) y del subtipo pandémico A(H1N1).
2. Los ≥ 65 años tenían MGTs de Acs anti-NA pre-vacunales más elevadas frente a cepas antiguas del subtipo clásico A(H1N1) mientras que en los adultos éstas estaban más elevadas frente a cepas más actuales, coincidiendo con las cepas de dicho subtipo que probablemente primo-infectaron a estos individuos.
3. La vacuna estacional de gripe indujo seroconversión homóloga frente a la NA del subtipo pandémico A(H1N1) en más de la mitad de los individuos, y seroconversión heteróloga frente a la NA de todas las cepas del subtipo clásico A(H1N1) en más de la cuarta parte de la población analizada. Demostrando que las vacunas estacionales actuales, sin cantidades estandarizadas de NA, inducen producción de Acs homólogos y heterólogos frente a la NA.
4. El aumento de Acs (MGTs) en ≥ 65 años tras la vacunación, fue mayor frente a las cepas más antiguas del subtipo clásico A(H1N1), mientras que en los adultos lo fue frente a las cepas más recientes; mostrando un efecto *booster* de la vacunación mayor frente a las cepas que probablemente primo-infectaron a los individuos. Este efecto, relacionado con el pecado original antigénico descrito para la HA, es la primera vez que se demuestra para la NA en población europea.
5. La vacuna celular indujo seroconversión homóloga mayor frente a la NA del subtipo pandémico A(H1N1) con respecto a la vacuna elaborada en huevo, ambas administradas en adultos. La vacuna celular sólo produjo una respuesta heteróloga superior frente a la NA de dos cepas clásicas, A/PR/8/1934 y A/Weiss/1943.

6. La vacunación estacional cumplió en ambos grupos etarios los tres criterios EMA de eficacia en términos de Acs anti-NA frente al subtipo pandémico A(H1N1) para las temporadas analizadas. La vacuna adyuvada en ≥ 65 años indujo además una respuesta heteróloga eficaz frente a dos de las cepas gripales más recientes del subtipo clásico A(H1N1), concretamente A/Brisbane/59/2007 y A/Brazil/11/1978.
7. Al igual que frente a la NA, los ≥ 65 años muestran mayores títulos HA frente a los virus más antiguos del subtipo A(H1N1), mientras que los individuos adultos muestran los mayores títulos frente a las cepas clásicas A(H1N1) más actuales, coincidiendo con las cepas que probablemente primo-infectaron a estos individuos.
8. En todos los ≥ 65 años la vacuna adyuvada cumplió los tres criterios EMA de eficacia frente a la HA del subtipo pandémico A(H1N1). Sólo la vacuna de gripe elaborada en cultivo celular cumplió los tres criterios EMA de eficacia en adultos frente al subtipo pandémico A(H1N1).
9. La correlación de Acs anti-NA y anti-HA mediante el correlato de protección Acs $\geq 1/40$ muestra una correspondencia baja, demostrando que la dinámica de producción de Acs anti-NA ocurre de forma independiente de la respuesta a la HA.
10. Los títulos de Acs anti-HA son inferiores en general a los títulos de Acs anti-NA para cualquier correlación que se trate de establecer. No se ha podido encontrar un título de Acs HA que anticipe la presencia de Acs anti-NA a títulos $\geq 1/40$.
11. Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que la respuesta humoral frente a la HA y NA, homóloga y heteróloga frente a cepas del subtipo clásico A(H1N1) y pandémico A(H1N1) tras la vacunación estacional antigripal, depende no sólo del tipo de vacuna administrada, sino de la inmunidad previamente adquirida frente a las primeras infecciones.

12. Los elevados títulos de Acs NA pre-vacunales encontrados en la población así como la ausencia de correlación directa con los Acs anti-HA hacen necesario establecer parámetros EMA específicos para la NA al considerar este antígeno como un nuevo objetivo o diana vacunal.

Rendimiento científico

Rendimiento científico

Artículo internacional

Título: Heterotypic Neuraminidase antibodies against different A(H1N1) strains are elicited after seasonal influenza vaccination.

Autores: Jose Manuel Mendez-Legaza, Raúl Ortiz de Lejarazu, Iván Sanz.

Revista: *Vaccines* 2019, 7(1), 30; <https://doi.org/10.3390/vaccines7010030>

(ISSN 2076-393X)

Indexada en: *Science Citation Index Expanded* (SCIE) y Scopus.

Cuartil: Q1 en la categoría “Enfermedades infecciosas”, Q1 en la categoría “Inmunología”.

Índice de impacto (Scopus 2017): 4.94

Artículo en revista académica

Título: Epidemia de gripe en la temporada 2016-17.

Autores: Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo, Jose Manuel Méndez Legaza.

Revista: *Revista Clínica* 2017 (26), 11-20; <https://doi.org/10.24197/cl.26.2017.11-20>

(ISSN 0301-0392). Academia de Alumnos Internos de la Facultad de Medicina de Valladolid

- ***Role of antibodies against neuraminidase protein against A/H1N1 influenza viruses.***

Mendez-Legaza JM, Sanz I, Rojo S, Ortiz de Lejarazu R.

XXVIII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Madrid, España. 21 al 24 de abril. 2018.

- ***Heterotypic humoral response against N1 neuraminidase after flu seasonal vaccination.***

Mendez-Legaza JM, Sanz I, Rojo S, Ortiz de Lejarazu R.

XXVIII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Madrid, España. 21 al 24 de abril. 2018.

- ***Neuraminidase-inhibiting antibodies against new and classic A/H1N1 flu strains in adults and elderly.***

Mendez J, Sanz I, Lopez I, Rojo S, Ortiz de Lejarazu R.

WHO Meetings. Ginebra, Suiza. 2017.

- ***Hospitalization caused by laboratory confirmed influenza in the post-pandemic period.***

Sanz I, Rojo S, Mendez-Legaza J, Tamames S, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R.

European Scientific Working group of Influenza. Riga, Letonia. 2017.

- ***Estudio de la respuesta de anticuerpos frente a la neuraminidasa en población vacunada con vacuna antigripal fraccionada y adyuvada.***

J.M. Méndez Legaza, I. Sanz Muñoz, S. Rojo Rello y R. Ortiz de Lejarazu.

Presentación oral. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid, 23-25 de mayo de 2019.

- ***Estudio de la respuesta de anticuerpos frente a hemaglutinina en población vacunada con vacuna antigripal fraccionada y adyuvada.***

J.M. Méndez Legaza, I. Sanz Muñoz, S. Rojo Rello y R. Ortiz de Lejarazu.

XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid, 23-25 de mayo de 2019.

- ***Comparación de la respuesta a la vacuna antigripal mediante el análisis de anticuerpos frente a hemaglutinina y neuraminidasa***

J.M. Méndez Legaza, I. Sanz Muñoz, S. Rojo Rello y R. Ortiz de Lejarazu.

XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid, 23-25 de mayo de 2019.

- ***Respuesta humoral específica y heteróloga frente a la neuraminidasa de virus de la gripe A/H1N1 Y A/H1N1pdm09 en individuos vacunados.***

J.M. Méndez Legaza, I. Sanz Muñoz, S. Rojo Rello y R. Ortiz de Lejarazu.

Presentación oral. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, 24-26 de mayo de 2018.

- ***Análisis global de la eficacia vacunal frente a gripe A y B medida por seroconversión.***

M. Justel, R. Almansa, I. Sanz, J.M. Méndez, J.E. Lozano, S. Rojo, M. Cardaba, T. Vega, J.F. Bermejo-Martín y R. Ortiz de Lejarazu.

Presentación oral. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, 24-26 de mayo de 2018.

- ***Epidemiología de las infecciones por gripe en la temporada 2017-2018.***

I. Sanz Muñoz, S. Rojo Rello, A. López Cabo, J.M. Méndez Legaza y R. Ortiz de Lejarazu Leonardo.

XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, 24-26 de mayo de 2018.

- ***Análisis de la eficacia vacunal frente a gripe A/H1N1 Y A/H3N2 por seroconversión.***

M. Justel, R. Almansa, I. Sanz, J.M. Méndez, L. Sánchez, J.E. Lozano, S. Rojo, T. Vega, J.F. Bermejo-Martín y R. Ortiz de Lejarazu.

XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, 24-26 de mayo de 2018.

- ***Prevalencia de anticuerpos Anti-neuraminidasa frente a virus de la gripe en población adulta y mayor de 65 años.***

J. M. Méndez Legaza, I. Sanz Muñoz, I. López Ramos, S. Rojo Rello, R. Ortiz de Lejarazu Leonardo.

Presentación oral. XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, 11-13 de mayo de 2017.

- ***Seroprotección frente a gripe A H1N1 pandémico y estacional en Castilla y León en las temporadas gripales 1990-1991 a 2014-2015.***

M. Justel, I. Sanz, R. Almansa, I. López, J.M. Méndez, M. Martín, J.E. Lozano, S. Rojo, T. Vega, J.F. Bermejo-Martín y R. Ortiz de Lejarazu.

Presentación oral. XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, 11-13 de mayo de 2017.


- ***Seroprotección frente a gripe A H3N2 en Castilla y León en las temporadas gripales 1990-1991 a 2014-2015.***

M. Justel, R. Almansa, I. Sanz, I. López, J.M. Méndez, M. Martín, J.E. Lozano, S. Rojo, T. Vega, J.F. Bermejo-Martín y R. Ortiz de Lejarazu.

XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, 11-13 de mayo de 2017.

Article

Heterotypic Neuraminidase Antibodies Against Different A(H1N1) Strains are Elicited after Seasonal Influenza Vaccination

Jose Manuel Mendez-Legaza ^{1,*} , Raúl Ortiz de Lejarazu ^{1,2} and Ivan Sanz ^{1,2}

¹ Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Avenida Ramón y Cajal s/n, 47005 Valladolid, Spain; rortizdelejarazu@saludcastillayleon.es (R.O.d.L.); isanzm@saludcastillayleon.es (I.S.)

² Valladolid National Influenza Centre, Avenida Ramón y Cajal s/n, 47005 Valladolid, Spain

* Correspondence: josemlegaza@gmail.com

Received: 19 December 2018; Accepted: 9 March 2019; Published: 13 March 2019



Abstract: Neuraminidase (NA) content is not standardized in current seasonal influenza vaccines; neither anti-NA antibodies (anti-NA Abs) are measured nor is it well-defined as a correlate of humoral protection. In this work, the presence of NA1 antibodies against classical A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 subtypes was studied before and after vaccination with seasonal vaccines containing A/California/07/2009 strain (A(H1N1) pdm09 subtype). By Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA; Consortium for the Standardization of Influenza Seroepidemiology), we analyzed serum samples from two different cohorts (adults and elderly). The presence of anti-NA Abs at titers $\geq 1/40$ against classical A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 subtypes were frequently found in both age groups, in 81.3% and 96.3% of adults and elderly, respectively. The higher titers of anti-NA Abs (NAI titers) were detected more frequently against classical A(H1N1) strains according to the expected age when the first flu infection takes place. In this way, an Original Antigenic Sin phenomenon related to NA seems to be part of the immune response against flu. Seasonal-vaccination induced homologous seroconversion against NA of A(H1N1) pdm09 subtype in 52.5% and 55.0%, and increased the Geometric Mean Titers (GMTs) in 70.0% and 78.8% of adults and elderly, respectively. Seasonal vaccination also induced a heterotypic anti-NA Abs response against classical A(H1N1) strains (seroconversion at least in 8.8% and 11.3% of adults and elderly, respectively, and an increase in GMTs of at least 28.0% in both age groups). These anti-NA Abs responses occur even though the seasonal vaccine does not contain a standardized amount of NA. This work demonstrates that seasonal vaccines containing the A(H1N1) pdm09 subtype induce a broad antibody response against NA1, that may be a target for future influenza vaccines. Our study is one of the first to analyze the presence of Abs against NA and the response mediated by NAI titers after seasonal influenza vaccination.

Keywords: neuraminidase; original antigenic sin; seasonal influenza vaccination

1. Introduction

Influenza infection is a major health problem in both developed and developing countries. The importance of influenza infection is due to both the high morbidity, which causes a significant number of people infected in a short period of time, and its related mortality either directly or by aggravating comorbidities. More than 80 years ago the first influenza virus was isolated [1] and since then there have been significant changes in the knowledge regarding influenza.

Among influenza viruses, different strains of subtype A(H1N1) influenza have circulated in humans [2,3] until its extinction in 2009 coinciding with the emergence of the new pandemic strain, A(H1N1) pdm09 [4]. The first human infection with the influenza virus likely stimulates the production

of key antibodies that then shape later immune responses to different seasonal influenza strains. The world's population may have experienced different imprinting on its immune system. Individuals born before 1957 and those born before 2009 possibly show different immunological memory based on circulating antibodies against subtype A (H1N1) influenza.

Immune memory is the cornerstone of the practice of influenza vaccination. Vaccination programs are established in almost all developed countries with different population targets. In general, most countries emphasize the need for vaccination in those over 65 years of age and other risk groups such as individuals with comorbidities. There are numerous reports in the literature that have studied the humoral response measured by specific antibodies against hemagglutinin protein (HAI titers) as a correlate of protection and vaccine efficacy after seasonal vaccination [5,6]. In recent years, several studies have emphasized the doctrine of original antigenic sin regarding the efficiency and effectiveness of seasonal vaccination [7–9]. However, few studies have studied humoral response measured by specific antibodies against neuraminidase (anti-NA Abs), a first-line viral target with hemagglutinin for the clearance of influenza virus infection [10].

One of the limitations in current inactivated influenza vaccines is that its formulation is only standardized for hemagglutinin (HA) content and thus, humoral responses induced by these vaccines are related primarily to HAI titers [11,12]. However, it is of growing interest in influenza viral neuraminidase (NA) and in the role of a humoral response mediated by anti-NA Abs as a correlate of protection against influenza infection [13–21]. The threat of the influenza virus increases the preparedness of protective immunity to pandemic and seasonal infection by vaccination. Furthermore, a growing number of studies claim to include or increase the amount of NA in influenza vaccine composition in order to provide broader vaccine immunogenicity [22–25]. Several questions remain that need to be further addressed for the future development of innovative and rapidly efficient vaccines strategies.

One of the objectives of the Consortium for the Standardization of Influenza Seroepidemiology (CONSISE) is to promote the study of humoral response against other viral proteins beyond the HA, such as the NA [26]. As far as we know, this is one of the few recent European studies published and is the first study in Spain analyzing the presence of Abs against NA and the humoral response mediated by anti-NA Abs after seasonal influenza vaccination. Spain is one of the European countries with higher rates of vaccination, especially in those over 65 years of age [27], and contributes to a larger number of samples for epidemiological influenza surveillance conducted through Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) [28]. In addition, certain National Influenza Centers (NICs), such as the NIC Valladolid, have extensive experience in the annual collection of sera- and sero-epidemiological analysis, not only against subtypes and current strains but also against old influenza viruses [29,30].

In this work, we have studied the baseline level of anti-NA antibodies and the immune response mediated by anti-NA Abs against classical and recent influenza A (H1N1) and A(H1N1) pdm09 strains after the vaccination with A/California/07/2009 (A(H1N1) subtype pdm09) in adults and the elderly population.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

A retrospective experimental study was designed, analyzing the presence of anti-NA Abs in pre- and post-vaccination serum samples from 160 individuals. The study population was classified according to the age of the elderly (≥ 65 years; $n_1 = 80$) and adults (15–64 years; $n_2 = 80$) groups. These individuals were recruited during the 2013–2014 and 2014–2015 influenza vaccination campaigns (IVCs) [31,32]. The type of seasonal influenza vaccine administered in the adult group was a trivalent inactivated vaccine (*Vaxigrip*[®], Sanofi Pasteur, Lyon, France) and an MF59-adjuvanted trivalent vaccine (*Chiromas*[®], Novartis, Siena, Italy) was used in the elderly group, in both IVCs. These seasonal influenza

vaccines included as a vaccine strain within subtype A(H1N1) to the strain A/California/07/2009 (subtype A(H1N1) pdm09) [31,32]. Pre-vaccination serum samples were obtained immediately prior to administration of the influenza vaccine and post-vaccine serum samples at least 28 days after its administration. Serological samples were obtained through physicians of the Sentinel Influenza Surveillance Network of Castile and Leon, Spain. Serological samples are sent annually to the National Influenza Center of Valladolid (Valladolid NIC) where these are analyzed. The collection of sera is regulated as part of a sero-epidemiological surveillance project through the Sentinel Influenza Surveillance Network of Castile and Leon (Spain), regulated through the Order SAN/1593/2006 of 13 October 2006. Informed consent was obtained and the recruitment of the Patients was done following the Spanish Organic Law for Data Protection, patient's rights and Obligations for clinical documents (BOE no. 298 of 14 December 1999, Law 41/2002). This research was performed following the Declaration of Helsinki.

2.2. Influenza Viruses Analyzed

The presence of anti-NA Abs was analyzed against five different strains of seasonal subtype A(H1N1) and against one strain of subtype A(H1N1) pdm09. Strains were as follows: A/PuertoRico/8/1934 (A/PR/8/1934), A/Weiss/1943, A/FortMonmouth/1/1947 (A/FM/1/1947), A/Brazil/11/1978, A/Brisbane/59/2007, and A/California/07/2009 (A(H1N1) pdm09). These strains were selected for their relevance with regard to subtype A (H1N1) influenza evolution since its origin in 1918 [2] till its extinction in 2009 with the emergence of a new pandemic subtype, the A(H1N1) pdm09 [4]. A/PR/8/1934, A/Weiss/1943, and A/FM/1/1947 strains are three representative classical strains before the reemergence of subtype H1 in 1977 with the emergence of the A/USSR/90/77 strain [33]. These three strains were also the first H1 flu strains that were included in the first vaccines used in humans. After its reemergence in 1977 until its end in 2009, two important classic subtype H1 seasonal strains were A/Brazil/11/1978 and A/Brisbane/59/2007 strains. A/Brisbane/59/2007 is also the last strain related to seasonal subtype A (H1N1) selected as a vaccine strain before the extinction of this seasonal subtype. A/California/07/2009 (pdm09) is the first strain related to pandemic subtype A(H1N1) selected as a vaccine strain. A/PR/8/1934 was provided by the National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC, London, UK) which was previously inactivated with beta-propiolactone for its use in BSL-II conditions. Egg-adapted strains A/Weiss/1943, A/FM/1/1947, and A/Brazil/11/1978 were supplied by the Francis Crick Institute WHO Collaboration Center London (London, UK). A/Brisbane/59/2007 and A/California/7/2009 were obtained from the kit of reagents in the identification of influenza isolates provided by the International Reagent Resource (IRR), USA. Viral strains were grown in chicken embryos for 72 h at 35 °C in the NIC Valladolid for obtaining a sufficient viral load for experiments and then stored in aliquots at −80 °C until use. Embryos were supplied by Lohmann Breeders (Valladolid, Spain).

2.3. Immunological and Virological Assays

The analysis of the presence of specific anti-neuraminidase Abs (anti-NA Abs) in pre- and post-vaccine serum samples was performed by means of an enzyme-linked serological assay lectin (ELLA) [34–36]. Originally developed by Lambré [34], the ELLA assay is based on the release of terminal sialic acid residues from the fetuin which is used as a substrate. The advantages are that it evaluates specific NA antibodies, offers better safety and sensitivity, and requires no hazardous reagents. Assay repeatability as well as intra- and inter-laboratory variability was assessed in an international study of the ELLA, conducted through the Consortium for the Standardization of Influenza Sero-Epidemiology (CONSISE), and the results were quite promising [26]. In this research, we determined the magnitude and distribution of neuraminidase antibody responses against the historic and current influenza A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 strains using the ELLA assay. As far as our knowledge, this is the first research in Spain that shows the results of human antibody response against neuraminidase. This practical method to measure anti-NA Abs titers (NAI titers) is

performed in 96-well plates coated with a large glycoprotein substrate, fetuin. NA cleaves terminal sialic acids from fetuin, exposing the penultimate sugar, galactose. Peanut agglutinin (PNA) is a lectin with specificity for galactose and, therefore, the extent of desialylation can be quantified using a PNA-horseradish peroxidase conjugate, followed by addition of a chromogenic peroxidase substrate. The optical density measured is proportional to NA activity. First, a neuraminidase assay was performed to determine the optimal virus concentration to be used in the ELLA assay. This neuraminidase assay was performed for all viral stocks. To measure anti-NA Abs, serial dilutions of sera were incubated at 37 °C overnight (16–18 h) on fetuin-coated plates with a fixed amount of each virus. The reciprocal of the highest serum dilution that results in $\geq 50\%$ inhibition of NA activity was designated as the NAI titer. The ELLA provides a practical format for the routine evaluation of human antibody responses following influenza infection or vaccination.

2.4. Phylogenetic Analysis

A phylogenetic analysis of the NA gene of the strains of subtype A(H1N1) and subtype A(H1N1) pdm09 was performed to study the phylogenetic relationships between those viruses. In that analysis, sequences of the complete NA gene of all strains included in the study were obtained from the database, Influenza Research Database (IRR), with the following accession numbers; A/PR/8/1934: 120393; A/Weiss/1943: 230628; A/FM/1/1947: 241812; A/Brazil/11/1978: 57807; A/Brisbane/59/2007: 502144; A/California/07/2009: 680484. The NA gene sequences were aligned using the ClustalW algorithm BioEdit 7.2.3. Phylogenetic analysis was performed using the MEGA 5.2 software (Mega Software, Tempe, AZ, USA) and the best nucleotide substitution model was predicted by the Best-Fit tool. The Hasegawa-Kishino-Yano model with gamma-distributed rates obtained the highest score Bayesian information criterion. The reproducibility of the phylogenetic tree was guaranteed by a bootstrap analysis of 1,000 replications. A genetic similarity matrix for the NA1 subunit was also constructed using the maximum-likelihood algorithm. The genetic similarity between the different influenza A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 viruses were expressed as a percentage of genetic homology (% of similarity/100).

2.5. Statistical Analysis

In the statistical analysis, parameters such as the seroprotection rate (SPR), seroconversion rate (SCR), and the Geometric Mean Titers (GMTs) were calculated. Seroconversion was defined as an increase of at least four-fold titers between pre- and post-vaccine serum samples. Although there is currently a lack of consensus assuming the exact value of specific protective antibody titers against NA, in this work, we have used similar correlates of protection as those used for HAI titers [20]. Seroprotection analysis was assessed in duplicate considering NAI titers over 1/40 and over 1/80. The negative results obtained in NAI titers were assumed as half of the detection value (1/10) for the calculation of the GMTs. The statistical analysis was performed using different parametric and non-parametric methods as Student T test, Pearson chi-square test and McNemar by means of SPSS V24 software (IBM, Armonk, NY, USA). Statistical significance was taken at the $p < 0.05$ value.

3. Results

3.1. Population Characteristics

The mean age of the groups recruited for this study was 51.0 years (CI95%: 48.2–53.4) in the adult group and 78.6 years (CI95%: 76.6–80.6) in the elderly group. Distribution of groups mean age by influenza vaccine campaign (IVC) was: 50.3 years (CI95%: 46.5–54.2) and 76.0 years (CI95%: 73.9–78.1) in the 2013–2014 IVC; and 51.6 years (CI95%: 48.2–54.7) and 81.2 years (CI95%: 78.3–83.9) in 2014–2015 IVC, in adults and the elderly group, respectively. Men comprised 43.8% and 48.8% of those individuals recruited during the 2013–2014 and 2014–2015 influenza vaccine campaigns, respectively.

3.2. Presence of Pre-Vaccine Anti-NA Abs Against A(H1N1) and A(H1N1) pdm09

The presence of pre-vaccine Abs anti-NA was detected against all strains of subtype A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 analyzed in both age groups. Pre-vaccine sera with titers $\geq 1/40$ and $\geq 1/80$ were observed in more than 81.3% and 67.5% of individuals in both population groups analyzed, see Figure 1.

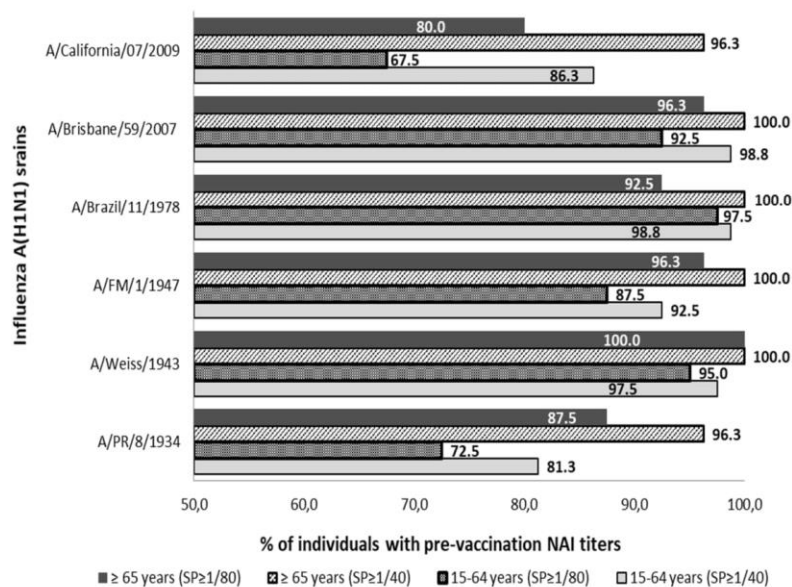


Figure 1. Percentage distribution of pre-vaccine sera with titers of anti-NA Abs (NAI titers) $\geq 1/40$ and $\geq 1/80$ against influenza strains of subtype A(H1N1) and subtype (H1N1) pdm09. SP; cut-off point NAI titers.

All individuals in the age group ≥ 65 years showed NAI titers $\geq 1/40$ against strains A/Weiss/1943, A/FM/1/1947, A/Brazil/11/1978, and A/Brisbane/59/2007. The lowest percentage of individuals ≥ 65 years with Abs $\geq 1/40$ was observed against strains A/PR/8/1934 and A/California/07/2009 ($n = 77$; 96.3%) in both cases. On the other hand, no virus against which all individuals aged 15–64 showed antibody titers $\geq 1/40$ was found. The highest percentage of adult individuals with titers of $\geq 1/40$ was against strains A/Brazil/11/1978 and A/Brisbane/59/2007 ($n = 79$; 98.8%) in both cases, and the percentage was lower against the strain A/PR/8/1934 ($n = 65$; 81.3%).

Analyzing both groups with the cut-off point for Abs titer in $\geq 1/80$, it was observed that all individuals of group ≥ 65 years showed titers $\geq 1/80$ against strain A/Weiss/1943. The lowest percentage of individuals ≥ 65 years with Abs to $\geq 1/80$ was observed against the strain A/California/07/2009 ($n = 64$; 80.0%). On the other hand, no virus was found against which all individuals aged 15–64 showed antibody titers $\geq 1/80$. The highest percentage of adult individuals with titers of $\geq 1/80$ was against the strain A/Brazil/11/1978 ($n = 78$; 97.5%) and the lowest rate was against the strain A/California/07/2009 ($n = 54$; 67.5%).

The percentage of individuals with titers $\geq 1/40$ was significantly higher in the elderly group than in the adult group against strains A/PR/8/1934, A/FM/1/1947 and A/California/07/2009 (Pearson chi-square; $p < 0.05$). These differences were also significantly higher in the elderly even when a titer

of $\geq 1/80$ was considered against strains A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 and A/FM/1/1947 (Pearson chi-square; $p < 0.05$).

The highest value of pre-vaccination GMTs in individuals ≥ 65 years was observed against strain A/Weiss/1943 (GMTs = 716.0; CI95%: 534.0–974.7) and lowest against the strain A/California/07/2009 (GMTs = 136.9; CI95%: 109.2–170.9) (Table 1). In the aged 15–64 years group, the highest GMTs was observed against strain A/Brazil/11/1978 (GMTs = 448.5; CI95%: 364.5–542.9) and lowest against A/California/07/2009 (GMTs = 100.2; CI95%: 79.3–127.7). GMTs was significantly higher in the elderly group against the A/PR/8/1934, A/Weiss/1943 and A/FM/1/1947 and significantly higher in adults than in elderly group against the strain A/Brazil/11/1978 (Student-T; $p < 0.05$). Significant differences in GMTs between both age groups against strains A/Brisbane/59/2007 and A/California/07/2009 were not found.

Table 1. Geometric Mean Titers (GMTs) of anti-NA antibodies in both age groups against A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 strains. Comparison between GMTs of the adult and elderly groups. (CI: confidence intervals).

A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 Strains	Anti-NA GMTs (CI 95%)		p-Value
	Adults (15–64 Years)	Elderly (≥ 65 Years)	
A/PR/8/1934	106.5 (81.2–137.7)	166.6 (131.1–209.9)	0.016
A/Weiss/1943	369.6 (269.9–485.7)	716.0 (534.0–974.7)	0.002
A/FM/1/1947	169.5 (128.3–215.5)	351.9 (283.9–434.4)	<0.001
A/Brazil/11/1978	448.5 (364.5–542.9)	269.0 (211.8–336.1)	0.001
A/Brisbane/59/2007	222.3 (179.5–276.4)	251.0 (211.4–296.5)	0.399
A/California/07/2009	100.2 (79.3–127.7)	136.9 (109.2–170.9)	0.066

3.3. Heterotypic Anti-NA Abs Response Induced by Influenza Seasonal Vaccination

Seasonal vaccination with the strain A/California/07/2009 (subtype A(H1N1) pdm09) induced a significant heterotypic anti-NA Abs response against all A(H1N1) subtype strains analyzed in both age groups (McNemar; $p < 0.05$). The highest heterologous seroconversion rates (SCR) were observed in the adult group against the strain A/Weiss/1943 (SCR = 31.3%) and against the strain A/Brisbane/59/2007 in the ≥ 65 years (SCR = 36.3%), see Table 2. The seroconversion rate was significantly higher in the elderly than in adults against the strain A/Brisbane/59/2007 and also significantly higher in adults than the elderly against the strain A/Weiss/1943 (Pearson chi-square; $p < 0.05$). Seasonal vaccination produced a homologous seroconversion against the strain included in the vaccine composition (A/California/07/2009) in 52.5% of adults ($n_1 = 42$) and 55% of individuals ≥ 65 years ($n_2 = 44$). No significant differences in SCR between both age groups against this strain were found (Pearson chi-square; $p < 0.05$).

Table 2. Number of seroconversions and seroconversion rate against classical influenza A(H1N1) strains and A(H1N1) pdm09 strain after seasonal flu vaccination.

A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 Strains	Adults (15–64 Years)		Elderly (≥ 65 Years)	
	SCN	SCR	SCN	SCR
A/PR/8/1934	7	8.8	9	11.3
A/Weiss/1943	25	31.3	11	13.8
A/FM/1/1947	17	21.3	10	12.5
A/Brazil/11/1978	12	15.0	15	18.8
A/Brisbane/59/2007	14	17.5	29	36.3
A/California/07/2009	42	52.5	44	55.0

SCN: Number of seroconversions; SCR: Seroconversion rate.

The percentual distribution of individuals with NAI titers $\geq 1/40$ and $\geq 1/80$ after seasonal vaccination is described in Figure 2. After vaccination, the SPR $\geq 1/40$ reached was over 92.5% and over 98.8% against all influenza strains studied in the adult and elderly groups, respectively. Considering those NAI titers over 1/80, the SPR $\geq 1/80$ reached was over 80.0% and over 95.0% against all influenza strains studied in the adult and elderly groups, respectively. Statistically significant differences between the SPR $\geq 1/40$ prior to and after vaccination were observed in the young-adult group against strains A/PR/8/1934 and A/California/07/2009 and in the elderly group against A/PR/1934 and A/California/2009 strains (McNemar; $p < 0.05$).

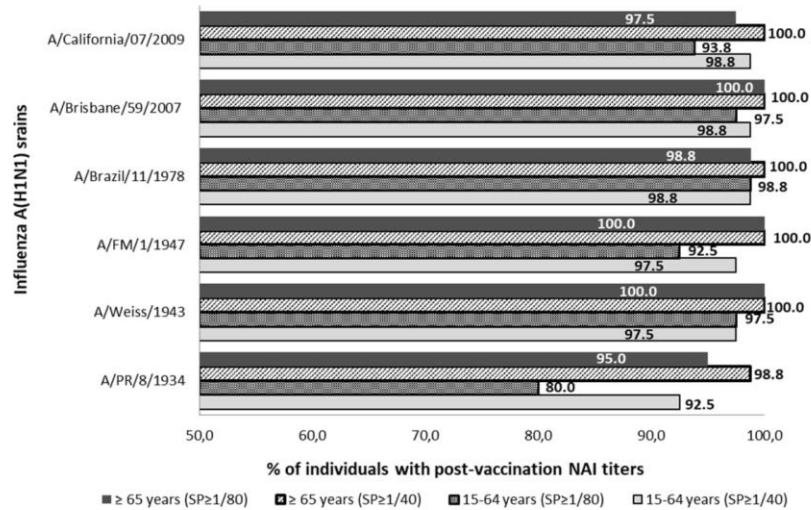


Figure 2. Percentage distribution of post-vaccine sera with NAI titers $\geq 1/40$ and $\geq 1/80$ against influenza strains of subtype A(H1N1) and subtype A(H1N1) pdm09. SP; cut-off point NAI titers.

Post-vaccination GMTs against the influenza A(H1N1) strains analyzed are described in Table 3. Post-vaccine GMTs observed were significantly higher against strains A/PR/8/1934, A/FM/1/1947, and A/Brisbane/59/2007 in the elderly rather than in the adult group. On the other hand, these post-vaccine GMTs were higher against the strain A/Brazil/11/1978 in adults than in the elderly group (Student-T; $p < 0.05$). The profile of pre-vaccine GMTs and its increase after seasonal influenza vaccination are shown in Figure 3.

Table 3. Geometric mean titers (GMTs) of anti-NA Abs against different influenza A(H1N1) strains after seasonal flu vaccination.

A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 Strains	Anti-NA GMTs (CI 95%) Post-vaccination (15–64 Years)	Anti-NA GMTs (CI 95%) Post-vaccination (≥ 65 Years)	p-Value
A/PR/8/1934	139.3 (109.3–176.8)	253.2 (202.6–315.1)	<0.001
A/Weiss/1943	858.9 (639.7–1115.6)	1,012.5 (772.2–1349.4)	0.402
A/FM/1/1947	331.2 (251.8–426.1)	542.6 (450.7–656.2)	0.002
A/Brazil/11/1978	685.6 (533.6–861.9)	464.3 (378.8–583.3)	0.012
A/Brisbane/59/2007	411.3 (326.5–515.2)	566.7 (471.4–677.2)	0.028
A/California/07/2009	342.8 (270.2–435.3)	460.3 (370.3–563.6)	0.077

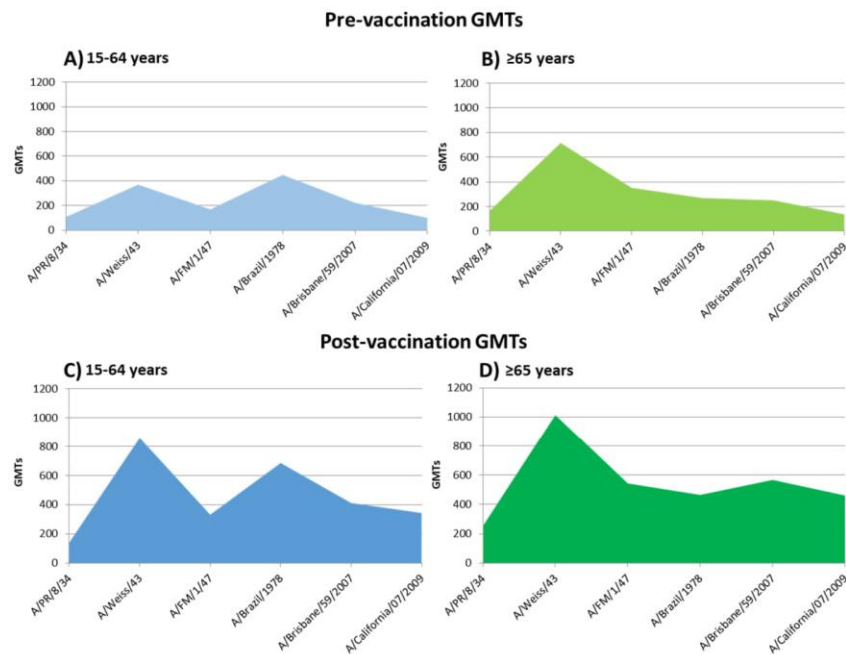


Figure 3. Profile of pre-vaccine GMTs and its increase after seasonal influenza vaccination. (A): pre-vaccine GMTs of 15–64 years group; (B): pre-vaccine GMTs of the elderly group; (C): post-vaccine GMTs of 15–64 years group; (D): post-vaccine GMTs of the elderly group.

3.4. Phylogenetic Analysis of Influenza Viruses Studied

The percentages of genetic similarity (% of similarity/100) of the NA gene between the different influenza A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 viruses analyzed are described in Table 4. Genetic homology of the NA gene observed between the different strains studied was over 85%. The highest genetic homology observed was between A/Weiss/1943 and A/FM/1/1947 strains (96.7%) and the lowest was the genetic homology observed between A/PR/8/1934 and A/Brisbane/59/2007 strains (85.6%). The pandemic strain A/California/07/2009 (subtype A(H1N1) pdm09) showed a genetic homology with seasonal strains (H1N1) between 72.1% (A/Brisbane/59/2007) and 76.4% (A/FM/1/1947). The phylogenetic tree constructed by using the NA gene of all viruses analyzed is shown in Figure 4.

Table 4. Genetic similarity expressed as a percentage of similarity/100 of the NA1 subunit of the neuraminidase gene between the different influenza A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 strains analyzed.

A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 Strains	A/California/07/2009	A/Brisbane/59/2007	A/Brazil/11/1978	A/FM/1/1947	A/Weiss/1943	A/PR/8/1934
A/California/07/2009	1.000	-	-	-	-	-
A/Brisbane/59/2007	0.721	1.000	-	-	-	-
A/Brazil/11/1978	0.762	0.909	1.000	-	-	-
A/Weiss/1943	0.764	0.857	0.929	1.000	-	-
A/Brisbane/59/2007	0.752	0.864	0.941	0.967	1.000	-
A/PR/8/1934	0.753	0.856	0.920	0.938	0.950	1.000

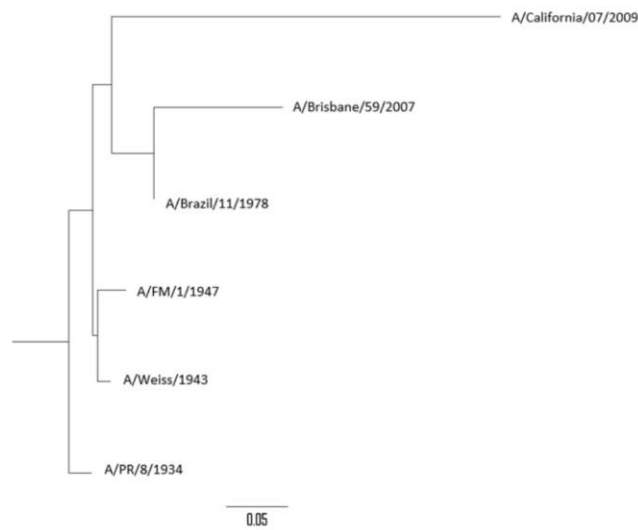


Figure 4. Phylogenetic tree of the neuraminidase (NA) gene of influenza A(H1N1) strains analyzed.

4. Discussion

The efficacy of serological protection against influenza viruses has traditionally been related to the production of neutralizing Abs specifically against the hemagglutinin (HA). The immunogenicity of currently licensed influenza vaccines is focused on the content of the HA antigen, without giving greater importance to the content of other viral proteins. Purification methods of these vaccines are intended to preserve the HA structure but not the NA. Because of this, the total amount of NA in these vaccines is unknown and is not standardized [12]. Currently licensed influenza vaccines contain purified and standardized HA but also contain residual NA antigen [37–39].

The humoral responses after seasonal vaccination measured as anti-HA Abs production (hemagglutination inhibition [HAI]) are widely described in scientific literature, but less is known about the humoral response to the NA induced by these vaccines. There are published works that study the role of anti-NA Abs for the protection against influenza viruses in animal and human studies [20,23,40,41]. However, there are few studies that analyze the NA antibody responses provided by the current seasonal influenza vaccination in different human populations [42]. As far as our knowledge, this is the first research in Spain that studies the anti-NA Abs response prior to and after vaccination with seasonal influenza vaccines.

Our data demonstrate the existence of a high percentage of adults and elderly people showing Abs against NA1 neuraminidase of the influenza A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 analyzed strains. The elderly people were the age group with the highest seroprotection rate against those viruses. The demonstration of the presence of these anti-NA Abs is relevant. Despite the fact that the origin of these Abs is unknown in both age groups, it can be as a result of two different causes. These Abs could have been induced by past influenza infections by different A(H1N1) subtype strains, and our results would demonstrate that immune memory also happens for the NA protein [18,21]. However, these Abs could be induced by previous vaccinations with related influenza strains that have generated heterotypic responses against all the strains analyzed.

Pre-vaccine GMTs were significantly higher in the elderly than in adults against A/PR/8/1934, A/Weiss/1943, and A/FM/1/1947 strains. On the other hand, GMTs were significantly higher in

adults than the elderly for A/Brazil/11/1978 strain. These differences can be caused by the first contacts of these age groups against influenza. Taking the age of the elderly people analyzed, they were probably primed by viruses that circulated during the 1930s or 1940s, which were descendent from the Spanish Influenza. On the other hand, adults were probably primed by A(H1N1) viruses that circulated after their re-emergence in 1977. In this context, the first time that a person comes into contact with an influenza virus can be crucial and can condition the following interactions with other influenza viruses. This phenomenon is known as the “Doctrine of original antigenic sin” and has been described for the humoral response to the influenza hemagglutinin [7–9], but not for the neuraminidase. The data from our study show that this interesting effect also occurs against NA. As far as we know, this is the first work that demonstrates this particularity for this protein. In short, our study represents a reflection of group immunity correlated with age and with an individual’s first influenza infection in their life, demonstrating that the Original Antigenic Sin is also closely related to the humoral response to NA. Further research is needed to compare HA with NA when the original antigenic sin in the influenza virus is mentioned.

The results of our study demonstrate that seasonal vaccination against the A/California/07/2009 strain (A(H1N1) pdm09 subtype) induced significant homologous and heterologous humoral responses to NA1 against all A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 strains analyzed in this work, both in adults and in the elderly. This response occurs despite the fact that the vaccine does not have a standardized amount of NA in its composition [37–39].

Seasonal vaccination induced homologous seroconversion against NA of subtype A(H1N1) pdm09 in more than half of the individuals in both age groups. Influenza vaccination also induced heterotypic seroconversion in NAI titers against A(H1N1) strains analyzed not included in the seasonal vaccine. This heterotypic anti-NA Abs response may be due to the high genetic homology between the NA protein of both A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 influenza subtypes (more than 70%). The NA protein is present at the surface of the influenza virus and shows a lower mutation rate than HA [10,43]. Thus, the NA protein can remain without antigenic changes for longer times than HA. This lower variability of NA allows the existence of conserved epitopes in NAs proteins of the same clade [44], favoring the heterotypic reactions. Because of this, the results of our study not only show that seasonal influenza vaccines against the A(H1N1) pdm09 subtype induced a humoral response against a protein that is not standardized in their composition, the NA, but also induced interesting heterotypic responses. This emphasizes the importance of the design of future influenza vaccines based on the NA protein or standardizing their content in the currently used seasonal vaccines. Since the main objectives of the design of future influenza vaccines are an increase in the heterotypic responses (universal vaccine) and also include new viral targets for inducing wider humoral responses, these results show that NA is one of the most promising targets to address these requirements. Further research is needed to determine how these influenza vaccines could induce heterotypic humoral protection against other viruses containing NA1 neuraminidase, like A(H5N1), as it has been described against viral hemagglutinin [29].

There are certain circumstances in which the response to vaccines may turn out to be lower than expected, as in the case of the elderly population with the immune senescence [45–48]. However, compared to adults, the immune senescence seems to not be appreciated in our study. The seroconversion after vaccination was similar in both age groups with no significant differences for most of the viruses analyzed. However, we observed statistically significant differences in the SCR after vaccination against the A/Weiss/1943 strain, being higher in the adults. This is surprising because adults have never been in contact with these viruses since they have born after 1960. This issue is probably a bias caused by the high pre-vaccine NAI titers of the elderly, which could have hindered the NAI titers increasing as much as in adults, which showed lower pre-vaccine GMTs. These results seem to show that the conserved structure of NA could have been mitigating the effect of immune senescence, which can be interesting for influenza vaccination.

The GMTs achieved after vaccination doubled in many cases that which was observed before vaccination against almost all strains in both groups. This demonstrates the ability of a seasonal influenza vaccine to raise the Abs titers against NA, an aspect that we believe should be taken into account for the design of future influenza vaccines.

The results of our study show that seasonal influenza vaccines (SIV) increase NAI titers in a large percentage of the population analyzed despite the fact that SIV does not include a standardized content of NA in its composition. The implication of this anti-NA Abs response in terms of serological protection against the influenza virus cannot be evaluated using the methodology used, so it is necessary to conduct studies *in vivo* to determine the effectiveness of a hypothetical influenza vaccine that contains a standardized amount of NA. Previous studies have evaluated the presence of anti-NA Abs and their relationship to immunological protection against influenza, both in animals and humans exposed to the influenza viruses [20,23,40,41]. Our data and data from previous studies support that humoral immunity based on the NA plays an important role in the protection against flu and that the NA antigen should be taken into account for the design of future influenza vaccines.

Among the limitations of this study, it should be noted that complete viruses have been used with native forms of HA and NA from human seasonal A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 strains. According to some authors, the ELLA assay can be interfered by preexisting antibodies against HA through different mechanisms of steric hindrance between the anti-HA antibodies and the NA [49], artificially increasing NAI titers. Because of this, some results of our study may overestimate NAI titers by the possible presence of Abs against H1 [36]. However, the use of chimeric viruses containing exotic haemagglutinin as H6Nx for the evaluation of anti-NA Abs may also be limited by the presence of heterotypic antibodies in the analyzed population. Our group has previously demonstrated that a moderate percentage of the population ≥ 65 years have heterotypic antibodies at protective titers against the globular head of the HA of non-seasonal influenza viruses such as H5 and H9 [29]. These antibodies were present as a result of imprinting with seasonal influenza viruses, as H1 and H2, during their life. These heterotypic antibodies have also been observed by other authors [50]. H5 and H9 subtypes belong to clade 1 of the HA and present similar or even less genetic homology than the H6 subtype with respect to human seasonal influenza viruses H1 and H2. Given the fact that these heterotypic antibodies are commonly found in exposed and vaccinated populations, it is difficult to evaluate the extent of the interaction of these heterotypic antibodies in the ELLA assay when using exotic and native hemagglutinins.

Despite the fact that HA antibodies could be artificially increasing titers of the anti-NA antibodies in this study by steric hindrance, we think that this effect is limited. In this regard, it is worth commenting on some aspects of the architecture of the envelope of influenza viruses in relation to HA and NA. Firstly, some authors suggest that the neutralization ability of the stem-specific anti-HA antibodies could be limited by the disposition of the HA on the surface of the influenza virus, due to their limited access to the membrane-proximal epitopes [51,52]. Also, the immune subdominance of the HA stem could affect the production of specific antibodies against this region [53]. While some authors demonstrated by computational methods that the HA structure in the virion surface does not limit the access of the stem-specific antibodies to the membrane-proximal epitopes [54], the immune subdominance of the stem region of the HA implies a lower production and variety of antibodies with respect to the HA globular head. This issue also affects the steric hindrance between HA and NA, since this effect can be mitigated by the limited number and variety of these antibodies. Secondly, the arrangement of HA and NA on the surface of the virion occurs in the form of patches, in which several proteins of the same class are arranged (HA on one side and NAs on others). In these patches, there are several NAs together and only those that are part of the outside of the patch are those that can suffer the steric hindrance effect with the HAs that are immediately close to NA. In fact, in some cases, even the NAs are situated near to an ion channel or M2 protein. Because of this, the steric hindrance effect produced by the anti-HA antibodies present in the serum would only occur against the NAs situated outside of these patches.

Also, in this work, we have used two cut-off points assimilating NAI titers over 1/40 and over 1/80 due to lack of consensus assuming the exact value on the seroprotection against NA. There are some studies that have determined equivalent seroprotection correlates between both proteins [18–20], so the results of this study provide information on this type of comparison to the studies already available. The analysis of the antibodies against NA in a human model prior to vaccination and those induced by the seasonal vaccine in this study offer an interesting point of view on how the humoral immune response happens in the reality after vaccination. The publication of new studies such as this will allow for the comparison and analysis of the anti-NA Abs response in terms of humoral protection and vaccine serological efficacy.

5. Conclusions

In summary, the presence of Abs at protective titers against the NA of A(H1N1) and A(H1N1) pdm09 subtypes were frequently found in both populations studied, adults and the elderly. The higher titers of anti-NA Abs were detected more frequently against classical influenza A(H1N1) strains according to the age of the first flu infection. In this way, an Original Antigenic Sin related to NA seems to be present. Although seasonal influenza vaccines do not contain a standardized amount of NA, at least 28% of vaccinated adults and elderly showed increased NAI titers. Seasonal vaccination containing A/California/07/2009 strain (A(H1N1) pdm09) induced homologous anti-NA Abs response against A(H1N1) pdm09 subtype but also heterologous responses against classical strains of A(H1N1) subtype. Knowledge of these responses to vaccination can contribute to the design of new influenza vaccines that expand the protection against proteins that are non-standardized in seasonal influenza vaccines. The results of our study demonstrate that NA antigen could be included in the Next Generation Influenza Vaccines. Further research is needed to understand the link of NAI titers and its correlation with HAI titers in protection, as well as the optimal dose of NA antigen to generate that response.

Author Contributions: I.S. and R.O.d.L. designed the experiments; J.M.M.-L. and I.S. recruited the serum samples; J.M.M.-L. performed the experiments; I.S., J.M.M.-L. and R.O.d.L. analyzed the data; J.M.M.-L. and Iván Sanz wrote the manuscript; R.O.d.L. revised the manuscript. All authors have accepted the publication of this article.

Funding: This research did not receive any funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Smith, W.; Andrewes, C.H.; Laidlaw, P.P. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* **1933**, *222*, 66–68. [[CrossRef](#)]
2. Taubenberger, J.K.; Morens, D.M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 15–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Liu, M.; Zhao, X.; Hua, S.; Du, X.; Peng, Y.; Li, X.; Lan, Y.; Wang, D.; Wu, A.; Shu, Y.; et al. Antigenic Patterns and Evolution of the Human Influenza A (H1N1) Virus. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14171. [[CrossRef](#)]
4. Kong, W.; Wang, F.; Dong, B.; Ou, C.; Meng, D.; Liu, J.; Fan, Z.C. Novel reassortant influenza viruses between pandemic (H1N1) 2009 and other influenza viruses pose a risk to public health. *Microb. Pathog.* **2015**, *89*, 62–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cox, R.J. Correlates of protection to influenza virus, where do we go from here? *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 405–408. [[CrossRef](#)]
6. Coudeville, L.; Bailleux, F.; Riche, B.; Megas, F.; Andre, P.; Ecochard, R. Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: Development and application of a bayesian random-effects model. *BMC Med. Res. Methodol.* **2010**, *10*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kucharski, A.J.; Gog, J.R. The role of social contacts and original antigenic sin in shaping the age pattern of immunity to seasonal influenza. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Henry, C.; Palm, A.-K.E.; Krammer, F.; Wilson, P.C. From Original Antigenic Sin to the Universal Influenza Virus Vaccine. *Trends Immunol.* **2018**, *39*, 70–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Kim, J.H.; Skountzou, I.; Compans, R.; Jacob, J. Original antigenic sin responses to influenza viruses. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 3294–3301. [[CrossRef](#)]
10. Wohlbold, T.J.; Krammer, F. In the shadow of hemagglutinin: A growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen. *Viruses* **2014**, *6*, 2465–2494. [[CrossRef](#)]
11. Ohmit, S.E.; Petrie, J.G.; Cross, R.T.; Johnson, E.; Monto, A.S. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 1879–1885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wong, S.-S.; Webby, R.J. Traditional and new influenza vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 476–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Halbherr, S.J.; Ludersdorfer, T.H.; Ricklin, M.; Locher, S.; Berger Rentsch, M.; Summerfield, A.; Zimmer, G. Biological and protective properties of immune sera directed to the influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* **2015**, *89*, 1550–1563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wohlbold, T.J.; Chromikova, V.; Tan, G.S.; Meade, P.; Amanat, F.; Comella, P.; Hirsh, A.; Krammer, F. Hemagglutinin Stalk- and Neuraminidase-Specific Monoclonal Antibodies Protect against Lethal H10N8 Influenza Virus Infection in Mice. *J. Virol.* **2016**, *90*, 851–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wilson, J.R.; Guo, Z.; Reber, A.; Kamal, R.P.; Music, N.; Gansebom, S.; Bai, Y.; Levine, M.; Carney, P.; Tzeng, W.P.; et al. An influenza A virus (H7N9) anti-neuraminidase monoclonal antibody with prophylactic and therapeutic activity in vivo. *Antivir. Res.* **2016**, *135*, 48–55. [[CrossRef](#)]
16. Johansson, B.E.; Bucher, D.J.; Kilbourne, E.D. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. *J. Virol.* **1989**, *63*, 1239–1246.
17. Rockman, S.; Brown, L.E.; Barr, I.G.; Gilbertson, B.; Lowther, S.; Kachurin, A.; Kachurina, O.; Klippel, J.; Bodle, J.; Pearse, M. Neuraminidase-inhibiting antibody is a correlate of cross-protection against lethal H5N1 influenza virus in ferrets immunized with seasonal influenza vaccine. *J. Virol.* **2013**, *87*, 3053–3061. [[CrossRef](#)]
18. Couch, R.B.; Atmar, R.L.; Franco, L.M.; Quarles, J.M.; Wells, J.; Arden, N.; Niño, D.; Belmont, J.W. Antibody Correlates and Predictors of Immunity to Naturally Occurring Influenza in Humans and the Importance of Antibody to the Neuraminidase. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 974–981. [[CrossRef](#)]
19. Monto, A.S.; Petrie, J.G.; Cross, R.T.; Johnson, E.; Liu, M.; Zhong, W.; Levine, M.; Katz, J.M.; Ohmit, S.E. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. *J. Infect. Dis.* **2015**, *212*, 1191–1199. [[CrossRef](#)]
20. Memoli, M.J.; Shaw, P.A.; Han, A.; Czajkowski, L.; Reed, S.; Athota, R.; Bristol, T.; Fargis, S.; Risos, K.; Powers, J.H.; et al. Evaluation of Antihemagglutinin and Antineuraminidase Antibodies as Correlates of Protection in an Influenza A/H1N1 Virus Healthy Human Challenge Model. *mBio.* **2016**, *7*, e00417-16. [[CrossRef](#)]
21. Marcelin, G.; DuBois, R.; Rubrum, A.; Russell, C.J.; McElhaney, J.E.; Webby, R.J. A contributing role for anti-neuraminidase antibodies on immunity to pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kendal, A.P.; Noble, G.R.; Dowdle, W.R. Neuraminidase content of influenza vaccines and neuraminidase antibody responses after vaccination of immunologically primed and unprimed populations. *J. Infect. Dis.* **1977**, *136*, S415–S424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Powers, D.C.; Kilbourne, E.D.; Johansson, B.E. Neuraminidase-specific antibody responses to inactivated influenza virus vaccine in young and elderly adults. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1996**, *3*, 511–516. [[PubMed](#)]
24. Kendal, A.P.; Bozeman, F.M.; Ennis, F.A. Further studies of the neuraminidase content of inactivated influenza vaccines and the neuraminidase antibody responses after vaccination of immunologically primed and unprimed populations. *Infect. Immun.* **1980**, *29*, 966–971. [[PubMed](#)]
25. Marcelin, G.; Sandbulte, M.R.; Webby, R.J. Contribution of antibody production against neuraminidase to the protection afforded by influenza vaccines. *Rev. Med. Virol.* **2012**, *22*, 267–279. [[CrossRef](#)]
26. Eichelberger, M.C.; Couzens, L.; Gao, Y.; Levine, M.; Katz, J.; Wagner, R.; Thompson, C.I.; Höschler, K.; Laurie, K.; Bai, T. Comparability of neuraminidase inhibition antibody titers measured by enzyme-linked lectin assay (ELLA) for the analysis of influenza vaccine immunogenicity. *Vaccine* **2016**, *34*, 458–465. [[CrossRef](#)]
27. Annual Public Health and Economic Benefits of Seasonal Influenza Vaccination: A European Estimate. BMC Public Health [Internet]. 2014. Available online: <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-14-813> (accessed on 3 December 2018).

28. Influenza Virus Characterisation, Summary Europe, June 2017 [Internet]. Available online: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterisation-summary-europe-june-2017> (accessed on 3 December 2018).
29. Sanz, I.; Rojo, S.; Tamames, S.; Eiros, J.M.; Ortiz de Lejarazu, R. Heterologous Humoral Response against H5N1, H7N3, and H9N2 Avian Influenza Viruses after Seasonal Vaccination in a European Elderly Population. *Vaccines* **2017**, *5*, 17. [CrossRef]
30. Ortiz de Lejarazu, R.; Landínez, R. Importancia epidemiológica de la nueva variante de virus gripal A/USSR/90/77. *Laboratorio* **1978**, *66*, 339–350.
31. WHO. Recommended Composition of Influenza Virus Vaccines for Use in the 2013–2014 Northern Hemisphere Influenza Season. [Internet]. 2013. Available online: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_14_north/en/ (accessed on 13 November 2018).
32. WHO. Recommended Composition of Influenza Virus Vaccines for Use in the 2014–2015 Northern Hemisphere Influenza Season. [Internet]. 2014. Available online: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_15_north/en/ (accessed on 13 November 2018).
33. Kozlov, J.V.; Gorbulev, V.G.; Kurmanova, A.G.; Bayev, A.A.; Shilov, A.A.; Zhdanov, V.M. On the origin of the H1N1 (A/USSR/90/77) influenza virus. *J. Gen. Virol.* **1981**, *56*, 437–440. [CrossRef]
34. Lambré, C.R.; Terzidis, H.; Greffard, A.; Webster, R.G. Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates. *J. Immunol. Methods*. **1990**, *135*, 49–57. [CrossRef]
35. Couzens, L.; Gao, J.; Westgeest, K.; Sandbulte, M.; Lugovtsev, V.; Fouchier, R.; Eichelberger, M. An optimized enzyme-linked lectin assay to measure influenza A virus neuraminidase inhibition antibody titers in human sera. *J. Virol. Methods* **2014**, *210*, 7–14. [CrossRef] [PubMed]
36. Gao, J.; Couzens, L.; Eichelberger, M.C. Measuring Influenza Neuraminidase Inhibition Antibody Titers by Enzyme-linked Lectin Assay. *J. Vis. Exp. JoVE* **2016**, *115*, 54573. [CrossRef] [PubMed]
37. Creskey, M.C.; Li, C.; Wang, J.; Girard, M.; Lorbetskie, B.; Gravel, C.; Farnsworth, A.; Li, X.; Smith, D.G.; Cyr, T.D. Simultaneous quantification of the viral antigens hemagglutinin and neuraminidase in influenza vaccines by LC-MSE. *Vaccine* **2012**, *30*, 4762–4770. [CrossRef] [PubMed]
38. Tanimoto, T.; Nakatsu, R.; Fuke, I.; Ishikawa, T.; Ishibashi, M.; Yamanishi, K.; Takahashi, M.; Tamura, S.I. Estimation of the neuraminidase content of influenza viruses and split-product vaccines by immunochromatography. *Vaccine* **2005**, *23*, 4598–4609. [CrossRef] [PubMed]
39. Aymard, M.; Aymard, M. Quantification of neuramidase (NA) protein content. *Vaccine* **2002**, *20*, S59–S60. [CrossRef]
40. Johansson, B.E.; Moran, T.M.; Bona, C.A.; Popple, S.W.; Kilbourne, E.D. Immunologic response to influenza virus neuraminidase is influenced by prior experience with the associated viral hemagglutinin. II. Sequential infection of mice simulates human experience. *J. Immunol.* **1987**, *139*, 2010–2014. [PubMed]
41. Wohlbold, T.J.; Nachbagauer, R.; Xu, H.; Tan, G.S.; Hirsh, A.; Brokstad, K.A.; Cox, R.J.; Palese, P.; Krammer, F. Vaccination with adjuvanted recombinant neuraminidase induces broad heterologous, but not heterosubtypic, cross-protection against influenza virus infection in mice. *MBio* **2015**, *6*, e02556. [CrossRef] [PubMed]
42. Marcelin, G.; Bland, H.M.; Negovetich, N.J.; Sandbulte, M.R.; Ellebedy, A.H.; Webb, A.D.; Griffin, Y.S.; DeBeauchamp, J.L.; McElhaney, J.E.; Webby, R.J. Inactivated Seasonal Influenza Vaccines Increase Serum Antibodies to the Neuraminidase of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 Virus in an Age-Dependent Manner. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 1634–1638. [CrossRef]
43. Eichelberger, M.C.; Wan, H. Influenza neuraminidase as a vaccine antigen. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2015**, *386*, 275–299.
44. Air, G.M. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses* **2012**, *6*, 245–256. [CrossRef] [PubMed]
45. Gruver, A.L.; Hudson, L.L.; Sempowski, G.D. Immunosenescence of ageing. *J. Pathol.* **2007**, *211*, 144–156. [CrossRef] [PubMed]
46. Haralambieva, I.H.; Painter, S.D.; Kennedy, R.B.; Ovsyannikova, I.G.; Lambert, N.D.; Goergen, K.M.; Oberg, A.L.; Poland, G.A. The impact of immunosenescence on humoral immune response variation after influenza A/H1N1 vaccination in older subjects. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122282. [CrossRef] [PubMed]
47. Haq, K.; McElhaney, J.E. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *29*, 38–42. [CrossRef] [PubMed]

48. Pera, A.; Campos, C.; López, N.; Hassouneh, F.; Alonso, C.; Tarazona, R.; Solana, R. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas* **2015**, *82*, 50–55. [[CrossRef](#)]
49. Chen, Y.-Q.; Lan, L.Y.-L.; Huang, M.; Henry, C.; Wilson, P.C. Hemagglutinin stalk-reactive antibodies interfere with influenza virus neuraminidase activity by steric hindrance. *J. Virol.* **2018**, *93*, e01526-18. [[CrossRef](#)]
50. Gostic, K.M.; Ambrose, M.; Worobey, M.; Lloyd-Smith, J.O. Potent protection against H5N1 and H7N9 influenza via childhood hemagglutinin imprinting. *Science* **2016**, *354*, 722–726. [[CrossRef](#)]
51. Wyrzucki, A.; Bianchi, M.; Kohler, I.; Steck, M.; Hangartner, L. Heterosubtypic antibodies to influenza A virus have limited activity against cell-bound virus but are not impaired by strain-specific serum antibodies. *J. Virol.* **2015**, *89*, 3136–3144. [[CrossRef](#)]
52. Harris, A.; Cardone, G.; Winkler, D.C.; Heymann, J.B.; Brecher, M.; White, J.M.; Steven, A.C. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19123–19127. [[CrossRef](#)]
53. Tan, H.-X.; Jegaskanda, S.; Juno, J.A.; Esterbauer, R.; Wong, J.; Kelly, H.G.; Liu, Y.; Tilmanis, D.; Hurt, A.C.; Yewdell, J.W.; et al. Subdominance and poor intrinsic immunogenicity limit humoral immunity targeting influenza HA stem. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 850–862. [[CrossRef](#)]
54. Harris, A.K.; Meyerson, J.R.; Matsuoka, Y.; Kuybeda, O.; Moran, A.; Bliss, D.; Das, S.R.; Yewdell, J.W.; Sapiro, G.; Subbarao, K.; et al. Structure and accessibility of HA trimers on intact 2009 H1N1 pandemic influenza virus to stem region-specific neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 4592–4597. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anexos



**Consentimiento informado para la extracción de una muestra de suero pre-
vacunal y otra post-vacunal 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 2016

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,



ANEXO II

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

**FICHA DE REMISIÓN DE SUEROS PREVACUNALES Y POSTVACUNABLES
2016-2017**

ETIQUETA

Qué se debe recoger:

- *5 prevacunales
- *5 postvacunales, 4 semanas después de la vacunación.

IDENTIFICACIÓN:

Apellidos: _____ **Nombre:** _____

Edad: _____ **Sexo:** _____

EXTRACCIÓN:

1. • Prevacunal Fecha: __/__/__	Número código de barras (a etiqueta)
2. • Postvacunal 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: _____

Bibliografía

Bibliografía

1. Webster R, Monto A, Braciale TJ, Lamb R. Textbook of Influenza. 2.^a ed. 2013.
2. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science*. 2000;288:1051-3.
3. Bodewes R, Morick D, de Mutsert G, Osinga N, Bestebroer T, van der Vliet S, et al. Recurring influenza B virus infections in seals. *Emerging Infect Dis*. 2013;19:511-2.
4. 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;45:519-21.
5. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*. 1999;258:1-20.
6. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res*. 2009;143:147-61.
7. Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M, Zaborsky J, Feldblyum T, Subbu V, et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature*. 2005;437:1162-6.
8. Ortiz de Lejarazu R, Tamames S. Vacunación antigripal. Efectividad de las vacunas actuales y retos de futuro. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015;33:480-90.
9. Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochim Pol*. 2014;61:397-401.
10. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. 1992;56:152-79.
11. 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. *PNAS*. 2008;105:17736-41.
12. 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;333:426-31.
13. Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, et al. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *PNAS*. 2006;103:19123-7.

14. Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*. 1983;303:35-40.
15. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*. 1983;303:41-4.
16. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol*. 2019;10:39.
17. Ortiz de Lejarazu R, Sanz Muñoz I, Rojo Rello S, Cisterna Cáncer JR. Vacunas actuales frente a la gripe. En: *Los virus de la gripe Pandemias, epidemias y vacunas*. 1.^a ed. Amazing Books; 2019.
18. Ortiz de Lejarazu R. Vacunas de la Gripe y vacunación antigripal. *Perspectivas actuales*. En: *Plan de formación en gripe*. Ergon; 2006.
19. Rojo Rello S. Detección de gripe y otros virus respiratorios durante un periodo pandémico y postpandémico de nueva variante de gripe. Universidad de Valladolid; 2013.
20. Reina J. Factors affecting the virulence and pathogenicity of avian and human viral strains (influenza virus type A). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20:346-53.
21. Huang I-C, Li W, Sui J, Marasco W, Choe H, Farzan M. Influenza A Virus Neuraminidase Limits Viral Superinfection. *J Virol*. 2008;82:4834-43.
22. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol*. 2004;78:12665-7.
23. Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk HD. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol*. 2000;74:6316-23.
24. Ohuchi M, Feldmann A, Ohuchi R, Klenk HD. Neuraminidase is essential for fowl plague virus hemagglutinin to show hemagglutinating activity. *Virology*. 1995;212:77-83.
25. Antigenic shift and drift. *Nature*. 1980;283:524-5.
26. Both GW, Sleight MJ. Conservation and variation in the hemagglutinins of Hong Kong subtype influenza viruses during antigenic drift. *J Virol*. 1981;39:663-72.
27. Ito T, Couceiro JNSS, 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;72:7367-73.
28. Scholtissek C. Molecular epidemiology of influenza. *Arch Virol Suppl*. 1997;13:99-103.

29. Steinhauer DA, Skehel JJ. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet.* 2002;36:305-32.
30. 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.
31. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* 2014;22:183-91.
32. Wilson Smith MD, Andrewes MD, Laidlaw B. A virus obtained from influenza patients. *The Lancet.* 1933;222:66-8.
33. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 2009;459:931-9.
34. 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.
35. Duro Torrijos JL, Tuells J. La «gripe española» según el diario España Médica (1918-1919). *Vacunas.* 2015;16:81-6.
36. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infect Dis.* 2006;12:15-22.
37. Nelson MI, Viboud C, Simonsen L, Bennett RT, Griesemer SB, St. George K, et al. Multiple Reassortment Events in the Evolutionary History of H1N1 Influenza A Virus Since 1918. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000012.
38. Collins SD, Lehmann JL. Influenza epidemics during 1951-56 with a review of trends. *Public Health Rep.* 1957;72:771-80.
39. Salk JE, Suriano PC. Importance of Antigenic Composition of Influenza Virus Vaccine in Protecting against the Natural Disease. *Am J Public Health Nations Health.* 1949;39:345-55.
40. Kilbourne ED. Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:9-14.
41. 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 USA.* 2002;99:10748-52.
42. Nakajima S, Nishikawa F, Nakajima K. Comparison of the evolution of recent and late phase of old influenza A (H1N1) viruses. *Microbiol Immunol.* 2000;44:841-7.
43. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology.* 1978;87:13-20.

44. Raymond FL, Caton AJ, Cox NJ, Kendal AP, Brownlee GG. The antigenicity and evolution of influenza H1 haemagglutinin, from 1950-1957 and 1977-1983: two pathways from one gene. *Virology*. 1986;148:275-87.
45. 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.
46. 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;121:43-7.
47. Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science*. 2009;324:1557-61.
48. 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.
49. Ortiz de Lejarazu R, Méndez Legaza JM. Epidemia de gripe en la temporada 2016-2017. *Clínica*. 2017;26:11-20.
50. Farreras. Gripe. En: *Medicina Interna*. 16.^a ed. 2009. p. 2512-27.
51. Urgencias saturadas por la epidemia de gripe [Internet]. *La Vanguardia*. 2017 [citado 24 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.lavanguardia.com/vida/20170104/413091497070/urgencias-saturadas-epidemia-gripe.html>
52. OMS | Gripe por A (H1N1): preguntas frecuentes [Internet]. [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/csr/disease/swineflu/faq/es/#whyrevise>
53. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;378:1917-30.
54. Vigilancia de la Gripe en España. Temporada 2013-2014 (desde la semana 40/2013 hasta la semana 20/2014) [Internet]. [citado 25 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/894/1080>
55. Ortiz de Lejarazu R, Díez Domingo J, Gil de Miguel A, Martínón Torres F, Guzmán Quilo C, Guillén JM, et al. Description of Influenza B in seasonal epidemics in Spain. *Rev Esp Quimioter*. 2018;31:511-9.
56. Gripe: Evolución de la difusión geográfica en España | DSN [Internet]. [citado 25 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.dsn.gob.es/es/actualidad/sala-prensa/gripe-estacional-y-su-actividad>
57. Reina J. Factors affecting the virulence and pathogenicity of avian and human viral strains (influenza virus type A). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20:346-53.

58. O'Neill RE, Talon J, Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*. 1998;17:288-96.
59. Manzoor R, Igarashi M, Takada A. Influenza A Virus M2 Protein: Roles from Ingress to Egress. *Int J Mol Sci*. 2017;18.
60. Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. Cell-mediated Protection in Influenza Infection. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:48-54.
61. Kos FJ, Engleman EG. Role of natural killer cells in the generation of influenza virus-specific cytotoxic T cells. *Cell Immunol*. 1996;173:1-6.
62. 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;70:767-77.
63. Johansson BE, Cox MMJ. Johansson BE, Cox M. Influenza viral neuraminidase: the forgotten antigen. *Expert Rev. Vaccines* 10(12), 1683-1695 (2011). *Expert Rev Vaccines*. 2011;10:1683-95.
64. Marcelin G, Sandbulte MR, Webby RJ. Contribution of antibody production against neuraminidase to the protection afforded by influenza vaccines. *Rev Med Virol*. 2012;22:267-79.
65. Aymard-Henry M, Coleman MT, Dowdle WR, Laver WG, Schild GC, Webster RG. Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bull World Health Organ*. 1973;48:199-202.
66. Couzens L, Gao J, Westgeest K, Sandbulte M, Lugovtsev V, Fouchier R, et al. An optimized enzyme-linked lectin assay to measure influenza A virus neuraminidase inhibition antibody titers in human sera. *J Virol Methods*. 15 de 2014;210:7-14.
67. Gao J, Couzens L, Eichelberger MC. Measuring Influenza Neuraminidase Inhibition Antibody Titers by Enzyme-linked Lectin Assay. *J Vis Exp*. 2016;115.
68. Eichelberger MC, Couzens L, Gao Y, Levine M, Katz J, Wagner R, et al. Comparability of neuraminidase inhibition antibody titers measured by enzyme-linked lectin assay (ELLA) for the analysis of influenza vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 2016;34:458-65.
69. Schulman JL, Khakpour M, Kilbourne ED. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. *J Virol*. 1968;2:778-86.
70. Murphy BR, Kasel JA, Chanock RM. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *N Engl J Med*. 1972;286:1329-32.
71. Schild GC. Antibody against influenza A2 virus neuraminidase in human sera. *J Hyg (Lond)*. 1969;67:353-65.

72. Monto AS, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Liu M, Zhong W, et al. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. *J Infect Dis.* 2015;212:1191-9.
73. Memoli MJ, Shaw PA, Han A, Czajkowski L, Reed S, Athota R, et al. Evaluation of Antihemagglutinin and Antineuraminidase Antibodies as Correlates of Protection in an Influenza A/H1N1 Virus Healthy Human Challenge Model. *MBio.* 2016;7:e00417-00416.
74. Fritz R, Sabarth N, Kiermayr S, Hohenadl C, Howard MK, Ilk R, et al. A vero cell-derived whole-virus H5N1 vaccine effectively induces neuraminidase-inhibiting antibodies. *J Infect Dis.* 2012;205:28-34.
75. Chen Z, Kim L, Subbarao K, Jin H. The 2009 pandemic H1N1 virus induces anti-neuraminidase (NA) antibodies that cross-react with the NA of H5N1 viruses in ferrets. *Vaccine.* 2012;30:2516-22.
76. Easterbrook JD, Schwartzman LM, Gao J, Kash JC, Morens DM, Couzens L, et al. Protection against a lethal H5N1 influenza challenge by intranasal immunization with virus-like particles containing 2009 pandemic H1N1 neuraminidase in mice. *Virology.* 2012;432:39-44.
77. Sandbulte MR, Westgeest KB, Gao J, Xu X, Klimov AI, Russell CA, et al. Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *PNAS.* 2011;108:20748-53.
78. Thomas Francis, Jr. On the Doctrine of Original Antigenic Sin. *Proc Am Philos Soc.* 1960;104:572-8.
79. Henry C, Palm A-KE, Krammer F, Wilson PC. From Original Antigenic Sin to the Universal Influenza Virus Vaccine. *Trends Immunol.* 2018;39:70-9.
80. Monto AS, Malosh RE, Petrie JG, Martin ET. The Doctrine of Original Antigenic Sin: Separating Good From Evil. *J Infect Dis.* 2017;215:1782-8.
81. Park MS, Kim JI, Park S, Lee I, Park M-S. Original Antigenic Sin Response to RNA Viruses and Antiviral Immunity. *Immune Netw.* 2016;16:261-70.
82. Cobey S, Hensley SE. Immune history and influenza virus susceptibility. *Curr Opin Virol.* 2017;22:105-11.
83. ECDC. Priority risk groups for Influenza vaccination [Internet]. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/prevention-and-control#riskgroups>
84. Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T, Black SV, Walker RE, Hultquist M, et al. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N Engl J Med.* 2007;356:685-96.
85. Ashkenazi S, Vertruyen A, Arístegui J, Esposito S, McKeith DD, Klemola T, et al. Superior relative efficacy of live attenuated influenza vaccine compared with inactivated influenza vaccine in young children with recurrent respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25:870-9.

86. Wong S-S, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:476-92.
87. Talbot HK, Nian H, Zhu Y, Chen Q, Williams JV, Griffin MR. Clinical effectiveness of split-virion versus subunit trivalent influenza vaccines in older adults. *Clin Infect Dis.* 2015;60:1170-5.
88. Domnich A, Arata L, Amicizia D, Puig-Barberà J, Gasparini R, Panatto D. Effectiveness of MF59-adjuvanted seasonal influenza vaccine in the elderly: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine.* 2017;35:513-20.
89. Izurieta HS, Thadani N, Shay DK, Lu Y, Maurer A, Foppa IM, et al. Comparative effectiveness of high-dose versus standard-dose influenza vaccines in US residents aged 65 years and older from 2012 to 2013 using Medicare data: a retrospective cohort analysis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:293-300.
90. Puig-Barberà J, Natividad-Sancho A, Calabuig-Pérez J, Lluch-Rodrigo JA, Pastor-Villalba E, Martínez-Úbeda S, et al. Intradermal and virosomal influenza vaccines for preventing influenza hospitalization in the elderly during the 2011–2012 influenza season: A comparative effectiveness study using the Valencia health care information system. *Vaccine.* 2014;32:5447-54.
91. Beyer WEP, Palache AM, de Jong JC, Osterhaus ADME. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy. A meta-analysis. *Vaccine.* 2002;20:1340-53.
92. Johnson PR, Feldman S, Thompson JM, Mahoney JD, Wright PF. Immunity to influenza A virus infection in young children: a comparison of natural infection, live cold-adapted vaccine, and inactivated vaccine. *J Infect Dis.* 1986;154:121-7.
93. Brauer R, Chen P. Influenza Virus Propagation in Embryonated Chicken Eggs. *J Vis Exp.* 2015;e52421:1-6.
94. Lu B, Zhou H, Chan W, Kemble G, Jin H. Single amino acid substitutions in the hemagglutinin of influenza A/Singapore/21/04 (H3N2) increase virus growth in embryonated chicken eggs. *Vaccine.* 2006;24:6691-3.
95. Brands R, Visser J, Medema J, Palache AM, van Scharrenburg GJ. Influvac: a safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture-based influenza vaccine. *Dev Biol Stand.* 1999;98:93-100.
96. Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Eder G, et al. Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. *Dev Biol Stand.* 1999;98:101-10.
97. Halperin SA, Nestruck AC, Eastwood BJ. Safety and immunogenicity of a new influenza vaccine grown in mammalian cell culture. *Vaccine.* 1998;16:1331-5.
98. Gomez Lorenzo MM, Fenton MJ. Immunobiology of Influenza Vaccines. *Chest.* 2013;143:502-10.

99. Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S, Chen J-L. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1650.
100. Sanz Muñoz I. Respuesta humoral específica y heteróloga frente a virus de la gripe en vacunados. Universidad de Valladolid; 2016.
101. Ortiz JR, Hickling J, Jones R, Donabedian A, Engelhardt OG, Katz JM, et al. Report on eighth WHO meeting on development of influenza vaccines that induce broadly protective and long-lasting immune responses: Chicago, USA, 23-24 August 2016. *Vaccine.* 2018;36:932-8.
102. Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14:167-82.
103. Antrobus RD, Berthoud TK, Mullarkey CE, Hoschler K, Coughlan L, Zambon M, et al. Coadministration of seasonal influenza vaccine and MVA-NP+M1 simultaneously achieves potent humoral and cell-mediated responses. *Mol Ther.* 2014;22:233-8.
104. Kendal AP, Bozeman FM, Ennis FA. Further studies of the neuraminidase content of inactivated influenza vaccines and the neuraminidase antibody responses after vaccination of immunologically primed and unprimed populations. *Infect Immun.* 1980;29:966-71.
105. Gostic KM, Ambrose M, Worobey M, Lloyd-Smith JO. Potent protection against H5N1 and H7N9 influenza via childhood hemagglutinin imprinting. *Science.* 2016;354:722-6.
106. Coudeville L, Bailleux F, Riche B, Megas F, Andre P, Ecochard R. Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: development and application of a bayesian random-effects model. *BMC Med Res Methodol.* 2010;10:18.
107. Jagadesh A, Salam AAA, Mudgal PP, Arunkumar G. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Arch Virol.* 2016;161:2087-94.
108. Monto AS, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Liu M, Zhong W, et al. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. *J Infect Dis.* 2015;212:1191-9.
109. Wohlbold TJ, Krammer F. In the Shadow of Hemagglutinin: A Growing Interest in Influenza Viral Neuraminidase and Its Role as a Vaccine Antigen. *Viruses.* 2014;6:2465-94.
110. Eichelberger M, Golding H, Hess M, Weir J, Subbarao K, Luke CJ, et al. FDA/NIH/WHO public workshop on immune correlates of protection against influenza A viruses in support of pandemic vaccine development. *Vaccine* 2008;26,4299-4303.

111. Bright RA, Neuzil KM, Pervikov Y, Palkonyay L. WHO meeting on the role of neuraminidase in inducing protective immunity against influenza infection, Vilamoura, Portugal, September 14, 2008. *Vaccine*. 2009;27:6366-9.
112. Eichelberger MC, Wan H. Influenza neuraminidase as a vaccine antigen. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:275-99.
113. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol*. 2004;59:1-15.
114. Air GM. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses*. julio de 2012;6:245-56.
115. Jefferson T, Rivetti D, Rivetti A, Rudin M, Di Pietrantonj C, Demicheli V. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines in elderly people: a systematic review. *Lancet*. 2005;366:1165-74.
116. van der Werf S, Levy-Bruhl D. Influenza - the need to stay ahead of the virus. *Euro Surveill*. 2015;20:21030.
117. Trombetta CM, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. *Vaccines (Basel)*. 2014;2:707-34.
118. Trombetta CM, Montomoli E. Influenza immunology evaluation and correlates of protection: a focus on vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15:967-76.
119. WHO Global Influenza, Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011 [Internet]. [citado 3 de marzo de 2019]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf;jsessionid=AF0D8D527142C2ADB7419DEADD973152?sequence=1
120. Black S, Nicolay U, Vesikari T, Knuf M, Del Giudice G, Della Cioppa G, et al. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30:1081-5.
121. Ohmit SE, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Monto AS. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. *J Infect Dis*. 2011;204:1879-85.
122. Schild GC, Pereira MS, Chakraverty P. Single-radial-haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. *Bull World Health Organ*. 1975;52:43-50.
123. Russell SM, McCahon D, Beare AS. A single radial haemolysis technique for the measurement of influenza antibody. *J Gen Virol*. 1975;27:1-10.
124. Kitikoon P, Vincent AL. Microneutralization assay for swine influenza virus in swine serum. *Methods Mol Biol*. 2014;1161:325-35.

125. Lambré CR, Terzidis H, Greffard A, Webster RG. Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates. *J Immunol Methods*. 1990;135:49-57.
126. Gao J, Couzens L, Eichelberger MC. Measuring Influenza Neuraminidase Inhibition Antibody Titers by Enzyme-linked Lectin Assay. *J Vis Exp*. 2016: 54573.
127. Feery BJ, Evered MG, Hayes K. Homologous and heterologous antibody responses to subunit influenza virus vaccine. *J Hyg (Lond)*. 1978;81:331-6.
128. Gioia C, Agrati C, Castilletti C, Capobianchi MR, Martini F. Influenza pandemics, immune cross-reactivity, and pandemic control strategies. *J Infect Dis*. 2008;198:294-5.
129. DiMenna LJ, Ertl HCJ. Pandemic influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;333:291-321.
130. EMA. Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96) [Internet]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/note-guidance-harmonisation-requirements-influenza-vaccines_en.pdf
131. ¿Qué es la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León? [Internet]. Portal de Salud de la Junta de Castilla y León. [citado 1 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/centinelas/red-centinela-sanitaria-castilla-leon>
132. Orden SAN/620/2016, 30 de Junio 2016. Regulación, organización y funcionamiento de la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León. 2016. [Internet]. Disponible en: <https://www.saludcastillayleon.es/institucion/es/resumen-bocyl-legislacion-sanitaria/orden-san-620-2016-30-junio-regula-organizacion-funcionamie>
133. Parodi V, de Florentiis D, Martini M, Ansaldi F. Inactivated influenza vaccines: recent progress and implications for the elderly. *Drugs Aging*. 2011;28:93-106.
134. Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León. Procedimientos y documentación de la Red Centinela Sanitaria de Castilla y León [Internet]. 2011 [citado 25 de febrero de 2019]. Disponible en: www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/centinelas/redcentinela-sanitaria-castilla-leon.ficheros/84419-Procedimientos%20y%20documentaci%C3%B3n%20de%20la%20Red%20Centinela%20Sanitaria%20de%20Castilla%20y%20Le%C3%B3n_v%203_.pdf
135. Kong W, Wang F, Dong B, Ou C, Meng D, Liu J, et al. Novel reassortant influenza viruses between pandemic (H1N1) 2009 and other influenza viruses pose a risk to public health. *Microb Pathog*. 2015;89:62-72.
136. Goodpasture EW, Woodruff AM, Buddingh GJ. The cultivation of vaccine and other viruses in the chorioallantoic membrane of chick embryos. *Science*. 1931;74:371-2.

137. Karakus U, Cramer M, Lanz C, Yángüez E. Propagation and Titration of Influenza Viruses. *Methods Mol Biol.* 2018;1836:59-88.
138. Eichelberger M. Assays to assess antibody responses to influenza neuraminidase [Internet]. [citado 2 de mayo de 2019]. Disponible en: https://consise.tghn.org/site_media/media/articles/NA_inhibition_assays_3_Sept_2013_pdf.pdf
139. Salk JE. A Simplified Procedure for Titrating Hemagglutinating Capacity of Influenza-Virus and the Corresponding Antibody. *Journal of Immunology.* 1944;49:87-98.
140. Caracterización antigénica. CDC [Internet]. 2019 [citado 5 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/professionals/antigenic.htm>
141. Sanz I, Rojo S, Tamames S, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Heterologous Humoral Response against H5N1, H7N3, and H9N2 Avian Influenza Viruses after Seasonal Vaccination in a European Elderly Population. *Vaccines.* 2017;5.
142. Sanz I, Rojo S, Tamames S, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Antibodies against 1940s era a/H1N1 influenza strains a/Weiss/43 and a/FM/1/47 and heterotypic responses after seasonal vaccination of an elderly Spanish population. *Immunity & Ageing.* 2018;15:9.
143. Mendez-Legaza J, Ortiz de Lejarazu R, Sanz I. Heterotypic neuraminidase antibodies against different A(H1N1) strains are elicited after seasonal influenza vaccination. *Vaccines (Basel).* 2019;7.
144. Couch RB, Atmar RL, Franco LM, Quarles JM, Wells J, Arden N, et al. Antibody Correlates and Predictors of Immunity to Naturally Occurring Influenza in Humans and the Importance of Antibody to the Neuraminidase. *J Infect Dis.* 2013;207:974-81.
145. Van Bellinghen L-A, Meier G, Van Vlaenderen I. The potential cost-effectiveness of quadrivalent versus trivalent influenza vaccine in elderly people and clinical risk groups in the UK: a lifetime multi-cohort model. *PLoS ONE.* 2014;9:e98437.
146. Amos García, Ortiz de Lejarazu R, Reina J, Callejo D, Cuervo J, Morano R. Análisis coste-efectividad de la vacuna antigripal tetravalente en España. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2016;12:2269-77.
147. Jefferson T, Di Pietrantonj C, Rivetti A, Bawazeer GA, Al-Ansary LA, Ferroni E. Vaccines for preventing influenza in healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;CD001269.
148. Castilla J, Godoy P, Domínguez A, Martínez-Baz I, Astray J, Martín V, et al. Influenza vaccine effectiveness in preventing outpatient, inpatient, and severe cases of laboratory-confirmed influenza. *Clin Infect Dis.* 2013;57:167-75.
149. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Informe de Vigilancia de la Gripe en España Temporada 2014-2015 (Desde la semana

40/2014 hasta la semana 20/2015) [Internet]. [citado 3 de marzo de 2019]. Disponible en: http://www.isciii.es/isciii/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf_2015/Informe_Vigilancia_GRIPE_2014-2015_vf_29092015.pdf

150. Ferrucci L, Guralnik JM, Pahor M, Corti MC, Havlik RJ. Hospital diagnoses, Medicare charges, and nursing home admissions in the year when older persons become severely disabled. *JAMA*. 1997;277:728-34.
151. Fleming DM, Cross KW, Pannell RS. Influenza and its relationship to circulatory disorders. *Epidemiol Infect*. 2005;133:255-62.
152. Simonsen L, Fukuda K, Schonberger LB, Cox NJ. The impact of influenza epidemics on hospitalizations. *J Infect Dis*. 2000;181:831-7.
153. Prevention and control of seasonal influenza [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. [citado 3 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/prevention-and-control>
154. Wan H, Gao J, Xu K, Chen H, Couzens LK, Rivers KH, et al. Molecular basis for broad neuraminidase immunity: conserved epitopes in seasonal and pandemic H1N1 as well as H5N1 influenza viruses. *J Virol*. 2013;87:9290-300.
155. Wan H, Yang H, Shore DA, Garten RJ, Couzens L, Gao J, et al. Structural characterization of a protective epitope spanning A(H1N1)pdm09 influenza virus neuraminidase monomers. *Nat Commun*. 2015;6:6114.
156. Wyrzucki A, Bianchi M, Kohler I, Steck M, Hangartner L. Heterosubtypic antibodies to influenza A virus have limited activity against cell-bound virus but are not impaired by strain-specific serum antibodies. *J Virol*. 2015;89:3136-44.
157. Rajendran M, Nachbagauer R, Ermler ME, Bunduc P, Amanat F, Izikson R, et al. Analysis of Anti-Influenza Virus Neuraminidase Antibodies in Children, Adults, and the Elderly by ELISA and Enzyme Inhibition: Evidence for Original Antigenic Sin. *MBio*. 2017;8.
158. Haq K, McElhaney JE. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. *Curr Opin Immunol*. 2014;29:38-42.
159. 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:e0122282.
160. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol*. 2007;211:144-56.
161. 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;82:50-5.

162. Dorrington MG, Bowdish DME. Immunosenescence and novel vaccination strategies for the elderly. *Front Immunol.* 2013;4:171.
163. Creskey MC, Li C, Wang J, Girard M, Lorbetskie B, Gravel C, et al. Simultaneous quantification of the viral antigens hemagglutinin and neuraminidase in influenza vaccines by LC-MSE. *Vaccine.* 2012;30:4762-70.
164. Tanimoto T, Nakatsu R, Fuke I, Ishikawa T, Ishibashi M, Yamanishi K, et al. Estimation of the neuraminidase content of influenza viruses and split-product vaccines by immunochromatography. *Vaccine* 23(37),4598-4609 (2005). *Vaccine.* 2005;23:4598-609.
165. Aymard M. Aymard M. Quantification of neuramidase (NA) protein content. *Vaccine* 20(Suppl. 2), S59-S60 (2002). *Vaccine.* 2002;20:59-60.
166. Couch RB, Atmar RL, Keitel WA, Quarles JM, Wells J, Arden N, et al. Randomized comparative study of the serum antihemagglutinin and antineuraminidase antibody responses to six licensed trivalent influenza vaccines. *Vaccine.* 2012;31:190-5.
167. Skowronski DM, De Serres G. Role of Egg-adaptation Mutations in Low Influenza A(H3N2) Vaccine Effectiveness During the 2012-2013 Season. *Clin Infect Dis.* 2018;67:1474-6.
168. Levine MZ, Martin ET, Petrie JG, Lauring AS, Holiday C, Jefferson S, et al. Antibodies Against Egg- and Cell-Grown Influenza A(H3N2) Viruses in Adults Hospitalized During the 2017-2018 Influenza Season. *J Infect Dis.* 2019;219:1904-12.
169. Izurieta HS, Chillarige Y, Kelman J, Wei Y, Lu Y, Xu W, et al. Relative effectiveness of cell-cultured and egg-based influenza vaccines among the U.S. elderly, 2017-18. *J Infect Dis.* 2018.
170. 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;88:10986-9.
171. 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;361:1945-52.
172. 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;375:1100-8.
173. Kendal AP, Noble GR, Dowdle WR. Neuraminidase content of influenza vaccines and neuraminidase antibody responses after vaccination of immunologically primed and unprimed populations. *J Infect Dis.* 1977;136:415-24.

174. Krammer F, Fouchier RAM, Eichelberger MC, Webby RJ, Shaw-Saliba K, Wan H, et al. NAction! How Can Neuraminidase-Based Immunity Contribute to Better Influenza Virus Vaccines? *MBio*. 2018;9.
175. Potter CW, Oxford JS. Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br Med Bull*. 1979;35:69-75.
176. Potter CW, Jennings R, Nicholson K, Tyrrell DA, Dickinson KG. Immunity to attenuated influenza virus WRL 105 infection induced by heterologous, inactivated influenza A virus vaccines. *J Hyg (Lond)*. 1977;79:321-32.
177. Salk JE, Pearson HE. Immunization against influenza with observations during an epidemic of influenza A one year after vaccination. *Am J Hyg*. 1945;42:307-22.
178. A clinical evaluation of vaccination against influenza: preliminary report. *JAMA*. 1944;124:982-5.
179. Sandbulte MR, Jimenez GS, Boon ACM, Smith LR, Treanor JJ, Webby RJ. Cross-reactive neuraminidase antibodies afford partial protection against H5N1 in mice and are present in unexposed humans. *PLoS Med*. 2007;4:e59.
180. EMA. Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96). 1997. [Internet]. [citado 16 de diciembre de 2018]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/note-guidance-harmonisation-requirements-influenza-vaccines_en.pdf.
181. Chen Y-Q, Lan LY-L, Huang M, Henry C, Wilson PC. Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies Interfere with Influenza Virus Neuraminidase Activity by Steric Hindrance. *J Virol*. 2019;93.
182. Sautto GA, Kirchenbaum GA, Ross TM. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal. *Virol J*. 2018;15:17.
183. Tan H-X, Jegaskanda S, Juno JA, Esterbauer R, Wong J, Kelly HG, et al. Subdominance and poor intrinsic immunogenicity limit humoral immunity targeting influenza HA stem. *J Clin Invest*. 2019;129:850-62.
184. Harris AK, Meyerson JR, Matsuoka Y, Kuybeda O, Moran A, Bliss D, et al. Structure and accessibility of HA trimers on intact 2009 H1N1 pandemic influenza virus to stem region-specific neutralizing antibodies. *PNAS*. 2013;110:4592-7.
185. Shcherbik S, Carney P, Pearce N, Stevens J, Dugan VG, Wentworth DE, et al. Monoclonal antibody against N2 neuraminidase of cold adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) enables efficient generation of live attenuated influenza vaccines. *Virology*. 2018;522:65-72.
186. Piepenbrink MS, Nogales A, Basu M, Fucile CF, Liesveld JL, Keefer MC, et al. Broad and Protective Influenza B Virus Neuraminidase Antibodies in Humans after Vaccination and their Clonal Persistence as Plasma Cells. *MBio*. 2019;10.

187. Clements ML, O'Donnell S, Levine MM, Chanock RM, Murphy BR. Dose response of A/Alaska/6/77 (H3N2) cold-adapted reassortant vaccine virus in adult volunteers: role of local antibody in resistance to infection with vaccine virus. *Infect Immun.* 1983;40:1044-51.
188. Wohlbold TJ, Krammer F. In the Shadow of Hemagglutinin: A Growing Interest in Influenza Viral Neuraminidase and Its Role as a Vaccine Antigen. *Viruses.* 2014;6:2465-94.

