



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Máster en Investigación en Ciencias de la Salud.
Farmacología, Neurobiología y Nutrición

Curso 2012-2013

Proyecto Fin de Máster

Análisis del estado de inmunización de la población
mayor de 65 años de Castilla y León frente al virus de la
Gripe Aviar H5N1

Autor
Iván Sanz Muñoz

Tutor
Dra. Raquel Almansa Mora

Índice

1. Introducción	7
a. Descripción general de la Gripe.....	9
b. Historia	9
c. Clasificación y nomenclatura	11
d. Estructura del virus	11
e. Síntomas y signos.....	13
f. Epidemiología	13
g. Métodos de diagnóstico.....	14
h. Virus de carácter pandémico.....	15
i. Inmunidad cruzada	16
2. Hipótesis y objetivos.....	19
3. Materiales y métodos	23
a. Materiales.....	24
i. Diseño del estudio	24
ii. Recopilación de datos epidemiológicos.....	24
iii. Almacenamiento y conservación de muestras.....	24
iv. Criterios de inclusión	26
v. Stock de virus y antígenos.....	26
vi. Vacunas utilizadas.....	27
b. Métodos	28
i. Fundamento del ensayo de Inhibición de Hemaglutinación.....	28
ii. Lavado y preparación de la sangre para su uso.....	28
iii. Eliminación de inhibidores inespecíficos de la sangre.....	29
iv. Titulación de las cepas de Gripe	29
v. Inhibición de Hemaglutinación.....	30
vi. Interpretación de datos	31
4. Resultados.....	33
a. Características clínicas y epidemiológicas de los sueros	35
b. Evaluación del estado de inmunidad de la población frente a los virus de la Gripe.....	36
c. Evaluación de la respuesta inmunológica frente a la vacunación antigripal por temporadas.....	39
d. Eficacia de la vacunación	45
e. Evaluación de la inmunidad cruzada frente al virus de la gripe aviar H5N1	47

5. Discusión	51
a. Características clínicas de los sueros.....	54
b. Evaluación de la respuesta inmunológica frente a la vacunación antigripal anual.....	55
c. Evaluación de la respuesta inmunológica frente a la vacunación antigripal por temporadas.....	57
i. Niveles de protección en la etapa de pre inmunización.....	57
ii. Niveles de protección en la etapa de post inmunización	58
iii. Niveles de seroconversión	60
d. Evaluación de la inmunidad cruzada frente al virus de la gripe aviar H5N1	60
6. Conclusiones.....	65
7. Bibliografía	69

Introducción

Descripción general de la gripe

La gripe es una enfermedad infecciosa febril aguda causada por los virus de la Gripe A, B y C, que por lo general es de resolución espontánea. Provoca brotes epidemiológicos de distinta incidencia e intensidad cada invierno, con tasas que oscilan entre el 10 y el 40% de la población durante un periodo de unas 5-6 semanas. La gripe es una de las principales enfermedades infecciosas que se producen en los meses invernales. Eventualmente pueden surgir variantes nuevas por recombinación genética que den lugar al origen de virus de tipo pandémico, cuya vigilancia es muy importante debido al potencial riesgo para la población humana.

Historia

El virus de la gripe es un agente etiológico cuyo conocimiento histórico no ha sido especialmente relevante hasta el siglo XX, con el comienzo de la gran pandemia de Gripe Española de 1918. Datos anteriores de carácter histórico apuntan a que este virus producía al menos una epidemia cada tres años desde finales del siglo XII hasta el siglo XIX¹. La pandemia de Gripe Española que se produjo entre los años 1918 y 1919 en tres oleadas, produjo cerca de 21 millones de muertes en todo el mundo², lo que provocó que el interés por este patógeno comenzara.

El comienzo de la experimentación y descubrimiento de lo que había provocado este evento a escala global comenzaron en el año 1933 gracias a Smith y colaboradores³, que lograron aislar el virus de la Gripe A mediante su inoculación en hurones. Posteriormente en 1939, Francis aisló el virus de la Gripe B⁴, y por último, en 1950 Taylor aisló el virus de la Gripe C⁵. Los posteriores hallazgos que se realizaron en el siglo XX fueron relevantes para conocer las distintas herramientas de diagnóstico que han llegado hasta nuestros días. Así por ejemplo, Burnet, logró en 1936 inocular y crecer el virus de la Gripe en embrión vivo de pollo⁶, pudiendo recoger posteriormente el virus para su uso, técnica que actualmente aun se realiza con el fin de obtener carga viral suficiente con fines experimentales y en industria farmacéutica para la propagación y obtención de vacunas.

Posteriormente, en la década de 1950 se desarrollaron los sistemas y protocolos de cultivo celular para crecimiento del virus de la Gripe⁷, que actualmente aun se siguen usando como método diagnóstico y con fines de investigación. En 1941, Hirst desarrollo la técnica de la inhibición de la hemaglutinación⁸, protocolo que en la actualidad se sigue utilizando para investigación y en la rama de la epidemiología para el conocimiento de las variedades circulantes en las diferentes estaciones epidémicas, cuantificación del virus y de los anticuerpos circulantes en la población. Esta técnica posee una especial relevancia ya que permite una gran versatilidad y una obtención de resultados muy sólidos en estudio con los virus de la Gripe. Ya durante esta década, en 1940 se realizaron los primeros ensayos relacionados con la efectividad de las vacunas utilizando virus inactivados⁹, desechando la idea de utilizar virus vivos que se había estado barajando desde el descubrimiento de este agente patógeno¹⁰, no permitiéndose su utilización por primera vez hasta el año 2003 (Figura 1).

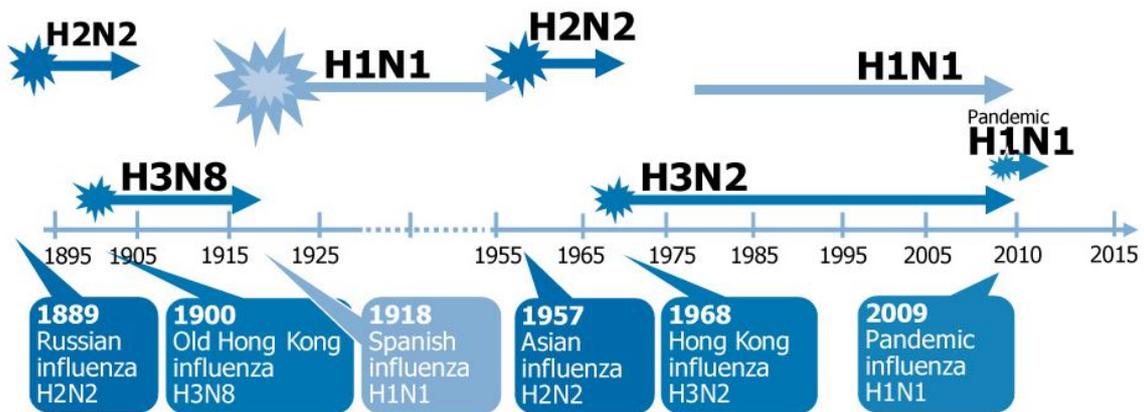


Figura 1. Evolución de los virus de la Gripe humana desde 1895. Extraído de European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) 2009.

En la actualidad, el virus de la Gripe es un virus que se controla anualmente a través de una amplia y extensa red de laboratorios adheridos a la OMS, denominados Centros Nacionales de Gripe, cuya labor es la vigilancia epidemiológica de estos virus con el fin de diseñar estrategias de control y prevención para controlar la infección natural. La aparición de un nuevo virus de la Gripe triple recombinante en México en el año 2009 puso en alarma a toda la comunidad internacional ante la primera pandemia el siglo XXI. Actualmente, este virus se ha convertido en un virus de carácter estacional que infecta a los humanos de forma epidémica y supone un ligero riesgo para la población, sobre todo para los grupos de riesgo. Sin embargo, la aparición espontánea y rápida de un virus recombinante con alta capacidad de diseminación entre la población humana ha dado un toque de alerta a los servicios de prevención de enfermedades infecciosas ante la posible aparición de variantes letales de la Gripe, que puedan desarrollarse de forma pandémica, como son los actuales H5N1 o el H7N9.

Durante el año 1997, la OMS registró un brote de gripe aviar en la ciudad de Hong Kong, que traspasó la barrera de especie logrando infectar a humanos afectando a 18 personas y matando a seis de ellas. La causa de este brote se identificó como el virus de la Gripe A H5N1 de origen aviar de alta patogenicidad (IAAP)²¹. Esto supuso el sacrificio de más de 2 millones de aves entre los días 30 y 31 de Diciembre de ese mismo año^{22, 23}. Posteriormente, esta misma cepa reapareció de nuevo en el año 2003 y durante el año 2006 surgieron los primeros casos en Europa, causando ataques mortales en Turquía y detectándose casos en aves de Austria, Grecia, Alemania y Francia²⁴, documentándose después en gran parte de los países europeos, bien en aves salvajes o en granjas avícolas.

El conocimiento durante el siglo pasado de toda la biología de los virus de la Gripe ha permitido diseñar herramientas de control y prevención que en un futuro podrían ser muy útiles ante el riesgo de diseminación de nuevas variantes de carácter pandémico.

Clasificación y nomenclatura

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se subdivide en tres grupos diferentes en función de las diferencias antigénicas principales con carácter filogenético (A, B y C), siendo los del grupo A los más variados y más relevantes para la clínica, seguidos por los del grupo B que pueden causar epidemias esporádicas. Los virus del grupo C no causan epidemias y su prevalencia es muy débil.

Los virus de la gripe A son enfermedades zoonóticas que tienen al ser humano también como hospedador, sin embargo los virus del grupo B y C son virus eminentemente humanos que tienen otros hospedadores mamíferos puntuales como el perro o el cerdo. La nomenclatura de este virus se realiza en función del grupo al que pertenezca, el lugar del primer aislamiento, el número correlativo de la cepa y el año del aislamiento. Así por tanto el virus H3N2 que actualmente es endémico de España y que causa epidemias estacionales entre los meses de Noviembre a Mayo se denomina A/Victoria/361/2011.

Por otra parte, la clasificación y nomenclatura de los virus de la Gripe A subdivide este grupo en función de la hemaglutinina y neuraminidasa que posean. En la actualidad existen un total de 16 hemaglutininas y 9 neuraminidasas diferentes. La nomenclatura y clasificación de los virus de Gripe B deriva de su separación en dos linajes desde la década de los 70, denominándose actualmente Victoria y Yamagata, y no producen pandemias.

Estructura del virus

El virus de la gripe se compone de una envuelta proteica con forma esférica de unos 80-120 nm, donde se encuentran la mayor parte de proteínas que tienen capacidad inmunogénica, y un interior donde se encuentra alojado el material genético, proteínas estructurales y codificantes. El virus de la gripe es un virus RNA compuesto por ocho cadenas independientes que codifican 11 proteínas distintas: Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (NA), Nucleoproteína (NP), M1 (proteína matriz del núcleo viral), proteína del canal iónico (M2), NS2 (proteína transportadora), PA, PB1, PB1-F2 y PB2 (polimerasas y retrotranscriptasas). A diferencia de otros virus RNA que utilizan la maquinaria celular para su retrotranscripción y posterior copia, como los retrovirus, los virus de la Gripe poseen todas las enzimas necesarias para llevar a cabo una replicación eficiente de su material genético dentro de la célula huésped, llevando a cabo la infección para poder llevar a cabo la replicación en un entorno controlado.

Las dos principales proteínas que poseen importancia tanto clínica (por su función), como epidemiológica (por su evolución), son la Hemaglutinina y la Neuraminidasa. Estas dos proteínas de superficie se encuentran en una proporción variable dispuestas en la bicapa lipídica y son vitales a la hora de ensamblar y desensamblar el virus con la envuelta celular del huésped. Por su parte, la hemaglutinina es la encargada del reconocimiento celular por parte del virus para su ingreso dentro de la célula huésped y la descarga del material genético. En la actualidad existen 16 hemaglutininas distintas que poseen la habilidad de infectar a distintos grupos taxonómicos animales. La hemaglutinina se sintetiza en forma de monómero

estructura altamente conservada en todos los virus de Gripe A, es un elemento diana para la detección de Gripe A mediante técnicas de RT-PCR.

Síntomas y signos

El comienzo de la etapa sintomática de la enfermedad es de tipo súbito posteriormente a 1-2 días de incubación. Cursa comúnmente con escalofríos, fiebre alta, mialgias, cefalea, dolor ocular, tos no productiva, odinofagia y rinorrea. La duración en pacientes inmunocompetentes no suele alargarse más de 7 días, aunque los síntomas de convalecencia tales como astenia, malestar general y tos pueden durar hasta 2 semanas. Algunos de los casos son subclínicos y no presentan síntomas relevantes, incluso pudiéndose confundir con un resfriado común.

En el caso de Gripe grave, las complicaciones más frecuentes son neumonías primarias por infección gripal, neumonías secundarias asociadas a bacterias^{13, 14}, complicaciones derivadas de episodios de exacerbación de EPOC¹⁵ y de asma¹⁶, u otros menos comunes como el Síndrome de Reye y encefalitis¹⁷. Es de especial relevancia también el efecto que posee la gripe en pacientes inmunodeprimidos, sobre todo como vehículos de periodos de larga excreción viral y como fuente de mutaciones debido a la gran actividad replicativa.

La transmisión del virus de la Gripe es de forma inter-personal a través del contacto con secreciones respiratorias infectadas, como pueden ser aerosoles de partículas de gran tamaño^{18, 19}.

Epidemiología

Los virus de la Gripe generalmente poseen un comportamiento epidémico estacional cuyos picos de incidencia máxima en nuestra latitud se restringen entre los meses de Enero a Abril. Por lo general, las cepas de Gripe A suelen producir epidemias anuales donde puede existir una o varias variantes circulando. Sin embargo, la irrupción de nuevas cepas originarias de procesos de origen pandémico puede alterar esta dinámica general, como ocurrió durante el año 2009 con la aparición de la nueva variante de gripa pandémica H1N1pdm09. Esta generación de una nueva variante puede acontecer con la eliminación o desplazamiento de cepas anteriores de características antigénicas similares como ocurrió posteriormente a este último evento pandémico, donde la antigua cepa H1N1 fue sustituida por la cepa pandémica H1N1pdm09.

En cuanto a la Gripe B, generalmente causa episodios epidémicos cada 2 o 3 años donde puede ser el principal protagonista, aunque generalmente encontrándose en compañía de otras cepas de Gripe A en circulación. En ningún caso pueden producir pandemias. Por su parte, la Gripe C no causa epidemias y sus casos son esporádicos, no presentándose en todas las temporadas.

El periodo de vigilancia epidemiológica se extiende desde la semana 40 de un año hasta la semana 20 del siguiente (generalmente primera semana de Octubre hasta la cuarta semana de Mayo). La vigilancia epidemiológica en Castilla y León se realiza a través de una Red Centinela de Vigilancia Epidemiológica (RCVECyL) que posee una red de médicos de atención primaria que ante un caso sospechoso de Gripe remiten muestras respiratorias en forma de frotis faríngeo al centro de referencia, en este caso el Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Posteriormente, el flujo de trabajo comenzará con un subtipado e identificación de las muestras y la posterior remisión de estas al Centro Nacional de Gripe de Valladolid para su cultivo y caracterización por técnicas clásicas como el ensayo de Inhibición de hemaglutinación.

El periodo epidémico normalmente comienza de forma brusca después de un periodo previo más o menos largo donde se detectan casos esporádicos de Gripe. La duración de este pico suele ser de aproximadamente 5-6 semanas, alcanzando el valor máximo en torno a la segunda o tercera semana²⁰.

La curva de prevalencia de Gripe por edades dibuja un típico patrón en forma de U, donde existe dos picos máximos de incidencia en las edades más tempranas de la vida de un individuo (edad infantil) y en los individuos mayores de 60-65 años. Aun siendo estas dos etapas las que más prevalencia poseen, el virus de la Gripe ataca fundamentalmente a niños, debido principalmente a la ausencia de inmunidad adquirida mediante vacunaciones o mediante infecciones naturales causado por la corta edad de estos pacientes. Sin embargo, la mortalidad es mucho mayor en pacientes ancianos, debido a las complicaciones derivadas de un sistema inmunológico senescente y al estado de salud general de estos individuos.

Métodos de diagnóstico

En la actualidad existe una amplia gama de técnicas para el diagnóstico del virus de la gripe. En la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico, la técnica de elección es el diagnóstico molecular mediante RT-PCR, que mediante un paso de retrotranscripción y una amplificación posterior va a permitir la detección de cantidades muy pequeñas de material genético del virus desde una muestra directa y en un espacio relativamente corto de tiempo (5-6 horas). Para este fin existen diferentes plataformas con tecnologías diferentes a la hora de detectar el material genético.

En la virología clásica de Gripe se incluyen técnicas de cultivo celular que son mucho más antiguas pero que actualmente se siguen realizando en el laboratorio de microbiología como herramienta diagnóstica para la detección de virus gripales. El cultivo celular es una técnica mucho menos sofisticada pero que permite también tener una amplia gama de resultados que no puede ofrecer la PCR. En el cultivo celular vamos a permitir al virus que se encuentre en la muestra clínica infectar líneas celulares preestablecidas, que harán crecer el número de viriones para permitir que el virus sea detectable, y posteriormente serán teñidos con anticuerpos monoclonales fluorescentes para su detección a través de un microscopio de fluorescencia. Estos cultivos celulares a su vez nos permiten aumentar la carga viral y posteriormente recuperar cepas que pueden servir en un futuro para el diagnóstico más

pormenorizado o incluso para la inclusión en las vacunas estacionales de los virus que han circulado en una temporada.

Como anexo al cultivo celular se encuentran las técnicas de Inhibición de hemaglutinación, que son técnicas que utilizando la capacidad hemaglutinante de la proteína hemaglutinina del virus, van a permitir detectar y cuantificar el virus de la gripe usando hematíes de diferentes especies animales como sustrato. Pese a ser una técnica muy antigua⁸, en la actualidad se usa para el control epidemiológico en los Centros Nacionales de Gripe a nivel internacional.

Todas las técnicas descritas anteriormente requieren de instalaciones de bioseguridad de Clase II, con campanas de flujo laminar, a excepción de si el trabajo se realiza con cepas altamente patogénicas como virus de la Gripe aviar H5N1 donde se necesitan instalaciones de bioseguridad de Clase III y/o de Clase IV.

Por último, las técnicas de identificación rápida se usan comúnmente a nivel ambulatorio o en hospitales de pequeña categoría que no dispongan de instalaciones para realizar las técnicas anteriormente mencionadas. Estas técnicas de inmunocromatografía se realizan con reactivos comerciales preparados que permiten una rápida aproximación al resultado, aunque en algunos casos con escasa fiabilidad ofreciendo falsos negativos, y por lo tanto la mayoría de las veces requiriendo una certificación posterior con alguna otra técnica de referencia.

Virus de carácter pandémico

En la actualidad existen un gran número de cepas de Gripe que poseen potencial pandémico. Las aves en estado salvaje son un gran reservorio para un gran número de virus de la Gripe, además de que se encuentran también en otras especies animales. Algunas de los virus que actualmente producen brotes localizados son cepas de H5, H7 y H9 fundamentalmente. Sin embargo, se baraja la posibilidad de que virus que causaron pandemias históricas, como el H2N2 en 1957 (Pandemia de Gripe Asiática), puedan volver a causar otro episodio si volvieran a emerger²⁵.

El contacto del ser humano con especies aviares debido a la actividad comercial e industrial es un foco continuo que puede preceder a la generación de un virus con capacidad de replicarse con eficacia entre humanos. Los actuales virus de origen aviar no poseen la habilidad de transmitirse con eficacia entre distintos individuos humanos debido a que la distancia filogenética entre ambos grupos animales no permite una adhesión eficiente de las hemaglutininas aviares a los receptores de ácido siálico presentes en la superficie de los neumocitos y de las células del tracto respiratorio superior de la especie humana. Se da por tanto una transmisión inter-específica muy localizada que da lugar a brotes, los cuales sobre todo ocurren en países muy poblados y con alta tradición ganadera en la cría de aves, con transmisión inter-humana muy localizada y débil en ciertos clusters de población³⁰.

Debido a la continua deriva genética que sufren los virus de la Gripe, el contacto continuo con los seres humanos de estos virus pandémicos con ineffectividad limitada en

conlleva un gran riesgo de mutación y recombinación que pueda hacer surgir una variante nueva que posea una transmisión efectiva inter-humana.

En este sentido, el virus de la Gripe Aviar H5N1 es el que actualmente presenta más riesgo para la población debido a que es un virus altamente patogénico. Este virus presenta una alta tasa de letalidad y de generación de casos graves en la población infectada, incluso superior a los registrados durante la Gripe de 1918^{25, 26, 27}, con una letalidad que asciende al 59% en los casos documentados²⁹.

Los síntomas más comunes en los primeros estadios de la infección por el virus H5N1 son fiebre, tos y disnea, presentándose en los casos más graves síndrome de distress respiratorio y fallo respiratorio^{27, 28}. La gravedad de la infección por H5N1 parece proceder de una respuesta altamente exacerbada de la respuesta inmunológica del individuo. H5N1 induce una respuesta de generación de alta concentración de citoquinas y quimiocinas por parte de las células endoteliales, así como en los macrófagos y células dendríticas. Esta inducción exacerbada de citoquinas y quimiocinas, además de la capacidad de este virus por inhibir otras características de la respuesta innata en los diferentes estadios de la infección, son los responsables del fallo del sistema inmune en el control del virus con el subsecuente daño tisular derivado de la tormenta de sustancias pro-inflamatorias³¹.

Es por esta razón que los virus como el de la Gripe Aviar H5N1 han de ser vigilados y monitorizados para diseñar estrategias que permitan una actuación rápida ante una eventual diseminación de tipo pandémica. Debido a los antecedentes antes descritos en cuanto a su gravedad y alta tasa de letalidad, es conveniente realizar estudios de protección de la población que permitan comprobar el estado de inmunidad previa que posean los habitantes de distintos países.

Inmunidad cruzada

La similitud entre estructuras proteicas con capacidad antigénica en los virus de la Gripe puede, en ciertos casos, generar respuestas protectoras en individuos que nunca han sido expuestos a un subtipo concreto. Este fenómeno se denomina inmunidad cruzada y proviene de la compartición de epítomos específicos entre distintas subespecies. Las regiones altamente conservadas en la escala filogenética de un microorganismo pueden generar anticuerpos capaces de neutralizar la acción del patógeno, lo que puede ser muy importante para la protección de la población.

Es por tanto evidente que la vía de generación de inmunidad cruzada por parte de la población es el contacto directo con cepas que posean relaciones estrechas de tipo filogenético con otras cepas. En este sentido, las dos vías existentes mediante las cuales el mecanismo de la inmunidad cruzada puede funcionar son las infecciones naturales y las vacunaciones anuales. En ambos casos, el individuo entra en contacto con el microorganismo, permitiendo al sistema inmune reconocerlo y generar una respuesta adaptativa de generación de anticuerpos. En el caso de que este subtipo o cepa posea una secuencia aminoacídica similar a la de otro subtipo emparentado filogenéticamente, se puede dar la opción de que el

anticuerpo generado pueda tener capacidad de reconocer ambas cepas con una sola inmunización.

El fenómeno de inmunidad cruzada ha sido descrito relacionado con varias cepas de Gripe, como por ejemplo la reactividad existente entre la cepa pandémica H1N1pdm09 en población adulta y anciana, sobre todo en población nacida antes de 1930, la cual estuvo expuesta al virus de la Gripe de 1918³³. Esta exposición a cepas que ya no circulan actualmente ha provocado en este estrato de población una protección extra que no ha sido registrada en los individuos jóvenes-adultos y niños.

El efecto de la inmunidad cruzada es muy relevante en cuanto a la epidemiología de las infecciones de Gripe en la población. La evaluación del estado de inmunización frente a cepas de carácter pandémico como la anteriormente descrita H5N1 se antoja especialmente relevante, sobre todo en poblaciones donde nunca ha circulado este virus entre la población humana, para conocer y diseñar estrategias que permitan la anticipación ante un evento pandémico con el fin de disminuir el impacto de este tipo de virus en la sociedad.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La población mayor de 65 años de Castilla y León posee anticuerpos capaces de interactuar específicamente con el virus de la gripe aviar H5N1 o con antígenos recombinantes del mismo, demostrando cierto nivel de protección serológica ante una eventual pandemia por esta cepa. Esta seroprotección deriva directamente de la exposición prolongada y reiterada del individuo a las cepas endémicas del virus de la gripe circulantes en España, además de a la vacunación anual antigripal.

Por otra parte, la vacunación de pacientes mayores de 65 años usando la vacuna antigripal anual posee diferencias observables en la eficacia y rango de acción en función de la cepa y de la temporada en la que se haya administrado.

Objetivos

El objetivo del presente proyecto engloba la evaluación del estatus serológico de personas mayores de 65 años en las que se ha supuesto un mayor tiempo de interacción con los virus gripales humanos durante su vida. Para ello se abordarán los siguientes objetivos secundarios:

- 1- Evaluación descriptiva de la efectividad de la vacunación en la generación de una respuesta seroprotectiva en población mayor de 65 años durante las temporadas 2006-2007, 2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011.
- 2- Evaluación descriptiva de la eficacia de la vacunación en función de la cepa utilizada y de las características en el tipo de circulación epidémica de cada una.
- 3- Evaluación del grado de seroprotección contra diferentes cepas de gripe estacionales en población mayor de 65 años.
- 4- Evaluación de la existencia de reactividad cruzada frente al virus de la gripe aviar H5N1 mediante la evaluación de la presencia de anticuerpos capaces de reconocer específicamente la hemaglutinina recombinante glicosilada del virus aviar.

Materiales y Métodos

Materiales y métodos

-Materiales-

Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional y analítico retrospectivo en sujetos mayores de 65 que participaron en la campaña de vacunación de las temporadas 2006-2007, 2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011, incluidos en el Programa de Vigilancia de la Gripe de Castilla y León. Cada temporada, la Red de Médicos Centinela de Castilla y León remitió una muestra de suero pre y post vacunal a la Sección de Epidemiología del Servicio Territorial de Sanidad y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León, junto con la información epidemiológica del individuo seleccionado.

Una vez finalizado el periodo de recogida de muestras, tanto los sueros como la información asociada a los mismos se enviaron al Centro Nacional de Gripe de la facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid (Valladolid NIC) para su etiquetado, almacenamiento y posterior análisis.

Recopilación de datos epidemiológicos

La información de los sueros a su llegada fue almacenada en una base de datos Excel donde se recogieron los datos referente a:

- Temporada
- Número correlativo de suero pre-vacunal y post-vacunal
- Nombre y Apellidos del paciente
- Edad
- Sexo
- Fecha de extracción de los sueros pre-vacunal y post-vacunal
- Antecedentes clínicos de relevancia
- Fecha vacunación
- Tipo de vacuna
- Lote de la vacuna
- Número SS

Almacenamiento y conservación de las muestras

El almacenamiento de los sueros se realizó en arcones congeladores de -20°C en gradillas de plástico numeradas con la temporada de gripe y con un número correlativo a la capacidad de cada gradilla. Cada suero es guardado en un tubo plástico con tapón y codificado según la temporada a la que perteneciera y el número correlativo a la llegada al NIC. Para la conservación no se utilizó ningún agente conservante.

Criterios de inclusión

De todas las muestras recibidas durante las diferentes temporadas, únicamente se analizaron aquellos sujetos mayores de 65 que hubieran sido vacunados de la gripe al menos una vez en la vida.

La temporada 2007-2008 fue excluida del estudio por el mal estado de conservación en el que se encontraron las muestras.

Para este estudio epidemiológico se seleccionaron un total de 178 sueros de pacientes mayores de 65 años, en los que hubieran transcurrido al menos 28 días desde la administración de la vacuna hasta la extracción del suero post-vacunal. Este número de muestras se ha considerado suficiente para un estudio epidemiológico de este tipo ya que permite realizar una aproximación veraz de la realidad poblacional de Castilla y León.

Stock de virus y antígenos

Para la realización de las encuestas serológicas de inmunoprotección se han utilizado los virus estacionales endémicos del territorio español, y por otra parte el virus H5N1 de la gripe aviar para la evaluación de la presencia del fenómeno de reactividad cruzada frente a cepas no circulantes. En el primer caso, los virus de la gripe estacionales endémicos han sido adquiridos mediante el envío anual del panel de subtipaje de gripe estacional que anualmente remite la Organización Mundial de la Salud (OMS) a los organismos inscritos a su sistema de vigilancia epidemiológica de Gripe como los Centros Nacionales de Gripe. Para este cometido se utilizaron las siguientes cepas:

- A/Florida/7/2009 – H1N1pdm09
- A/Brisbane/59/2007 – Antigua cepa H1N1
- A/Victoria/361/2011 – H3N2
- B/Brisbane/60/2008 – Gripe B linaje Victoria
- B/Wisconsin/1/2010 – Gripe B linaje Yamagata

Todos los viales utilizados han sido inoculados y crecidos en cultivo celular y posteriormente aislados con un título aceptable para su uso. El almacenamiento de todas estas cepas se realizó en su vial original en ultracongeladores de -80°C para una correcta conservación del RNA y estructura viral.

Por su parte, dada la ausencia de un sistema BSL-3 en las instalaciones del Centro Nacional de Gripe de Valladolid, no fue permitido el uso de virus vivo H5N1 de gripe aviar por razones de bioseguridad. Se buscó como alternativa la utilización de antígeno recombinante para la valoración de la inmunidad cruzada. Se adquirió proteína hemaglutinina recombinante glicosilada de H5N1 de la cepa A/Vietnam/1204/2004 (*Protein Sciences*), producida en baculovirus. Esta hemaglutinina comercial posee un peso molecular alrededor de los 72.000kDa y se encontraba purificada en un 90%, preservando así su actividad biológica y su estructura terciaria³⁴. Este reactivo fue almacenado a 4°C para su utilización y conservación.

Vacunas utilizadas

La vacunación de los pacientes se realizó en el centro de salud correspondiente o en el centro geriátrico al que pertenecieran. Debido a criterios de edad, esta cohorte era un grupo de población de riesgo. Las vacunas utilizadas variaron en función de la temporada:

- **Temporada 2006-2007**

A/New Caledonia/20/99 (Antigua H1N1)-like virus

A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)-like virus

B/Malaysia/2506/2004 (B Yamagata)-like virus

- **Temporada 2008-2009**

A/Brisbane/59/2007 (Antigua H1N1)-like virus

A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like virus

B/Brisbane/60/2008 (B Victoria)-like virus

- **Temporada 2009-2010**

A/California/7/2009 (H1N1pdm09)

A/Perth/16/2009 (H3N2)-like virus

B/Brisbane/60/2008 (B Victoria)-like virus

- **Temporada 2010-2011**

A/California/07/2009 (H1N1pdm09)-like virus

A/Victoria/210/2009 (H3N2)-like virus

B/Brisbane/60/2008 (B Victoria)-like virus

-Métodos-

El estudio de inmunidad cruzada se realizó en dos tiempos. En el primero se realizaron técnicas de inhibición de hemaglutinación utilizando los sueros de los pacientes testando la presencia de anticuerpos frente a cepas de Gripe de carácter endémico estacional. Una vez conocidos estos valores, estos mismos ensayos (descritos a continuación) se realizaron utilizando la proteína recombinante glicosilada de H5N1 adquirida para comprobar el estado de inmunidad frente a este agente patógeno.

Fundamento del ensayo de Inhibición de Hemaglutinación

Para la detección de anticuerpos circulantes en sangre se ha utilizado una técnica de evaluación de protección serológica denominada Inhibición de hemaglutinación (HI)^{35, 36}. Esta técnica deriva de la propiedad que posee la proteína hemaglutinina del virus de la gripe de aglutinar los hematíes de la sangre de ciertas especies animales formando una malla que puede ser valorada por visualización directa. La unión de anticuerpos específicos a los virus de la gripe interferirá en el enlace de estos con los receptores de superficie de los eritrocitos y se producirá el efecto llamado Inhibición de Hemaglutinación.

Esta técnica clásica, se ha elegido debido a la alta resolución que posee y a la cantidad de información que suministra a expensas de su bajo coste de realización. La valoración directa mediante HI nos puede permitir conocer el estado de inmunocompetencia de un individuo con respecto a la Gripe. Además, esta técnica es muy utilizada para valorar la efectividad de la vacunación estacional de la gripe por seroconversión utilizando los sueros post-vacunales de individuos vacunados.

La visualización y valoración del ensayo de HI se realiza utilizando placas de microtitulación con fondo "V". La hemaglutinación positiva (presencia de virus pero no de anticuerpos) se observará como una malla de color rojo que cubrirá todo el pocillo. Por su parte, en caso de existir inhibición de la hemaglutinación, se observará un depósito de hematíes en el fondo del pocillo debido a la acción neutralizante de los anticuerpos que son capaces de reconocer los antígenos utilizados. Ya que en estos ensayos se realizan diluciones seriadas de los sueros, podremos conocer cuál es el nivel preciso de anticuerpos posee un individuo y por tanto con qué nivel de protección serológica cuenta.

Lavado y preparación de la sangre para su uso

Para este experimento se ha utilizado sangre de gallinas alojadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. La extracción de sangre se realizó por vía intracardiaca extrayendo un volumen total de 10ml, utilizando al menos tres animales con el fin de evitar posibles defectos genéticos y patológicos de la sangre de cada individuo. La sangre fue filtrada a través de una gasa estéril y diluida a razón de 1:30 en solución anticoagulante *A/sever*. La sangre se utilizó posteriormente tanto para la adsorción previa de

los sueros como para la titulación de antígenos y el ensayo de HI. El proceso de lavado para ambos usos es idéntico y solo se diferencia en la dilución final.

La sangre filtrada y diluida en solución *Alsever* fue centrifugada durante 10 minutos a 2500 rpm, para posteriormente eliminar la capa de leucocitos que se deposita encima de los eritrocitos (*buffy coat*). El primer lavado se realizó con Cloruro Sódico con una centrifugación posterior durante 10 minutos a 2500 rpm. Los siguientes lavados se realizaron utilizando PBS hasta observar la ausencia de leucocitos.

Para la adsorción de los sueros se utilizaron eritrocitos diluidos al 50% en PBS. En el caso de la sangre utilizada para la titulación de antígenos y el ensayo de HI, los hematíes fueron diluidos hasta una concentración final de 0,5% en PBS. Para ello se realizó un hematocrito y se diluyó la sangre en función de la cantidad necesaria para la reacción.

Debido a que los eritrocitos de ave son células nucleadas, la velocidad de sedimentación es menor que en el caso de los mamíferos ya que estos no poseen núcleo. Es por eso que los tiempos de incubación se reducen a la mitad en comparación con la utilización de sangre humana o de cobaya para los ensayos de HI y para la titulación de los antígenos. En el caso de la titulación y ensayo de HI con sangre de gallina el tiempo de incubación será de 30 minutos, al contrario de en el caso de sangre de mamífero donde el tiempo ascenderá hasta los 60 minutos.

Eliminación de inhibidores inespecíficos en sangre

Debido a la presencia en sangre de inhibidores inespecíficos de la actividad hemaglutinante del virus de la gripe del tipo α (inhibidores estables a la temperatura, RDE sensibles), β (inhibidores sensibles a la temperatura, RDE resistentes) & γ (inhibidores estables a la temperatura, RDE sensibles), la utilización de sueros requiere un paso previo de inactivación físico-químico^{37, 38}. Para este cometido se utilizó RDE (*Receptor Destroying Enzyme – Denka Seiken*) extraído del sobrenadante de cultivo de *Vibrio cholerae* Ogawa type 588. Se diluyeron 100 μ l de cada suero en 300 μ l de RDE hasta alcanzar una disolución de suero en RDE a razón de 1:4, manteniendo estos durante 17 horas a 37°C para inactivar por temperatura y por acción del RDE todos los inhibidores inespecíficos. Posteriormente, se realizó una incubación más a 56°C durante 30 minutos para inactivar el RDE. Mas tarde, se añadieron 600 μ l de PBS para obtener una dilución final del suero de 1:10. Por último, se añadieron 100 μ l de hematíes al 50% para realizar la adsorción previa, centrifugándose 10 minutos a 2500 rpm. Se recogió el sobrenadante de cada suero y se almacenó en tubos eppendorf etiquetados hasta su utilización en congeladores de -20°C.

Titulación de las cepas de Gripe

Para la realización correcta de la dilución de los antígenos para obtener 4 unidades hemaglutinantes, se realizaron ensayos de titulación con cada cepa utilizada. Para la titulación

se realizaron tres diluciones previas de cada antígeno (1/10/, 1/50 y 1/100) que fueron utilizadas por duplicado en la titulación.

Para su realización, se dispuso de placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo "V", donde se dispensaron 50 µl de PBS en todos los pocillos de la placas excepto en la primera columna. Posteriormente, se añadieron 50 µl del antígeno diluido en el primer y segundo pocillo de cada fila, realizándose después diluciones seriadas de 50 µl desde el segundo pocillo, descartando el volumen final. Se añadieron después 50 µl de hematíes al 0,5% y se dejaron incubar por espacio de 30 minutos.

La lectura de las placas de titulación una vez transcurrido el tiempo de incubación se ha de realizar al instante e inclinando la placa a 70° sobre una superficie luminosa. El título de cada virus será el último en el que se haya visualizado hemaglutinación completa.

Una vez obtenido el título de cada dilución por duplicado, se debe obtener la media de todos los datos para comprobar la titulación real única del antígeno. Para ello se realizó una media aritmética sumando todos los valores obtenidos y dividiéndolos por el número total de observaciones. El número obtenido será el valor real de nuestra titulación, que al dividirlo entre cuatro permitirá obtener el valor de las cuatro unidades hemaglutinantes necesarias para realizar el experimento de inhibición de hemaglutinación. Una vez obtenido este valor, el ensayo se repitió para comprobar el valor correcto de las 4 unidades hemaglutinantes.

Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Mediante el ensayo de Inhibición de hemaglutinación se valoró la presencia, cuantificación y significación clínica de anticuerpos en sangre capaces de reconocer específicamente distintos antígenos de Gripe. Como se ha comentado anteriormente, dado que el virus de la gripe posee la habilidad de hemaglutinar los hematíes formando una malla, la presencia de anticuerpos capaces de reconocer específicamente virus de la gripe e impedir su acción provocará un efecto de inhibición, denominado "inhibición de la hemaglutinación", que no es más que la acción neutralizante innata que poseen estas estructuras del sistema inmunológico. La presencia de anticuerpos se visualizará por tanto como una ausencia de hemaglutinación idéntica a la que ocurre en la titulación pero con diferente significado clínico. En ausencia de virus capaz de provocar hemaglutinación debido a la acción neutralizante de los anticuerpos, los hematíes caerán en el fondo del pocillo y darán una típica apariencia en forma de botón o punto

Para la reacción de inhibición de hemaglutinación, se añadieron 50 µl de PBS a todos los pocillos de las placas de 96 pocillos en "V" excepto en la segunda columna. Posteriormente se añadieron 50 µl del suero tratado en las columnas 1, 2 y 3, para después realizar diluciones seriadas de 50 µl desde la columna número 3, descartando el volumen final. Posteriormente se añadieron 50 µl de cada antígeno diluido en todos los pocillos excepto en la primera columna (control de suero), dejando incubar durante 1 hora. Después de este paso, se añadieron 50 µl de hematíes al 0,5% en todos los pocillos y se incubó durante 30 minutos. Para este ensayo de

dispuso la utilización de controles de suero (Suero + PBS) y controles negativos (PBS + hematíes).

La lectura se realizó posteriormente a esta última incubación. El título inhibitorio se corresponde con el último valor en el que se observa inhibición de hemaglutinación completa.

Interpretación de datos

En el análisis e interpretación de los datos se han utilizado los datos obtenidos mediante los ensayos de HI para realizar comparaciones intra-estacionales e inter-estacionales, con el fin de conocer las diferencias en el comportamiento de cada cepa en la inmunidad generada a través de la vacunación. Así mismo, se evaluó la evolución de la inmunidad de las muestras utilizadas a lo largo de los periodos estudiados.

Para la interpretación estadística descriptiva de los datos se ha utilizado la plataforma SPSS V.20. Por otra parte, se ha utilizado el programa Microsoft Office Excel 2007, tanto para el cálculo de los valores de las variables de seroprotección y seroconversión, como para la generación de gráficas y tablas presentes en este estudio. Por último se utilizó el programa Microsoft Office Word 2007 para la escritura del mismo.

Resultados

Resultados

Para el estudio realizado sobre una cohorte de pacientes mayores de 65 años se utilizaron 178 sueros almacenados en el Centro Nacional de Gripe de Valladolid, de procedencia ambulatoria y de centros geriátricos, en los que en primer lugar se evaluó la capacidad de respuesta a la vacunación frente a diferentes cepas de carácter endémico estacional realizando ensayos de inhibición de hemaglutinación. En segundo lugar se valoró la capacidad del sistema inmune de reconocer específicamente antígenos de cepas de virus de la gripe de carácter pandémico del virus de la Gripe Aviar H5N1, sin circulación registrada por el territorio español.

Características clínicas y epidemiológicas de los sueros

Los sueros analizados pertenecían a las temporadas gripales 2006-2007 (45), 2008-2009 (45), 2009-2010 (43) y 2010-2011 (45), no pudiéndose utilizar los sueros de la temporada 2007-2008 debido a no poseer suficiente número de muestras para su uso. La media de edad de los pacientes donantes en todo el periodo de estudio fue de 75,95 años (SD 7,54), 74,71 años en la temporada 2006-2007 (SD 6,63), 79,28 años en la temporada 2008-2009 (SD 7,98), 74,81 años en la temporada 2009-2010 (SD 6,79) y 74,93 años en la temporada 2010-2011 (SD 7,89). El porcentaje de varones fue del 42,7% en las cuatro temporadas de estudio, correspondiendo el 64,4% (29) a la temporada 2006-2007, 46,7% (21) a la temporada 2008-2009, 62,8% (27) a la temporada 2009-2010 y el 55,5% (25) en la temporada 2010-2011. El número medio de días transcurridos entre la administración de la vacuna y la toma del suero post-vacunal fue de 33,81 días (SD 7,81) en las cuatro temporadas del estudio, 31 días (SD 2,61) en la temporada 2006-2007, 33 días (SD 3,13) en la temporada 2008-2009, 39 días (SD 14) en la temporada 2009-2010 y 32 días (SD 2,06) en la temporada 2010-2011 (Tabla 1). La vacuna más utilizada durante este periodo fue *Fluarix* (GSK) con 79 dosis (44,4%), seguida por *Chiromas* (Novartis) con 72 dosis (40,4%), *Focetria* (Novartis) con 16 dosis (9%), *Aflu* (GSK) con 10 dosis (5,6%) y *Gripavac* (Sanofi-Pasteur) con 1 dosis (0,6%).

	<i>Total periodo</i>	<i>2006-2007</i>	<i>2008-2009</i>	<i>2009-2010</i>	<i>2010-2011</i>
<i>Número</i>	178	45	45	43	45
<i>Edad</i>	75,95	74,71	79,28	74,81	74,93
<i>Sexo (% varones)</i>	42,7	64,4	46,7	62,8	55,5
<i>Días Post-Vac</i>	33,81	31	33	39	32

Tabla 1. Valores epidemiológicos de los sueros utilizados.

Evaluación del estado de inmunidad de la población frente a los virus de la Gripe

Debido a que la vacunación antigripal estacional posee en su composición virus de carácter endémico que varían según la temporada a la que nos enfrentemos, los sueros han sido testados frente a las cepas seleccionadas para la vacuna de cada año siguiendo la temporada en la que han sido recogidos. Este análisis permitirá conocer el estado de inmunidad que posee la población previamente a la administración de la vacuna y el estado que adquiere a posteriori. En el caso de las cepas B/Florida/04/2006 y A/Florida/07/2009, el número de sueros analizados frente a ambas ha sido menor debido a que, en el primer caso, anteriormente a la temporada 2008-2009 la asignación de Gripe B a la vacuna fue reiteradamente el linaje Victoria, y por tanto la inmunización no estaba registrada en estos sueros. Por otra parte, en el caso de la gripe pandémica (A/Florida/07/2009), la aparición en el año 2009 no ha permitido su análisis con los sueros anteriores. El número total de sueros analizados con cada cepa fueron los siguientes (Tabla 2):

<i>Virus</i>	<i>Cepa similar</i>	<i>Nº Sueros</i>
<i>H1N1 Pandémico</i>	<i>A/California/07/2009</i>	<i>88</i>
<i>Antiguo H1N1</i>	<i>A/Brisbane/59/2007</i>	<i>178</i>
<i>H3N2</i>	<i>A/Victoria/361/2011</i>	<i>178</i>
<i>B Yamagata</i>	<i>B/Wisconsin/1/2010</i>	<i>133</i>
<i>B Victoria</i>	<i>B/Brisbane/60/2008</i>	<i>178</i>

Tabla 2. Número de sueros analizados para cada virus y la correspondiente cepa asimilada representativa de cada linaje.

Gripe A

Cepa Old Seasonal H1N1 – A/Brisbane/59/2007-Like

De los 178 sueros analizados utilizando la cepa A/Brisbane/59/2007-like (antiguo H1N1 estacional), 71 (39,9%) poseían títulos seroprotectores antes de la vacunación (títulos mayores de 1/40). El número de pacientes que poseían títulos seroprotectores después de la administración de la vacuna ascendió hasta un total de 130 individuos, lo que supone que el porcentaje de seroprottegidos con respecto al total de sueros analizados fue del 73%. El número de pacientes que sufrieron una respuesta de generación de anticuerpos hasta niveles protectores fue de 59 individuos, lo que supone un porcentaje de protección asumible a la acción de la vacuna del 33,1%. El número de pacientes que han cursado con seroconversión posterior a la administración de la vacuna (aumento en el título de anticuerpos de al menos 4 veces la titulación inicial) fue de 60 individuos. El resto, 118 individuos, no lograron generar seroconversión mediante la vacunación. El porcentaje de individuos que seroconvirtieron fue del 33,7% (Tabla 3).

8 individuos registraron titulaciones de 1/640 después de la administración de la vacuna, a excepción de uno cuyo título pre-vacunal existente también era de 1/640.

Cepa H3N2 – A/Victoria/361/2011 – Like

Del total de los 178 sueros analizados usando la cepa A/Victoria/361/2011-like (H3N2), 99 (55,6%) poseían anticuerpos con títulos seroprotectores antes de la vacunación. El número de pacientes que mostraron títulos seroprotectores después de la administración de la vacuna ascendió hasta un total de 162 individuos, lo que supone que el porcentaje de seroprottegidos con respecto al total de sueros analizados es del 91%. El número de pacientes que generaron una respuesta inmunológica positiva hacia el desarrollo de anticuerpos hasta niveles protectores fue de 63 individuos, lo que supone un porcentaje de protección asumible a la acción de la vacuna del 35,4%. El número de pacientes que han generaron seroconversión posterior a la administración de la vacuna fue de 101 individuos. El resto, 77 individuos, no lograron generar seroconversión mediante la vacunación. El porcentaje de individuos que seroconvirtieron fue del 56,7% (Tabla 3).

32 individuos registraron titulaciones de hasta de 1/1280 (titulación más alta registrable mediante esta técnica debido a su resolución) después de la administración de la vacuna.

Cepa H1N1pdm09 – A/California/07/2009-Like

De un total de 88 sueros analizados en las temporadas 2009-2010 y 2010-2011 usando la cepa A/California/07/2009-like (H1N1pdm09), un total de 20 pacientes (22,7%) poseían anticuerpos con títulos seroprotectores antes de la administración de la vacuna. Por otra parte, el número de pacientes que presentó seroprotección con posterioridad a la administración de la vacuna fue de 57 (64,8%), obteniéndose posteriormente un 64,8% de protección respecto del total de la población después de la vacunación. Esto supone que la efectividad en la generación de seroprotección a través de la vacuna se dio en 37 individuos, y por tanto la vacunación promovió seroprotección en el 42% de los pacientes. El número de pacientes que generó seroconversión fue de 45 individuos. Por otra parte, 43 pacientes no generaron seroconversión mediante la administración de la vacuna antigripal. Esto supone que la vacunación promovió un porcentaje de seroconversión del 51,1% en el grupo de estudio (Tabla 3).

9 individuos generaron respuestas que alcanzaron titulaciones de 1/1280 después de la administración de la vacuna, además de otro paciente cuyo título de anticuerpos pre-inoculación era también de 1/1280.

Gripe B

Linaje Yamagata – B/Wisconsin/1/2010-Like

De un total de 133 sueros analizados en las temporadas 2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011 utilizando la cepa B/Wisconsin/1/2010-like (linaje Yamagata de Gripe B), un total de 50 individuos (37,6%) poseían anticuerpos con títulos seroprotectores antes de la administración de la vacuna. Posteriormente a la administración de la vacuna, el número de pacientes con títulos seroprotectores fue de 72 (54,1%). El porcentaje de seroprotección generado por la

vacunación anual fue del 16,5% (22 individuos). El número de pacientes que generó seroconversión mediante la administración de la vacuna fue de 21, mientras que el número de pacientes que no sufrieron seroconversión fue de 112, lo que supone que la vacunación estacional genera para el linaje Yamagata de Gripe B una seroconversión en el 15,8% de los pacientes (Tabla 3).

Se han registrado dos pacientes con títulos iguales a 1/640, cuyos títulos anteriores fueron menores, además de un paciente cuyo título post y pre vacunal fue de 1/1280.

Linaje Victoria – B/Brisbane/60/2008-Like

De un total de 178 sueros analizados durante todas las temporadas estudiadas utilizando la cepa B/Brisbane/60/2008-like (linaje Victoria de Gripe B), 75 pacientes (42,1%) poseían títulos seroprotectores de anticuerpos antes de la vacunación antigripal. Después de la administración de la vacuna, el número de pacientes con títulos seroprotectores aumentó hasta los 113 (63,5%), por tanto el porcentaje de generación de seroprotección mediado por la vacunación es del 21,3% (38 individuos). El número de pacientes que ha generado seroconversión fue de 38, mientras que el número de pacientes que no sufrieron seroconversión fue de 140, lo que supone que la vacunación mediante el linaje Victoria de Gripe B promovió seroprotección en el 21,3% del grupo estudiado (Tabla 3).

Dos pacientes generaron respuestas inmunológicas con valores de 1/1280, aunque estos dos individuos poseían títulos previos antes de la vacunación de 1/640. Otros 10 pacientes generaron respuestas con títulos de 1/640, donde dos de ellos poseían títulos previos idénticos

Seroconversión	<i>H1N1pdm09</i>	<i>Pre H1N1</i>	<i>H3N2</i>	<i>Byamagata</i>	<i>Bvictoria</i>
<i>Nº sueros</i>	88	178	178	133	178
<i>Pre-prottegidos</i>	20	71	99	50	75
<i>% pre protegidos</i>	22,7	39,9	55,6	37,6	42,1
<i>Post-prottegidos</i>	57	130	162	72	113
<i>% post protegidos</i>	64,8	73,0	91,0	54,1	63,5
<i>Prottegidos por vacuna</i>	37	59	63	22	38
<i>% protegidos por vacuna</i>	42,0	33,1	35,4	16,5	21,3
<i>Seroconvertidos</i>	45	60	101	21	38
<i>No seroconvertidos</i>	43	118	77	112	140
<i>% seroconversión</i>	51,1	33,7	56,7	15,8	21,3

Tabla 3. Análisis de seroprotección y seroconversión frente a la vacunación en el periodo estudiado

Evaluación de la respuesta inmunológica frente a la vacunación antigripal por temporadas

La constante evolución de los virus de la Gripe hacia nuevas variantes mediante cambios antigénicos menores (Drift antigénico) y mayores (Shift antigénico) provoca que cada año las vacunas antigripales tengan que ser adecuadas a los nuevos linajes circulantes. Estos cambios pueden generar respuestas diferenciales a la vacunación en la población en función de la historia evolutiva de cada cepa o linaje, la repetición consecutiva de una cepa en la vacuna, la aparición de nuevas cepas, o incluso la disolución del efecto de inmunidad de rebaño por la ausencia de un linaje durante un tiempo prolongado en la vacuna.

Al analizar cada cepa por separado durante los periodos de vigilancia epidemiológica estudiados se puede observar cual es la respuesta a la vacunación de los individuos frente a un determinado serotipo del virus y cuáles son las causas de la variación en la protección colectiva de la población. El estudio evolutivo de la protección de la población se podrá observar que procesos son los responsables de los cambios en la inmunidad de los individuos.

Gripe A

Cepa Old Seasonal H1N1 – A/Brisbane/59/2007-Like

Para el análisis estacional por temporadas de la antigua cepa estacional H1N1 de Gripe se han utilizado 45 sueros en cada temporada gripal exceptuando la temporada 2009-2010 donde se utilizaron únicamente 43 (Tabla 4) (Figura 3).

<i>Old H1N1</i>				
<i>Seroconversión</i>	2006-2007	2008-2009	2009-2010	2010-2011
<i>Nº sueros</i>	45	45	43	45
<i>Pre-protegidos</i>	23	13	10	25
<i>% pre protegidos</i>	51,1	28,9	23,3	55,6
<i>Post-protegidos</i>	37	37	25	31
<i>% post protegidos</i>	82,2	82,2	58,1	68,9
<i>Protegidos por vacuna</i>	14	24	15	6
<i>% protegidos por vacuna</i>	31,1	53,3	34,9	13,3
<i>Seroconvertidos</i>	19	27	7	7
<i>No seroconvertidos</i>	26	18	36	38
<i>% seroconversión</i>	42,2	60,0	16,3	15,6

Tabla 4. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antigripal frente al antiguo virus estacional H1N1.

Mediante el ensayo de HI se ha podido observar un nivel de protección previa a la vacunación que se encuentra entre el 51,1 % en la temporada 2006-2007, desciende progresivamente hasta los valores más bajos en la temporada 2009-2010 con un 23,3% de pre-

protección, ascendiendo de nuevo hasta el 55,6% en la temporada 2010-2011, y ofreciendo un patrón de la evolución de la protección previa a la vacunación en forma de U.

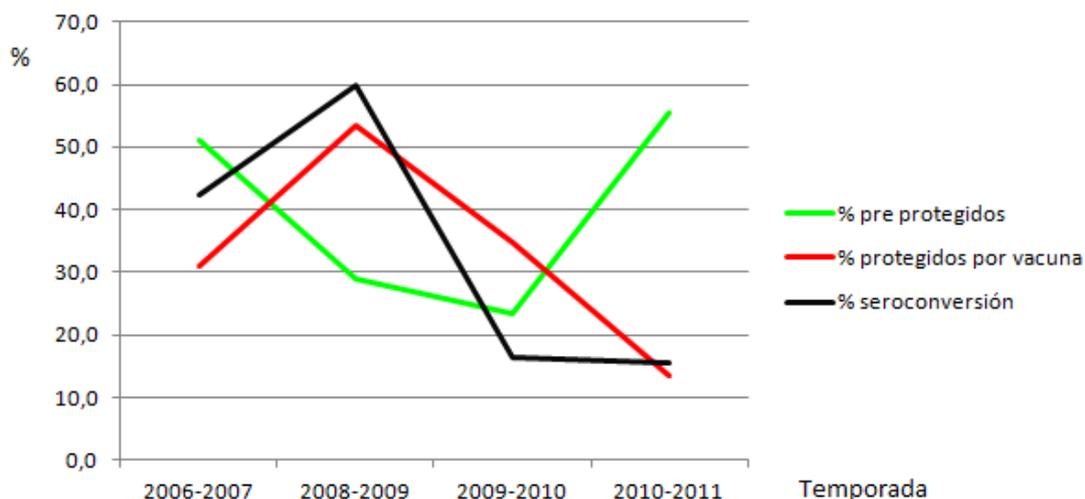


Figura 3. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antigripal frente al antiguo estacional virus H1N1.

El porcentaje de protegidos por la vacunación es del 31,1% en la temporada 2006-2007, 53,3% en la temporada 2008-2009, 34,9% en la temporada 2009-2010 y de 13,3% en la temporada 2010-2011. Por su parte, el porcentaje de seroprotegidos por acción de la vacuna es del 42,2% en la temporada 2006-2007, 60% en la temporada 2008-2009, 16,3% en la temporada 2009-2010 y del 15,6% en la temporada 2010-2011.

Cepa H3N2 – A/Victoria/361/2011 – Like

En el análisis estacional por temporadas de la inmunidad generada por la vacuna para la cepa H3N2 se han utilizado 45 sueros en todas las temporadas estudiadas excepto en la temporada 2009-2010, donde se han utilizado un total de 43 sueros (Tabla 5) (Figura 4).

Mediante el análisis de inhibición de hemaglutinación se ha observado un nivel de protección previo a la vacunación en el 55,6 % de la población estudiada en la temporada 2006-2007, un 40% en la temporada 2008-2009, un 51,2% en la temporada 2009-2010 y un 75,6% en la temporada 2010-2011. El porcentaje de pre-protección en la población forma también forma un patrón en U similar al observado con la cepa antigua H1N1 aunque menos acentuado. Por su parte, el nivel de protección debido a la vacunación se encuentra en un 37,8% en la temporada 2006-2007, 51,1% en la temporada 2008-2009, 32,6% en la temporada 2009-2010 y 20% en la temporada 2010-2011. La seroconversión sucede en el 64,4% de la población estudiada en la temporada 2006-2007, en el 77,8% en la temporada 2008-2009, en el 30,2% en la temporada 2009-2010 y en el 28,9% en la temporada 2010-2011.

H3N2

Seroconversión	2006-2007	2008-2009	2009-2010	2010-2011
Nº sueros	45	45	43	45
Pre-protegidos	25	18	22	34
% pre protegidos	55,6	40,0	51,2	75,6
Post-protegidos	42	41	36	43
% post protegidos	93,3	91,1	83,7	95,6
Protegidos por vacuna	17	23	14	9
% protegidos por vacuna	37,8	51,1	32,6	20,0
Seroconvertidos	29	35	13	13
No seroconvertidos	16	10	30	32
% seroconversión	64,4	77,8	30,2	28,9

Tabla 5. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antrigripal frente al virus estacional H3N2.

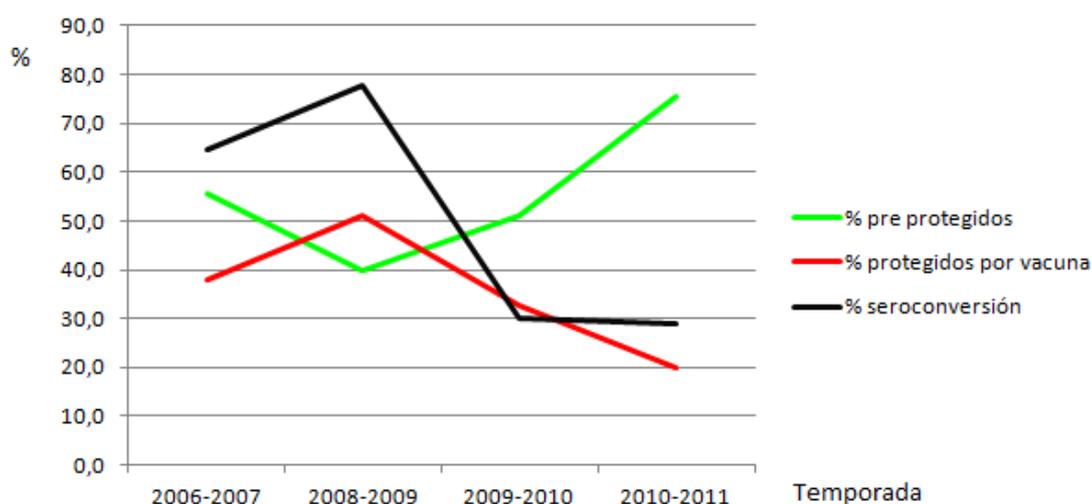


Figura 4. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antrigripal frente al virus estacional H3N2.

Cepa H1N1pdm09 – A/California/07/2009-Like

En el caso de la cepa H1N1pdm09, solo se disponen de datos de las temporadas 2009-2010 y 2010-2011 debido a la ausencia de circulación de este virus de tipo pandémico durante las temporadas anteriormente estudiadas en las otras cepas (Tabla 6) (Figura 5).

H1N1pdm09

Seroconversión	2006-2007	2008-2009	2009-2010	2010-2011
<i>Nº sueros</i>	0	0	43	45
<i>Pre-protegidos</i>	x	x	5	15
<i>% pre protegidos</i>	x	x	11,6	33,3
<i>Post-protegidos</i>	x	x	14	43
<i>% post protegidos</i>	x	x	32,6	95,6
<i>Protegidos por vacuna</i>	x	x	9	28
<i>% protegidos por vacuna</i>	x	x	20,9	62,2
<i>Seroconvertidos</i>	x	x	9	36
<i>No seroconvertidos</i>	x	x	34	9
<i>% seroconversión</i>	x	x	20,9	80

Tabla 6. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antrigripal frente al virus pandémico H1N1pdm09.

El porcentaje de población protegida previa a la vacunación, y por tanto a la primocirculación de este virus, fue del 11,6% en la temporada 2009-2010, ascendiendo hasta el 33,3% en la temporada siguiente (2010-2011). El porcentaje de protegidos por la vacunación durante el periodo pandémico de este virus fue del 20,9% y ascendió hasta el 62,2% en la primera temporada en la que esta cepa circulaba por primera vez como virus de tipo estacional. Por su parte, la seroconversión mediada por la vacunación sucedió en la temporada 2009-2010 en el 20,9% de la población estudiada y en el 80% en la temporada 2010-2011.

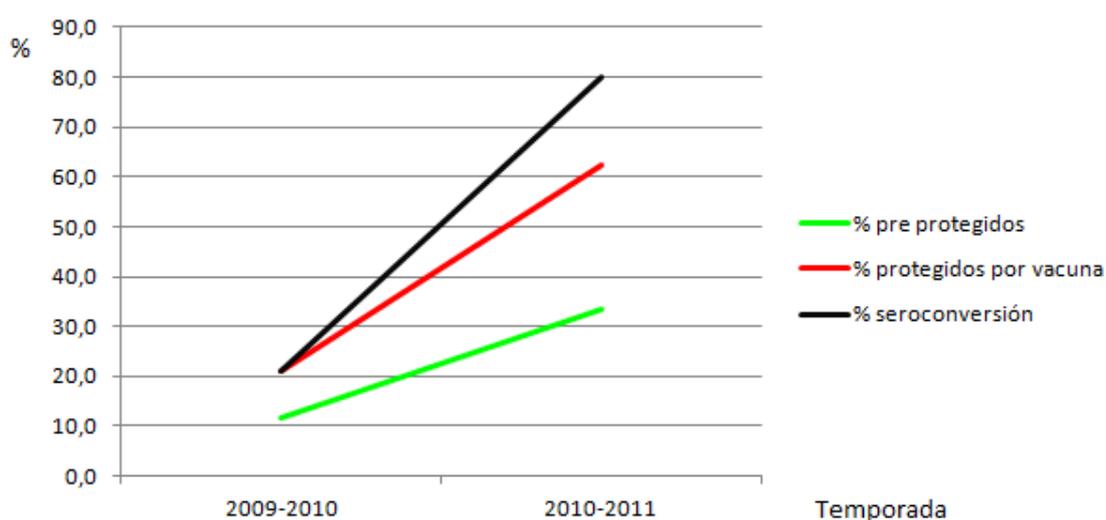


Figura 5. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antrigripal frente al virus pandémico H1N1pdm09.

Gripe B

Linaje Yamagata – B/Wisconsin/1/2010-Like

El análisis estacional de seroprotección frente al linaje de Gripe B Yamagata se ha realizado en un total de 45 sueros en las temporadas 2008-2009 y 2010-2011 y en 43 sueros en la temporada 2009-2010. La temporada 2006-2007 ha sido excluida de este estudio debido a ausencia de circulación de dicho linaje durante ese periodo (Tabla 7) (Figura 6).

B Yamagata				
Seroconversión	2006-2007	2008-2009	2009-2010	2010-2011
<i>Nº sueros</i>	0	45	43	45
<i>Pre-protegidos</i>	x	12	17	21
<i>% pre protegidos</i>	x	26,7	39,5	46,7
<i>Post-protegidos</i>	x	27	20	25
<i>% post protegidos</i>	x	60,0	46,5	55,6
<i>Protegidos por vacuna</i>	x	15	3	4
<i>% protegidos por vacuna</i>	x	33,3	7,0	8,9
<i>Seroconvertidos</i>	x	16	2	3
<i>No seroconvertidos</i>	x	29	41	42
<i>% seroconversión</i>	x	35,6	4,7	6,7

Tabla 7. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antigripal frente al virus de la Gripe B del linaje Yamagata.

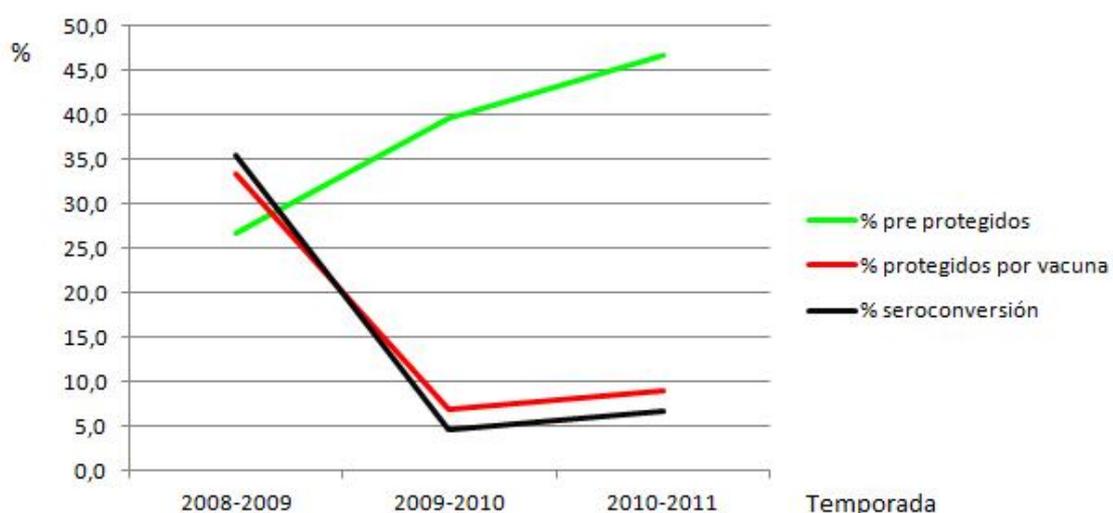


Figura 6. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antigripal frente al virus de la Gripe B del linaje Yamagata.

El nivel de pre-protección previo a la vacunación es del 26,7% en la temporada 2008-2009, 39,5% en la temporada 2009-2010 y un 46,7% en la temporada 2010-2011, siguiendo un

patrón ascendente durante las últimas tres temporadas gripales. El porcentaje de protección debido a la vacunación antigripal anual fue del 33,3% en la temporada 2008-2009, 7% en la temporada 2009-2010 y 8,9% en la temporada 2010-2011. Por su parte, el porcentaje de seroprotección debida a la vacunación fue del 35,6% en la temporada 2008-2009, 4,7% en la temporada 2009-2010 y del 6,7% en la temporada 2010-2011.

Linaje Victoria – B/Brisbane/60/2008-Like

El análisis estacional de seroprotección frente al linaje Victoria de Gripe B se realizó en 45 sueros en cada temporada estudiada, exceptuando en la temporada 2009-2010 que se realizó en 43 sueros.

El nivel de protección previa a la vacunación fue del 31,1% durante la temporada 2006-2007, 45% durante la temporada 2008-2009, 30,2% durante la temporada 2009-2010 y del 57,8% en la temporada 2010-2011, dando lugar a un patrón oscilante. La protección debida a la vacunación se dio en un 33,3% de la población estudiada en la temporada 2006-2007, 13,3% en la temporada 2008-2009, un 14% en la temporada 2009-2010 y un 24,4% en la temporada 2010-2011. Por su parte, la seroconversión debida a la vacunación sucedió en el 35,6% de la población estudiada en la temporada 2006-2007, en el 8,9% en la temporada 2008-2009, en el 14% en la temporada 2009-2010 y en el 26,7% en la temporada 2010-2011 (Tabla 8) (Figura 7).

B Victoria				
Seroconversión	2006-2007	2008-2009	2009-2010	2010-2011
<i>Nº sueros</i>	45	45	43	45
<i>Pre-protectidos</i>	14	22	13	26
<i>% pre protectidos</i>	31,1	48,9	30,2	57,8
<i>Post-protectidos</i>	29	28	19	37
<i>% post protectidos</i>	64,4	62,2	44,2	82,2
<i>Protectidos por vacuna</i>	15	6	6	11
<i>% protectidos por vacuna</i>	33,3	13,3	14,0	24,4
<i>Seroconvertidos</i>	16	4	6	12
<i>No seroconvertidos</i>	29	41	37	33
<i>% seroconversión</i>	35,6	8,9	14,0	26,7

Tabla 8. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antigripal frente al virus de la Gripe B del linaje Victoria.

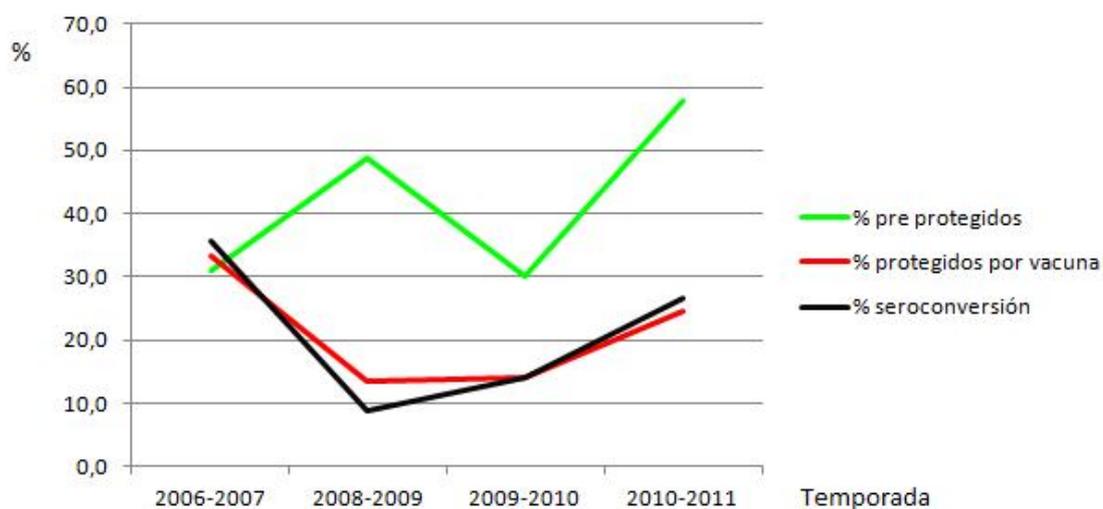


Figura 7. Evolución temporal de la capacidad inmunogénica de la vacunación anual antrigripal frente al virus de la Gripe B del linaje Victoria.

Eficacia de la vacunación

Para comprobar la eficacia de la vacunación entre las diferentes cepas estudiadas y debido a la disparidad de muestras utilizadas debido a los condicionantes anteriormente expuestos, se procedió a la normalización y estandarización de los valores transformándolos en porcentajes para su mejor manejo e interpretación.

Al analizar los títulos de los sueros pre-vacunales, el porcentaje de las titulaciones más bajas (1/10, 1/20) representan entre el 25% y el 60% del total de los valores de titulación de cada cepa (Tabla 9) (Figura 8). El número o porcentaje de sueros decrece rápidamente a medida que aumentan los valores de titulación, registrándose valores en las titulaciones más altas de entre el 0% y el 3%. La cepa H1N1pdm09 posee el mayor valor de titulaciones bajas (60,2%), decreciendo sus valores rápidamente al aumentar de titulación.

Título	H1N1pdm09	H1N1	H3N2	Byamagata	Bvictoria
1/10	60,2	32,6	24,7	46,6	38,2
1/20	17,0	27,5	19,7	15,8	19,7
1/40	12,5	17,4	18,0	19,5	16,3
1/80	5,7	10,7	21,3	12,8	16,3
1/160	2,3	9,0	4,5	3,8	4,5
1/320	1,1	2,2	5,6	0,8	2,8
1/640	0,0	0,6	2,8	0,0	2,2
1/1280	1,1	0,0	3,4	0,8	0,0

Tabla 9. Porcentaje de sueros con titulaciones pre-vacunales frente a las distintas cepas analizadas.

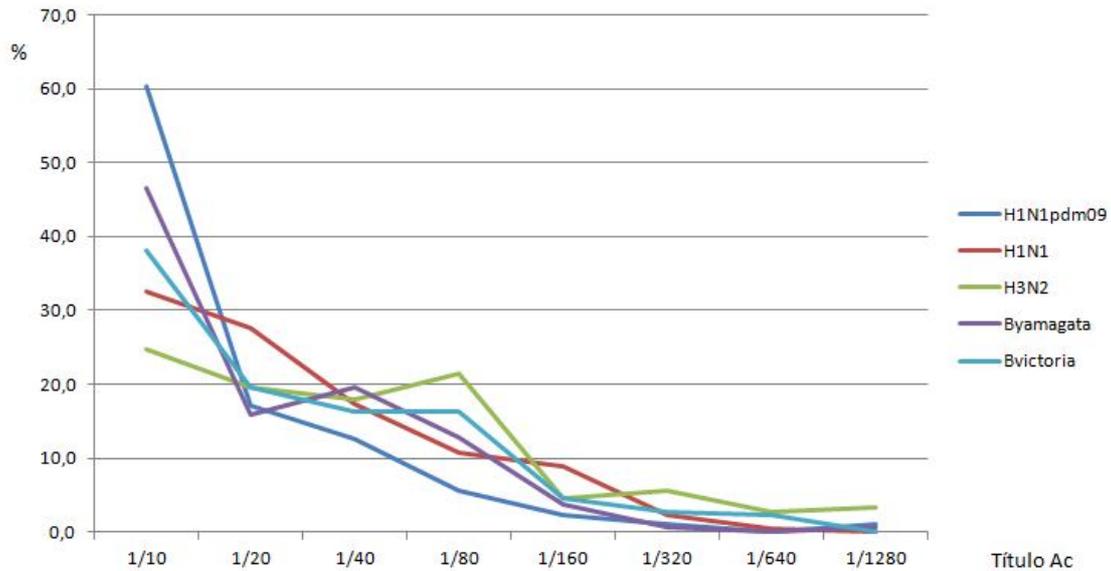


Figura 8. Porcentaje de sueros con titulaciones pre-vacunales frente a las distintas cepas analizadas.

Por otra parte, al analizar las titulaciones de los sueros de pacientes ya vacunados con la vacuna estacional, el porcentaje de títulos varía en función de la cepa frente a la que se haya testado (Tabla 10) (Figura 9). En el caso de la cepa H1N1pdm09, los valores de titulación más bajos siguen siendo los más representativos, aunque existe un aumento en el resto de índices de titulación. Este mismo evento ocurre de similar manera con los linajes de Gripe B Yamagata y Victoria. Por el contrario, los mayores porcentajes en las cepas H1N1 y H3N2 se registran en los índices de titulación más altas, quedando el resto de valores uniformemente distribuidos entre el resto de titulaciones.

Título	H1N1pdm09	H1N1	H3N2	Byamagata	Bvictoria
1/10	23,9	9,6	1,7	26,3	20,8
1/20	11,4	17,4	7,3	19,5	15,7
1/40	11,4	20,8	14,6	19,5	23,6
1/80	15,9	21,3	18,0	21,8	18,5
1/160	11,4	14,6	14,0	7,5	7,9
1/320	6,8	0,6	13,5	3,0	6,7
1/640	8,0	10,7	12,9	1,5	5,6
1/1280	11,4	5,1	18,0	0,8	1,1

Tabla 10. Porcentaje de sueros con titulaciones post-vacunales frente a las distintas cepas analizadas.

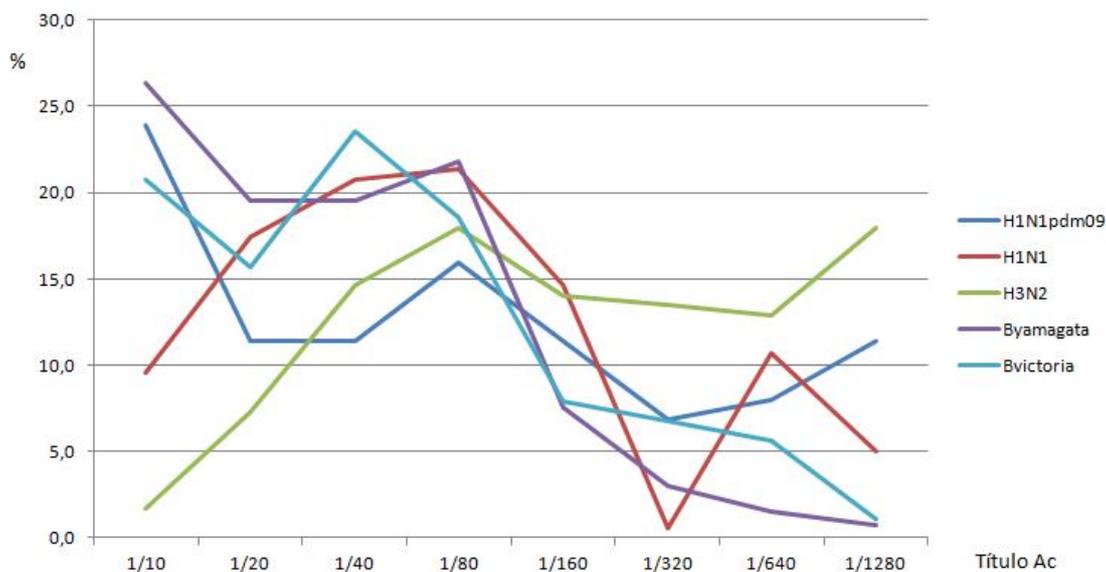


Figura 9. Porcentaje de sueros con titulaciones post-vacunales frente a las distintas cepas analizadas.

Evaluación de la inmunidad cruzada frente al virus de la gripe aviar H5N1

Una vez conocido el estado de inmunidad previo de la población seleccionada para este estudio, se procedió al análisis de la inmunidad existente frente a virus de carácter pandémico como el virus de la Gripe Aviar H5N1, lo que nos va a permitir conocer si el estado inmunológico de la población puede repercutir en la generación de una respuesta cruzada frente a otras cepas no circulantes.

Para la realización del test de inhibición de la hemaglutinación con la proteína recombinante glicosilada del virus de la gripe aviar H5N1, en primer lugar se realizó un ensayo de titulación de la proteína comercial con el fin de evaluar su actividad y su concentración. Se realizaron tres diluciones del antígeno por duplicado con el fin de englobar todos los posibles títulos que pudiera ofrecer esta proteína (1/50, 1/100 y 1/1000). Los resultados obtenidos por duplicado se exponen en la Tabla 11.

Posteriormente se realizó la media aritmética de todos los valores, obteniéndose un valor de titulación de 1/9066,7, que fue posteriormente transformado en 4 unidades hemaglutinantes necesarias para poder trabajar en el ensayo de inhibición de hemaglutinación dividiendo el valor obtenido por cuatro, obteniendo un valor de dilución de 1/2666, que es la dilución a realizar para el ensayo de inhibición de hemaglutinación

<i>Dilución</i>	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600
	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000
1/50	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1/50	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1/100	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1/100	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1/1000	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1/1000	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 11. Resultados de la titulación doble de la proteína recombinante glicosilada del virus de la gripe aviar H5N1.

De los 178 sueros analizados, 6 (3,4%) resultaron positivos para la presencia de anticuerpos capaces de reconocer específicamente el antígeno recombinante glicosilado de gripe aviar H5N1. El resto de sueros (172 – 96,6%) mostraron titulaciones menores a 1/10, que es la dilución de anticuerpo más baja utilizada para este ensayo, resultando negativos ante la presencia de este tipo de anticuerpos. De estos seis sueros positivos, dos resultaron tener titulaciones de 1/320 y el resto titulaciones de entre 1/20 y 1/10, solo estando por encima del nivel de seroprotección (1/40) las dos primeras (Tabla 12).

<i>Temporada</i>	<i>Nº Suero</i>	<i>Título HI</i>	<i>Edad</i>	<i>Sexo</i>	<i>Vacuna</i>	<i>Días Post-Vac</i>
2006-2007	144	1/320	76	M	Fluarix	33
2009-2010	6	1/320	73	M	Fluarix	30
2009-2010	42	1/10	73	M	Focetria	29
2010-2011	24	1/20	72	F	Chiomas	31
2010-2011	254	1/20	71	M	Chiomas	34
2010-2011	274	1/10	80	F	Chiomas	29

Tabla 12. Resultados del ensayos de Inhibición de Hemaglutinación en los sueros positivos ante la presencia de anticuerpos capaces de reconocer específicamente proteína recombinante glicosilada de H5N1.

La media de edad de los pacientes con resultado positivo a la presencia de anticuerpos capaces de reconocer proteína recombinante glicosilada de H5 fue de 74,2 años (SD 3,312), y el porcentaje de varones fue de 66,7% (4 varones). El número medio de días existente entre la inoculación de la vacuna y la extracción del suero post-vacunal fue de 31 días (SD 2,098). Los sueros positivos pertenecieron a las temporadas 2006-2007 (1), 2009-2010 (2) y 2010-2011 (3), no habiéndose registrado ningún positivo en la temporada 2008-2009. Las vacunas que fueron utilizadas para generar protección frente a Gripe en estos individuos fueron *Chiomas* (3), *Fluarix* (2) y *Focetria* (1). La presencia de un porcentaje bajo de pacientes positivos respecto al total de pacientes analizados impide realizar un estudio estadístico completo en este apartado.

Para validar y verificar el ensayo de inhibición de hemaglutinación realizado con los sueros, se realizó una segunda prueba de Inhibición de hemaglutinación utilizando los sueros que habían resultado positivos en el primer ensayo, añadiendo además cuatro sueros que

resultaron negativos en la anterior prueba a modo de control negativo, y que fueron seleccionados al azar dentro de toda la cohorte de pacientes. Los resultados fueron idénticos en el segundo ensayo sin observar variaciones en la titulación de los sueros positivos, ni reactividades positivas en los sueros que resultaron negativos (Tabla 13).

<i>Temporada</i>	<i>Nº Suero</i>	<i>Result. 1º</i>	<i>Titul. 1º</i>	<i>Result. 2º</i>	<i>Titul. 2º</i>
2006-2007	144	+	1/320	+	1/320
2009-2010	6	+	1/320	+	1/320
2009-2010	42	+	1/10	+	1/10
2010-2011	24	+	1/20	+	1/20
2010-2011	254	+	1/20	+	1/20
2010-2011	274	+	1/10	+	1/10
2006-2007	134	-	x	-	x
2009-2010	62	-	x	-	x
2009-2010	46	-	x	-	x
2008-2009	78	-	x	-	x

Tabla 13. Resultados de la repetición para verificación del ensayo de HI con los sueros positivos y negativos a modo de control.

Discusión

Discusión

La respuesta inmune del organismo es una de las principales barreras frente a la infección de cualquier microorganismo patógeno. El estudio de los mecanismos de inmunización, ya sean pasivos o activos, permiten la adecuación de nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la protección de la población frente a la infección por patógenos ya existentes o también otros de nueva aparición que puedan generar brotes de tipo pandémico. En el caso de la gripe aviar H5N1, el estado semilátente del virus, que actualmente logra esporádicamente saltar la barrera de especie transportándose de aves a humanos, puede desarrollar en un futuro cercano la capacidad de transmisión efectiva entre humanos, lo que supondría un problema global a nivel epidemiológico debido a la gravedad de la infección por este virus. En este sentido, la evaluación de la inmunidad en la población de países como España, donde este virus no ha circulado en la actualidad o tan solo ha sido detectado en brotes esporádicos en granjas avícolas y en humedales^{39, 40, 41}, supone un avance extraordinario como arma para conocer el estado general de la población ante un evento global de gran importancia como puede ser la diseminación efectiva del virus de la gripe aviar H5N1 entre la población humana. Este conocimiento puede permitir adecuar estrategias para la rápida respuesta que permitan proteger a la población y evitar su proliferación, ofreciendo una barrera artificial ante la generación y diseminación de un evento pandémico.

Por otra parte, el conocimiento de los ciclos evolutivos de inmunidad de la población frente a los virus de la gripe endémicos del territorio, en este caso del estrato de población anciana, permite tener una visión global del comportamiento del sistema inmunitario y de cómo suceden los mecanismos de generación de protección en función de las características evolutivas y epidemiológicas de los propios virus. En este sentido, es de vital importancia conocer que efectos protectores o perjudiciales de la circulación de virus estacionales pueden influir en la generación de una respuesta protectora frente a virus de la Gripe de carácter pandémico como el de la gripe aviar H5N1.

Por esto, también es importante el estudio de la vacunación como medio o mecanismo de protección de la población frente a patógenos de este tipo, ya que como medio de generación de inmunidad activa adquirida, cobra mucha relevancia sobre todo en ciertos sectores de la población considerados de riesgo, ya sea de tipo laboral (como trabajadores relacionados con el entorno sanitario), inmunodeficiencia (pacientes con síndromes de inmunodeficiencia adquirida, congénita, de origen nosocomial o derivados de la toma crónica de ciertos medicamentos) o debido a la edad (senescencia del sistema inmunológico).

Este trabajo busca por tanto, conocer el estado de inmunización de la población de Castilla y León mayor de 65 años frente a las distintas cepas de Gripe estacionales, con el fin de evaluar la capacidad de protección frente a una eventual diseminación global en forma de pandemia del virus de la gripe aviar H5N1, con el fin de generar información que sea de utilidad para el desarrollo de estrategias de protección de la población.

Características clínicas de los sueros

Se han estudiado un total de cuatro temporadas de Gripe, de las cuales tres han sido consecutivas y una ha sido discontinua con una temporada de diferencia debido a la imposibilidad de recopilar suficientes sueros en condiciones correctas durante la temporada gripal 2007-2008. Se usaron sueros pre y post vacunales de pacientes mayores de 65 años para evaluar la respuesta inmunológica generada por los virus de la Gripe en dos aspectos muy importantes de la vida epidemiológica de un individuo, la reiteración en la exposición hacia las diferentes cepas gripales debido a la edad del individuo, y la reiteración en la vacunación debido a la inclusión de esta población en categoría de grupo de riesgo. Es muy interesante desde el punto de vista epidemiológico el estudio de la respuesta inmunológica en pacientes ancianos debido a que es presumible que a lo largo de toda su vida se hayan visto expuestos a varias cepas de Gripe diferentes, tantos actuales como las que ya no se encuentren en circulación. Esta reiteración en las infecciones naturales puede haber generado una respuesta de protección mucho más amplia que en la población infantil y en la joven-adulta. Además, la vacunación antrigripal anual, que en este colectivo se administra anualmente tanto en centros geriátricos como en los centros de salud correspondientes, expone a los pacientes ancianos a las cepas de gripe circulantes con el fin de generar una respuesta inmunológica completa y eficiente. Esta vacunación anual expone a este colectivo año tras año a las diferentes cepas anuales estacionales provocando una inmunización frente a las variantes menores que cada año surgen por deriva genética.

La media de edad de los individuos durante todas las temporadas es superior a los 74 años y la proporción de varones respecto de las mujeres es similar, fluctuando ligeramente dependiendo de la temporada, por lo que el grupo de estudio es homogéneo y adecuado para un estudio de este tipo. Para permitir una correcta generación de una respuesta antigénica completa con su correspondiente generación de anticuerpos específicos para cada cepa de gripe inoculada, se ha estimado que un tiempo de incubación de 29 días fue necesario para que el fenómeno de la inmunidad adquirida se desarrolle por completo. Las vacunas utilizadas por los centros de salud o los centros geriátricos en cada temporada fueron las correspondientes a cada estación epidémica propuestas por la OMS. A este respecto, es importante reseñar la variabilidad que existe en la composición de las vacunas año tras año ya que la deriva antigénica de los virus de la gripe provocan variaciones en el genoma vírico que otorgan diferentes características a unos virus y a otros, y que pueden variar el comportamiento de una misma cepa de una temporada hacia la siguiente. La respuesta a la vacunación puede depender no solo del individuo sino también de la composición de la vacuna y del modo de diseño de la misma.

Evaluación de la respuesta inmunológica frente a la vacunación antigripal anual

La respuesta inmunológica general de los individuos estudiados frente a la vacunación es muy diferente en función la cepa utilizada en la vacuna y de las características epidemiológicas de la temporada gripal en la que fue recogida la muestra. El porcentaje de personas protegidas antes de la vacunación frente a las diferentes cepas es bastante similar, observándose valores que oscilan entre el 22,7% de la cepa H1N1pdm09 y el 55,6% de la cepa H3N2. No parecen existir en este caso diferencias apreciables entre las cepas de Gripe B y las de A, puesto que los valores son similares.

En este caso, la cepa H1N1pdm09 muestra el valor más bajo debido a que su aparición reciente en el año 2009 como un nuevo virus triple recombinante no ha permitido aun generar una respuesta protectora en la población derivada de la exposición ni de la vacunación durante el periodo de estudio. Aun así, el valor de pre-protección frente a esta cepa puede ser debido por una parte a la rápida diseminación de este virus durante su brote pandémico, que en muchos casos ha cursado con una sintomatología subclínica y que pudo generar una alta tasa de contagio que derivara en protección de las personas infectadas, o debido a un efecto de inmunidad cruzada proviene de su relación directa con el antiguo linaje H1N1 del cual deriva⁴².

⁴³.

Cabe destacar también la importancia de los valores de pre protección del linaje Yamagata de Gripe B, muy similares a los del linaje Victoria, ya que en ausencia de circulación activa y de la existencia de vacunas anuales donde sistemáticamente en los últimos años se ha estado incluyendo el linaje Victoria como cepa de Gripe B, no parece haberse observado un fenómeno de aclarado de la inmunidad debido a esta causa.

Por otra parte, los altos valores de protección previa a la vacunación de las cepas H3N2 y antigua H1N1 parecen derivar de que estas dos cepas de Gripe A son las que comúnmente circulan por España durante las temporadas epidémicas, por lo que su inclusión obligatoria en la vacunación además de su exposición reiterada por la circulación endémica son la causa de que casi la mitad de la población mayor de 65 años se encuentre protegida previamente a ninguna acción profiláctica.

Por su parte, la efectividad de la vacunación es fácilmente observable a través del porcentaje de población que ha respondido a la vacunación generando seroprotección (título >1/40), denominándose en este estudio como "% de post-protegidos". En este caso se tendrá el porcentaje de población que realmente posee títulos protectores debido a la inoculación de la vacuna.

En el caso de la protección post vacunación parece observarse ciertas diferencias entre la protección que ofrecen las cepas de Gripe A y las de Gripe B. Las cepas de Gripe A parecen generar un porcentaje algo mayor de protección debido a la vacunación que las cepas de Gripe B. En este caso, los valores de protección de Gripe A oscilan entre el 33% de la antigua cepa H1N1, 35,4% frente a H3N2 hasta el 42% de la cepa H1N1pdm09, mientras que los valores de Gripe B se encuentran en torno al 16-21%, lo que puede ser debido principalmente a la circulación más general de los virus de Gripe A y más débil o enmascarada de los virus de Gripe B. Pese a la aparición reciente de la cepa pandémica H1N1pdm09, esta parece responder muy

bien hacia la generación de una respuesta inmunológica protectora, incluso mejor que sus predecesoras.

Aunque los porcentajes de protección debidos a la vacunación son relativamente discretos, el porcentaje de población protegida después de un episodio de vacunación, que engloba a los que se encontraban pre-protegidos junto con los que han sido protegidos por la vacunación, es bastante elevado y parece funcionar correctamente como mecanismo de protección de la población. Al analizar estos datos, se puede observar como la mayor parte de la protección en todas las cepas proviene de la protección previa que poseen los individuos antes de vacunarse, ya que en todos los casos el porcentaje de protegidos por la vacunación es siempre inferior al de pre-protección. Sin embargo, en el caso del virus H1N1pdm09 la protección derivada de la vacunación es claramente superior a la producida por el estado previo de inmunidad de los pacientes. Al juntar ambos procesos, se obtienen valores de protección de la población que son bastante más altos frente a los virus de la Gripe A, con valores que oscilan desde el 64% hasta el 91%, frente al 54-63% de protección total frente a las cepas de Gripe B.

El porcentaje de seroconversión (generación de al menos 4 veces más títulos de anticuerpos mediante la vacunación) también parece ser mayor en las cepas de Gripe A que en las de B. Los porcentajes frente a Gripe A oscilaron entre 33 y el 56%, mientras que frente a la Gripe B los porcentajes estuvieron entre el 15 y el 21%. La vacunación ofrece por tanto, una mayor protección en conjunto a los virus del grupo A. Cabe destacar también el alto valor de seroconversión de la cepa H1N1pdm09 (51%), ya que en tan solo dos años estudiados ha sido capaz de generar una respuesta de seroconversión similar a la de la cepa H3N2 (56,7%).

Es por tanto muy relevante valorar la importancia que poseen los estados de inmunidad previos de los individuos, que pueden derivar tanto de las exposiciones naturales a los diferentes virus, como de las vacunaciones reiteradas por pertenecer a un grupo de riesgo debido a la edad. La vacunación por sí sola no parece provocar un efecto de protección que pueda parar por completo el avance del virus en este estrato de población. Sin embargo, este tratamiento profiláctico dentro de un programa de vacunación plurianual, además de la edad del individuo, si parecen ser factores determinantes en la protección de la población. Esto pone de especial relevancia a los Centros Nacionales de Gripe distribuidos por todo el mundo, que junto con la OMS generan anualmente nuevas vacunas antigripales determinando de la temporada anterior los virus que van a circular en la siguiente.

La mejora de estos procesos pasa por la búsqueda de nuevas regiones antigénicas que posean mayor efectividad en la generación de anticuerpos en la población, además de la mejora en la producción de vacuna, mediante nuevos adyuvantes o estados físicos del virus que permitan al sistema inmune generar una respuesta mayor.

Evaluación de la respuesta inmunológica frente a la vacunación antigripal por temporadas

Al analizar la respuesta inmunológica por temporadas se puede observar la evolución de la protección de la población frente a las diferentes cepas de Gripe, pudiendo comprobar que procesos han provocado cambios en la inmunidad adquirida de los individuos. La rápida evolución de los virus de la Gripe cada año debido al *Drift* antigénico (cambios antigénicos menores) provocan que anualmente los virus de la gripe a los que se ve enfrentada la población desarrollen cambios lo suficientemente relevantes como para que la vacunación anual de la temporada anterior no confiera una respuesta completamente efectiva. Debido a esto, el estudio de la evolución de la respuesta inmunológica en comunidades cerradas de individuos que poseen características definitorias entre ellos, es de vital importancia para poder diseñar estrategias de protección de la población y de manejo y gestión de situaciones epidémicas.

Niveles de protección en la etapa de pre inmunización

Dentro de esta evolución frente a la respuesta inmunológica, parece diferenciarse claramente dos comportamientos contrarios y opuestos entre las cepas de Gripe A y de Gripe B en el nivel de pre protección de la población. Dentro de las cepas de Gripe A H3N2 y antiguo H1N1, el nivel de protección previa a la vacunación posee un patrón en "U", comenzando con altos niveles de pre-protección, que descienden posteriormente para volver a ascender al final del periodo de estudio. Por el contrario, el patrón del linaje Yamagata de Gripe B posee un patrón ascendente desde el comienzo del estudio y el linaje Victoria un patrón oscilante con un máximo al final del mismo. Los niveles de seroprotección previa más altos son los registrados usando la cepa H3N2 y antigua H1N1, mientras que ambos linajes de Gripe B poseen porcentajes de protección más bajos, resultados que concuerdan con los obtenidos en el análisis global. Pese a que ambas cepas, H3N2 y antigua H1N1, poseen patrones muy similares en la evolución de los valores de pre protección, la evolución de esta última cepa parece seguir un patrón más abrupto, con descensos en la protección mucho más altos que en el caso de la cepa H3N2. Esto puede ser debido a la circulación preferente de la cepa H3N2 desde la pandemia de Hong Kong del año 1968^{44, 45, 46, 47}, que relegó la circulación de la antigua cepa estacional H1N1 a un segundo plano. Esta circulación enmascarada y/o subclínica puede ser la causante, no solo del menor nivel de protección previa de la población, sino de que la evolución de la misma sea más abrupta debido a que está más influenciado por otros factores externos, como pudo ser la aparición del virus pandémico H1N1pdm09, que puede haber desplazado en mayor medida la inmunidad previa de esta cepa durante los años 2009 y 2010 (años de la primera y segunda ondas de pandemia).

Por otra parte, sorprende la creciente evolución de la protección previa a la vacunación correspondiente al linaje Yamagata de Gripe B debido a, no solo a la ausencia de circulación conocida durante las temporadas 2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011, sino también a la ausencia de esta cepa en la vacunación anual antigripal durante las temporadas estudiadas. Pese a encontrarse esta protección en porcentajes no excesivamente altos que oscilan desde 26% en la temporada 2008-2009 hasta el 46% en la temporada 2010-2011, la evolución lineal en constante aumento de esta protección sugiere que el linaje Yamagata de Gripe B puede haber estado circulando de forma subclínica entre la población, de forma que

haya podido generar inmunidad natural por infección subclínica sin mostrar signos ni síntomas en los pacientes, o habiendo sido confundidos con síndromes pseudogripales y/o catarrales. En este sentido cabe recalcar que los virus de la Gripe B son virus eminentemente humanos siendo este su único hospedador, y que por tanto la supervivencia y transmisión de estos dos linajes en ausencia de circulación detectable debe suceder de forma silenciada a través de infecciones subclínicas. La ausencia de vacunación frente a este linaje durante estas temporadas apoya que la circulación silenciada haya sido la única vía de aumento de la inmunidad previa a la vacunación.

Por su parte, la evolución oscilante del linaje Victoria de Gripe B, linaje que si se ha encontrado en circulación detectable en las temporadas estudiadas y que ha formado parte de las vacunas anuales antigripales de las mismas, sigue un patrón que puede ser debido a la propia evolución en la incidencia y prevalencia de este linaje en la población.

Por su parte, la nueva cepa H1N1pdm09 sufre en las dos temporadas estudiadas desde su aparición un aumento desde el 10% de individuos pre protegidos hasta un valor en torno al 35%. Este aumento obedece a la circulación mayoritaria del virus durante las temporadas 2009-2010 (periodo de segunda onda pandémica) y 2010-2011 (primera epidemia causada en su mayor parte por la cepa H1N1pdm09), lo que ha provocado que la infección natural de la población, sobre todo en el primer periodo, haya generado inmunidad adquirida en los infectados, suplementado a la acción de la vacuna.

Niveles de protección en la etapa de post inmunización

La evolución del nivel de protección derivado de la vacunación posee también dos patrones distintos y bien diferenciados entre las cepas de Gripe A y de B. En los primeros, se observa un ascenso moderado de la protección (en torno a un 20%) desde la temporada 2006-2007 hasta la temporada 2008-2009 en ambas cepas H3N2 y antigua H1N1, para después descender ambos a niveles cercanos al 20% de protección. La dinámica de la curva de protección derivada de la vacunación se encuentra por tanto en relación indirecta con la evolución de la pre-protección. Se puede observar como después de una temporada o periodo donde existe un alto nivel de protección debido a la vacuna, posteriormente se produce un aumento en los niveles de protección previa de la población. Esto es indicativo de que los programas de vacunación para protección de la población de riesgo son efectivos y que la reiteración en la vacunación parece producir efectos positivos en estos colectivos. Debido a este efecto, el descenso tan acusado en las dos últimas temporadas del efecto protector de la vacuna no ha de ser asumido como un efecto derivado de una deficiente acción profiláctica, sino debido la generación de inmunidad en la población mediante la vacunación en las temporadas anteriores, que provoca que se tenga de base un nivel de protección muy aceptable.

La aparición del nuevo virus H1N1pdm09 en el año 2009 puede haber modificado la dinámica de estas relaciones. Sin embargo, el periodo de tiempo a estudio donde toma relevancia este virus es demasiado corto para poder extrapolar conclusiones, por lo que se reserva estas conclusiones para estudios posteriores que impliquen más temporadas en los

ensayos. Por su parte, este virus durante estas dos temporadas posee una evolución donde, tanto los niveles de pre protección como los derivados de la vacunación, ascienden de manera moderada, por lo que parece no haberse alcanzado aun en la temporada 2010-2011 un punto de equilibrio que fluctúe de manera similar al resto de virus de Gripe A.

Pese a que ambos linajes de Gripe B poseen comportamientos distintos con respecto a los de Gripe A, la relación entre los niveles de pre protección y los derivados de la vacunación es la misma. En este caso, la evolución de la seroprotección debido a la vacuna posee un patrón en U que comienza con un moderado descenso, una etapa en forma de valle y posteriormente un aumento moderado en el linaje Victoria y un estancamiento en el linaje Yamagata.

Es muy relevante la evolución de la protección del linaje Yamagata puesto que pone en evidencia el comportamiento de este virus. Los niveles de pre protección de la población frente a este linaje aumentan paulatinamente desde la última vacunación estacional en la que se administro este virus en la vacuna trivalente anual antigripal. En los posteriores años, el nivel de pre-protección sigue en aumento mientras que la protección derivada de la vacunación cae a niveles muy bajos (en torno a un 5%). Debido a la ausencia del linaje Yamagata en las vacunas de las temporadas 2009-2010 y 2010-2011, la protección que sufre la población derivada de la vacunación no puede ser debida a la acción inmunizante de esta, por lo que pone de relevancia un posible efecto de protección cruzada entre los dos linajes de Gripe B, aunque en publicaciones previas el evento de protección de un linaje frente a otro se ha puesto de manifiesto como imposible debido a la gran divergencia de ambos linajes desde su separación en la década de los 70^{48, 49, 50, 51}. Por otra parte, los niveles de pre protección pueden ser derivados, no solo de la presencia del linaje Yamagata en la vacuna anual de la primera temporada estudiada, sino como se ha dicho anteriormente, a la presencia de circulación de este linaje de forma subclínica en la población, ya que la co-circulación de ambos linajes se ha demostrado en trabajos previos^{49, 50}.

Por su parte, la evolución de la protección derivada de la vacunación del linaje Victoria de Gripe B sigue un patrón ascendente desde el comienzo de la administración de este linaje en la vacuna a partir de la temporada 2009-2010. Es relevante también el descenso de protección en la temporada 2008-2009, donde la vacuna estuvo compuesta por el linaje Yamagata. Esto pone de manifiesto la importancia de la integración de ambos linajes en la vacuna anual antigripal, pasando de un formato trivalente a un formato tetravalente, con la intención de conseguir la protección completa de la población. Como se puede observar en este trabajo, los efectos del abandono de la vacunación en la población frente a uno de los dos linajes durante una temporada provoca la disminución de la protección previa a la vacunación en torno a un 20%, mientras que su administración provoca el efecto contrario en la misma magnitud durante las temporadas estudiadas.

Niveles de seroconversión

Como se ha expuesto anteriormente, la seroconversión es el aumento de la titulación de anticuerpos protectores frente a un determinado patógeno en al menos 4 veces más a la titulación previa a la administración de la vacuna o a la exposición natural en un individuo. El estudio de la seroconversión en la vacunación nos permitirá por tanto comprobar la efectividad vacunal desde la perspectiva de la potencia en la generación de una respuesta inmune efectiva.

En general, los niveles de seroconversión en las diferentes cepas a estudio parecen seguir un patrón evolutivo muy similar al de la protección producida por la vacuna. Es evidente por tanto que las diferencias existentes entre los patrones de Gripe A y de Gripe B han quedado registradas también en la evolución de la seroconversión. Los niveles de seroconversión se encuentran en función de la similitud genética entre las cepas incluidas en la vacunación con las cepas circulantes en cada temporada, además de las características propias de la vacuna, como puede ser si esta es viva atenuada, los adyuvantes que se incluyan, etc^{52, 53, 54}. Es por eso que la fluctuación que poseen los niveles de seroconversión son explicables por las cualidades epidemiológicas de cada temporada gripal, y que serán estudiadas más adelante en nuevos trabajos.

Evaluación de la inmunidad cruzada frente al virus de la gripe aviar H5N1

Una vez conocido el nivel de inmunización de la población frente a las cepas de Gripe estacionales del territorio, es posible evaluar el efecto que posee en la generación de inmunidad de tipo cruzada frente a otras cepas de carácter pandémico.

De un total de 178 pacientes analizados utilizando los ensayos de inhibición de hemaglutinación, un pequeño porcentaje (3,3%) resultó positivo ante la presencia de anticuerpos capaces de reconocer específicamente proteína recombinante glicosilada del virus de la gripe aviar H5N1. El resto de sueros analizados no ofrecieron resultados positivos y por tanto es presumible la ausencia de este tipo de anticuerpos. Esta presencia de anticuerpos que han sido capaces de reconocer esta proteína sugiere que estos pacientes poseen una cierta protección frente al virus H5N1. De entre los seis individuos positivos, el título de anticuerpos mostrado ha sido bajo en cuatro de los ellos (títulos en torno a 1/20 y 1/10), y los dos últimos mostraron títulos en torno a 1/320. Dado que un título protector de anticuerpos se considera a partir de 1/40, estos dos últimos pacientes poseerían títulos de anticuerpos que serían capaces de proteger *in vitro* frente a este virus pandémico. La presencia de anticuerpos en niveles más bajos en el resto de los sujetos positivos no protegería al individuo frente a la infección, pero denota la exposición de estos pacientes hacia un evento relacionado con la inmunidad que ha generado anticuerpos específicos.

Ya que no se tiene constancia de circulación del virus de la gripe aviar H5N1 por el territorio español, el mecanismo de generación de inmunidad adquirida de estos pacientes no ha podido ser la exposición directa frente al virus, que como se ha comentado anteriormente, es de carácter endémico en el sureste asiático. La presencia de anticuerpos en este grupo de

personas parece responder a la generación de inmunidad de tipo cruzada debido a la exposición reiterada natural a las cepas endémicas del territorio durante la vida de un individuo, además de las exposiciones a las vacunaciones anuales debido a la pertenencia por edad a un grupo de riesgo al que se le administran vacunas antigripales anualmente. Esta inmunidad cruzada puede haber surgido de la compartición de epítomos específicos en las hemaglutininas de los diferentes tipos de la Gripe A, ya que la evolución de estas proteínas desde un antecesor común del virus entre el H5N1 y virus endémicos de España como el H1N1pdm09, H3N2 o el antiguo linaje H1N1, puede haber permitido que ciertas regiones aminoacídicas con capacidad inmunogénica hayan permanecido no alteradas o mínimamente alteradas, pudiendo permitir esta generación de anticuerpos de amplio espectro.

El estado de inmunización previa de la población mayor de 65 años parece abalar la existencia de sujetos donde se haya registrado la existencia de anticuerpos capaces de reconocer el antígeno recombinante, debido a que los altos valores de protección encontrados, tanto pre-vacunales como post-vacunales, hacen sospechar de un efecto de protección derivado del alto porcentaje de inmunidad en este estrato de población.

Debido al bajo número de casos positivos frente a la totalidad de los sueros analizados, no se ha podido generar ningún estadístico que permita analizar con más profundidad posibles relaciones de sexo, edad, vacunación o antecedentes médicos que puedan ser esclarecedores de este evento. Queda reservada por tanto la inferencia de estas variables a un nuevo estudio con un número de sueros mucho más elevado. El resto de los sueros analizados no presentaron en ningún momento ninguna reacción en ninguno de los dos ensayos que permita pensar en la presencia de anticuerpos, por lo tanto se les supone como individuos no protegidos y que no han generado una respuesta heterotípica frente al virus H5N1 de la gripe aviar.

La edad parecer ser el principal factor que permite la generación de anticuerpos capaces de reconocer cepas de gripe que nunca han circulado por un territorio. Esto parece derivar de los tiempos de exposición de la población a los virus de la gripe circulantes y de las vacunaciones anuales reiterativas. Dado que el virus de la gripe suele infectar de 4 a 5 veces de media en la vida de un individuo inmunocompetente, es evidente que las infecciones naturales serán escasas, y probablemente el mismo individuo será infectado por cepas de gripe diferentes que se encuentre circulando en el momento de la infección a lo largo de su vida. Por otra parte, las vacunaciones anuales (que son más comunes en población anciana y población de riesgo como el personal sanitario) introducen una nueva vía exógena de generación de inmunidad adquirida, que puede aumentar mucho la capacidad del sistema inmune del individuo para generar respuestas frente a una gran cantidad de tipos del virus de la gripe, que deriva de la mejora y distribución de nuevas vacunas antigripales que cada año son diseñadas por la OMS con la colaboración de los Centros Nacionales de Gripe, en función de las nuevas variantes circulantes del virus de la gripe.

La realización de estas mismas técnicas utilizando sujetos jóvenes adultos y niños ofreció resultados negativos en todos los pacientes analizados⁵⁵. Esto sugiere que las infecciones naturales por el virus de la gripe, además de la vacunación anual reiterada, puede provocar en la edad anciana de un individuo la generación de una respuesta heteróloga hacia

la protección frente a virus que no han circulado nunca por un territorio, debido a que la exposición reiterada a virus endémicos genera una respuesta inmunológica de generación de anticuerpos derivados de epítomos que están muy conservados en la escala filogenética del virus. La edad avanzada de este grupo de pacientes en contraposición a los analizados en estudios anteriores actúa como un efecto reiterativo para la generación de inmunidad cruzada.

En la actualidad existen varios estudios donde se demuestra la producción de anticuerpos heterosubtípicos mediante la administración de la vacuna antigripal trivalente estacional, que han podido neutralizar el virus de la gripe aviar H5N1 en una pequeña proporción de la población⁵⁶. La vacunación mediante virus de gripe vivo y atenuado (LAIV), que se administra por vía nasal, junto con la vacunación intramuscular inactivada (IIV), han quedado demostrados como métodos de generación de respuestas heterólogas hacia otras cepas del virus de gripe A^{57, 58}, generando anticuerpos neutralizantes frente a la región del tallo de la hemaglutinina con capacidad de actuación frente a un gran grupo de cepas gripales⁵⁹. La presencia de anticuerpos que sean capaces de reconocer proteína recombinante del virus de la gripe aviar H5N1 en la subpoblación de Castilla y León podría derivar directamente de la recurrencia en el tratamiento profiláctico, que es más usual en los pacientes de grupos de riesgo como la población anciana. Esta observación apoya la evidencia de que la generación de anticuerpos con inmunidad cruzada deriva de la activación de las células Cross reactive B de memoria con capacidad para reconocer epítomos conservados en múltiples cepas del virus de la gripe^{60, 61}.

Durante la pandemia del año 2009 producida por el virus H1N1pdm09, la población mayor de 65 años estaba protegida debido a la existencia de anticuerpos anti-HA inducidos por exposiciones a los antígenos relacionados con las cepas H1N1, como por ejemplo el virus A/H1N1 de 1918 o cepas que circularon antes de 1957^{62, 63, 64}. Es evidente por tanto la acción protectora que posee la exposición natural a las cepas circulantes de gripe durante la vida de un individuo en la respuesta heteróloga del sistema inmune. La presencia de este evento de reactividad cruzada con el virus pandémico H1N1pdm09 en personas que han sufrido infecciones con virus más antiguos pero relacionados en la escala filogenética, afirma que la reactividad cruzada que se da en los individuos de este estudio deriva también de un mecanismo similar, donde la compartición de epítomos puede haber generado anticuerpos que reconozcan partes similares de la hemaglutinina. En este sentido, conviene remarcar la importancia de la distancia filogenética entre los distintos virus de la gripe del grupo A, que puede haber promovido que, pese a las similitudes aun conservadas, las diferencias en la secuencia solo han permitido promover la protección y la generación de anticuerpos específicos en un pequeño porcentaje de la población anciana, y en un nulo porcentaje de la población infantil y joven-adulta⁵⁵.

La proteína de la hemaglutinina posee una región globular donde se encuentra la región variable y es la principal diana para los anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, la parte del tallo de esta proteína está mucho más conservada entre las diferentes cepas. Estudios recientes han sugerido que los anticuerpos también poseen actividad neutralizante en esta región, lo que puede contribuir a la reactividad cruzada entre las distintas cepas mediada por las infecciones naturales y por la vacunación^{65, 66}. Esta reactividad cruzada que ofrece la parte más conservada de la hemaglutinina puede ser la razón o causa de que personas que nunca

han estado en contacto con un virus como el de la gripe aviar posean anticuerpos capaces de reconocer la hemaglutinina. Por otro lado, debido a que la parte del tallo es una zona muy poco inmunógena, puede explicar también el bajo porcentaje de inmunización en la población estudiada. Para completar este estudio se debe no solo aumentar el número de individuos para comprobar la secuencia de la proporción, sino también realizar los ensayos de HI con cepas que estén menos alejadas en la escala filogenética de las cepas circulantes en España, pero que nunca hayan tenido presencia en el país. Esto ayudará a comprender mejor la importancia de las distintas estructuras terciarias de la hemaglutinina y de la secuencia aminoacídica, y su papel en la generación de la inmunidad en el hospedador.

Por otra parte, la divergencia que existe entre los linajes H1, H2 y H5, pertenecientes al Grupo 1 (más relacionados con las aves), con los linajes H3 y H7 (pertenecientes al Grupo 2) puede haber contribuido también a la mitigación de este efecto⁶⁷, ya que la estructura de la hemaglutinina se encuentra diferenciada en dos subgrupos con carácter filogenético en función de la composición aminoacídica del tallo de esta proteína⁶⁸. El virus H3N2 lleva circulando en España desde la década de los 70, relegando al antiguo virus H1N1 (A/URSS/90/70) y a su predecesor H2N2, lo que puede haber provocado que la capacidad inmunogénica heteróloga del virus se haya visto mermada por no pertenecer al Grupo 1, haciendo un efecto de aclarado sobre la reactividad cruzada, que previsiblemente podría haber sido mayor en circulación reiterada de la cepa antigua H1N1. El virus H3N2 actual es además fruto de un fenómeno de recombinación genética de varios genes aviáres, humanos y provenientes del cerdo, aunque en la actualidad la cepa que afecta a humanos ha evolucionado hasta tener solo esta especie como objetivo, encontrándose bastante desligado de los antepasados comunes.

La reactividad cruzada en individuos que nunca han sufrido infección frente a cepas de gripe ha sido también probada en otras investigaciones previas. La infección natural por el virus H1N1pdm09 ha sido demostrada como un método de generación de respuesta cruzada, no solo frente al virus de la gripe aviar H5N1, sino también a cepas anteriores de esta variante como el virus H1N1 que causó el brote pandémico de 1918 (la denominada Gripe Española) o la antigua variante H1N1 de carácter estacional que quedó relegada después de la aparición de la variante pandémica de 2009⁶⁹. Por otro lado, también ha sido demostrada la generación de una respuesta de reactividad inmunológica cruzada en ratones utilizando vacuna antigripal viva atenuada frente al virus H1N1pdm09, que ha generado respuesta de generación de anticuerpos contra los virus H5N1 y H5N2 además de contra otras cepas estacionales⁷⁰. Por otra parte, la estructura de la hemaglutinina posee una especial relevancia en la respuesta de inmunidad cruzada, ya que en estudios previos, pacientes no infectados en su historia personal por el virus H5N1 mostraron reactividad cruzada *in vitro* frente a la partícula HA₂ de la hemaglutinina cultivada mediante virus Vaccinia recombinante, teniendo resultados negativos frente a las partículas HA₀ y HA₁⁷¹.

Este evento es de especial importancia en la generación de una vacuna universal que pueda servir frente a la mayoría de las cepas actualmente existentes, ya que la partícula HA₂ confiere una protección mucho más amplia que otras regiones de la hemaglutinina frente a un gran grupo de cepas, debido principalmente a que esta región está muy conservada en la

escala filogenética del virus de la gripe⁷². Esta partícula HA2 ha sido tradicionalmente relegada en la generación de vacunas debido a que las zonas más inmunogénicas de la proteína hemaglutinina son las ubicadas en la cabeza de la misma. El difícil acceso de los receptores de los linfocitos a estas zonas ha impedido una utilización más general para la inmunización de la población, sin embargo debido a su universalidad derivada de la conservación a lo largo de la historia evolutiva del virus genera un especial interés para la vacunación universal.

Es importante desde el punto de vista científico la ampliación de este trabajo para poder obtener conclusiones estadísticas que puedan permitir conocer las posibles relaciones del fenómeno de reactividad cruzada con la edad, sexo, condición clínica, número de vacunas administradas y tipos, número de infecciones gripales en la vida del individuo y las variantes de las cepas en los pacientes. La adecuación de este estudio a estas directrices pasa por la repetición del mismo con un aumento significativo en el tamaño muestral que permita la utilización de test estadísticos, además de la utilización de hemaglutininas de cepas salvajes de origen viral no recombinante para comprobar la reactividad cruzada en las condiciones más similares a la realidad posibles.

Conclusiones

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir que:

- 1- Los valores en la protección previa a la vacuna de los distintos virus gripales endémicos españoles está en consonancia con su nivel de incidencia y relevancia en las epidemias anuales.
- 2- Los niveles de pre-protección de los distintos virus están en función de los acontecimientos epidémicos y de la gestión vacunal de las temporadas anteriores.
- 3- Los niveles de protección derivados de la vacunación siguen con respecto a los niveles de protección pre-vacunal un patrón evolutivo de tipo inverso.
- 4- El comportamiento relevante a protección vacunal es opuesto entre los virus de Gripe A y los de Gripe B, siguiendo un patrón que oscila en función de que linaje de Gripe B se incluya en la vacuna y de la relevancia en la presencia de Gripe B durante las epidemias anuales de Gripe A. Es por esto denotar la importancia que posee la puesta a punto y administración de la nueva vacuna tetravalente que posee los dos linajes de Gripe B.
- 5- La protección frente a la nueva variante H1N1pdm09 ha resultado muy rápida durante el periodo pandémico y durante la primera epidemia estacional producida por este virus.
- 6- Existe un porcentaje del 3,3% de la población mayor de 65 años en Castilla y León que posee anticuerpos capaces de reconocer específicamente proteína recombinante glicosilada del virus de la gripe aviar H5N1.
- 7- La presencia de estos anticuerpos en ausencia de circulación conocida del virus de la gripe aviar H5N1 por el territorio español se debe a un fenómeno de reactividad cruzada, que ha permitido al sistema inmune de los individuos positivos generar una respuesta de creación de anticuerpos capaces de reconocer este virus debido a fenómenos derivados de la exposición a infecciones naturales por otros virus gripales endémicos del territorio, y/o por las vacunaciones reiteradas a lo largo de su vida.
- 8- El fenómeno de reactividad cruzada se deriva de la compartición de epítomos específicos en zonas muy conservadas de la hemaglutinina de los virus de la gripe circulantes en España con respecto al virus de la gripe aviar H5N1.
- 9- La presencia de anticuerpos frente a H5N1 en la población anciana y no en la población joven-adulta e infantil se debe a un tiempo mucho mayor de exposición de los individuos mayores de 65 años a las infecciones naturales y a las vacunaciones.

Bibliografía

Bibliografia

1. Hirsch A. Handbook of Geographical and Historical Pathology. 2nd ed. London: New Sydenham Society; 1883.
2. Crosby AW. Epidemic and Peace, 1918. Wesport, CT: Greenwood Press; 1976 part IV.
3. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. Lancet 1933;2:66-8.
4. Francis T Jr. A new type of virus from epidemic influenza. Science 1940;92:405-8.
5. Taylor RM. A further note on 1233 (Influenza C) virus. Arch Gesamte Virusforsch 1951;4:485-95.
6. Burnet FM. Influenza virus on the developing egg. Changes associated with the development of an egg-passage strain of virus. Br J Exper Pathol 1936;17:282-95.
7. Mogabgab WJ, Green IJ, Dierkhising OC. Primary isolation and propagation of influenza virus in cultures of human embryonic renal tissue. Science 1954;120:320-1.
8. Hirst GK. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. Science 1941;94:22-3.
9. Francis T Jr, Salk JE, Pearson HE, et al. Protective effect of vaccination against influenza A. Proc Soc Exp Biol Med 1944;55:104-5.
10. Smorodintseff AA, Tushinsky kMD, Drobyshevskaya AI, et al. Investigation of volunteers infected with the influenza virus. Am J Med Sci 1937;194:159-70.
11. Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DG. Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3A resolution. Nature 1981;289:366.
12. Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: Monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. J Virol 1989;62:2762-72.
13. Schwarzmans SW, Adler JL, Sullivan RFJ, et al. Bacterial pneumonia during Hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. Arch Intern Med 1971;127:1037-41.
14. Bisno AL, Griffin JP, VanEpps KA. Pneumonia and Hong Kong influenza: a prospective study of the 1968-1969 epidemic. Am J Med Sci 1971;261:251-74.
15. Monto AS, Ross HW. The Tecumseh study of respiratory illness. X. Relation of acute infections to smoking, lung function, and chronic symptoms. Am J Epidemiol 1978;107-57-64.
16. Ferson MJ, Morton JR, Robertson PW. Impact of influenza on morbidity in children with cystic fibrosis. J Paediatr Child Health 1991;27:308-11.

17. Edelen JS, Bender TR, Chin TDY. Encephalopathy and periocarditis during an outbreak of influenza. *Am J Epidemiol* 1974;100:79-83.
18. Buxton-Bridges C, Kuehnert MJ, Hall CB. Transmission of influenza: implication for control in health care settings. *J Infect Dis* 2003;37:1094-101.
19. Brankston G, Gitterman L, Hirji Z, et al. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis* 2007;7:257-65.
20. Glezen, WP, Couch RB. Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-1976. *N Engl J Med* 1978;298:587-93.
21. Inmunopatogénesis de la Gripe Pandémica del 2009. Raquel Almansa Mora. Tesis Doctoral 2012. Universidad de Valladolid.
22. E. C. Claas, A. D. Osterhaus, R. van Beek, J. C. De Jong, G. F. Rimmelzwaan, D. A. Senne, S. Krauss, K. F. Shortridge and R. G. Webster. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998;351:472-7.
23. K. Subbarao, A. Klimov, J. Katz, H. Regnery, W. Lim, H. Hall, M. Perdue, D. Swayne, C. Bender, J. Huang, M. Hemphill, T. Rowe, M. Shaw, X. Xu, K. Fukuda and N. Cox, Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279 1998;279:393-6.
24. A. Apisarnthanarak, R. Kitphati, K. Thongphubeth, P. Patoomanunt, P. Anthanont, W. Auwanit, P. Thawatsupha, M. Chittaganpitch, S. Saeng-Aroon, S. Waicharoen, P. Apisarnthanarak, G. A. Storch, L. M. Mundy and V. J. Fraser, Atypical avian influenza (H5N1), *Emerg Infect Dis* 2004;10:1321-4.
25. Pandemic influenza preparedness and response: a WHO guidance document. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 978 92 4 154768 0.
26. De Jong, J.C.; Claas, E.C.; Osterhaus, A.D.; Webster, R.G.; Lim, W.L. A pandemic warning? *Nature* 1997;389:554.
27. Liem, N.T.; Tung, C.V.; Hien, N.D.; Hien, T.T.; Chau, N.Q.; Long, H.T.; Hien, N.T.; Maile, Q.; Taylor, W.R.; Wertheim, H.; et al. Clinical features of human influenza a (h5n1) infection in Vietnam: 2004-2006. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009;48:1639-1646.
28. Claas, E.C.; de Jong, J.C.; van Beek, R.; Rimmelzwaan, G.F.; Osterhaus, A.D. Human influenza virus a/hongkong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine* 1998;16:977-978.
29. WHO, Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza a/(h5n1) reported to who.

- [Http://www.Who.Int/influenza/human_animal_interface/h5n1_cumulative_table_archives/en/index.html](http://www.Who.Int/influenza/human_animal_interface/h5n1_cumulative_table_archives/en/index.html). 2012.
30. Yang, Y.; Halloran, M.E.; Sugimoto, J.D.; Longini, I.M., Jr. Detecting human-to-human transmission of avian influenza a (H5N1). *Emerg. Inf. Dis.* 2007;13:1348-1353.
 31. Irene Ramos, Ana Fernandez-Sesma. Innate Immunity to H5N1 Influenza Viruses in Humans. *Viruses* 2012;4:3363-3388; doi:10.3390/v4123363
 32. Nelson and Holmes. *Nature Reviews Genetics* 2007;8:196–205. doi:10.1038/nrg2053
 33. Kathy Hancock, Ph.D., Vic Veguilla, M.P.H., Xiuhua Lu, M.D., et al.; Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med* 2009;361;20
 34. Hsieh S-M, Chang S-C. Cutting edge: insufficient perforin expression in CD8+ T Cells in response to hemagglutinin from avian influenza (H5N1) virus 1. *J Immunol.* 2006;176:4530–3.
 35. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ, et al. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control; 1982.
 36. Miller E, Hoschler K, Hardelid P, Stanford E, Andrews N, Zambon M. 2010. Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet* 375:1100 –1108.
 37. Cohen A, Belyavin G. The influenza virus hemagglutination inhibitors of normal rabbit serum: I. Separation of the inhibitory components. *Virology* 1961;13:58–67.
 38. Krizanová O, Rathová V. Serum inhibitors of myxoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1969;47:125–151.
 39. Barral, M, V Alvarez, R A Juste, I Agirre, y I Inchausti. First Case of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus in Spain. *BMC Veterinary Research* 2008;4:50. doi:10.1186/1746-6148-4-50.
 40. Iglesias, I, M Martínez, M J Muñoz, A de la Torre, y J M Sánchez-Vizcaíno. First Case of Highly Pathogenic Avian Influenza in Poultry in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 2010;4:282-285. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01145.x.
 41. Pérez-Ramírez, Elisa, Xneider Gerrikagoitia, Marta Barral, y Ursula Höfle. Detection of Low Pathogenic Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Castilla-La Mancha (south Central Spain). *Veterinary Microbiology* 2010;3-4:200-208. doi:10.1016/j.vetmic.2010.05.008.

42. Booy, Robert, Gulam Khandaker, Leon G Heron, Jiehui Yin, Bridget Doyle, Katherine K Tundo, Linda Hueston, Gwendolyn L Gilbert, C Raina Macintyre, y Dominic E Dwyer. Cross-reacting Antibodies Against the Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus in Older Australians. *The Medical Journal of Australia* 2011;194:19-23.
43. Hancock, Kathy, Vic Veguilla, Xiuhua Lu, Weimin Zhong, Eboneé N Butler, Hong Sun, Feng Liu, et al. Cross-reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *The New England Journal of Medicine* 2009;361:1945-1952. doi:10.1056/NEJMoa0906453.
44. Cécile Viboud, Rebecca F. Grais, Bernard A. P. Lafont, Mark A. Miller, Lone Simonsen. Multinational Impact of the 1968 Hong Kong Influenza Pandemic: Evidence for a Smoldering Pandemic. *Journal of Infectious Diseases* 2005; 192:233–48.
45. Andrew D Cliff, Peter Haggett and Matthew Smallman-Raynor. An exploratory method for estimating the changing speed of epidemic waves from historical data. *International Journal of Epidemiology* 2008;37:106–112 doi:10.1093/ije/dym240
46. Gavin J. D. Smith, Justin Bahl, Dhanasekaran Vijaykrishna, Jinxia Zhang, Leo L. M. Poon, Honglin Chen, Robert G. Webster, J. S. Malik Peiris, Yi Guan. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *PNAS* 2009;106:11709–11712
47. Edwin D. Kilbourne. Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12: 1
48. Hay, A. J., V. Gregory, A. R. Douglas, and Y. P. Lin. 2001. The evolution of human influenza viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356:1861–1870.
49. Kanegae, Y., S. Sugita, A. Endo, M. Ishida, S. Senya, K. Osako, K. Nerome, and A. Oya. 1990. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J. Virol.* 64:2860–2865.
50. Rota, P. A., T. R. Wallis, M. W. Harmon, J. S. Rota, A. P. Kendal, and K. Nerome. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza B virus since 1983. *Virology* 1990;175:59–68.
51. Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T. Gripe. En *Medicina Interna de Farreras/Rozman*. Ediciones ELSEVIER Madrid (España) 17ª edición 2012. ISBN 978-84-8086-895-2. 2012:2267-2272.
52. Edwards KM, Dupont WD, Westrich MK, et al. A randomized controlled trial of cold-adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease. *J Infect Dis* 1994;169(1):68-76.
53. Ritzwoller DP, Bridges CB, Shetterly S, et al: Effectiveness of the 2003–2004 influenza vaccine among children 6 months to 8 years of age, with 1 vs 2

- doses. *Pediatrics* 2005; 116(1):153-159.
54. CDC : Assessment of the effectiveness of the 2003–04 influenza vaccine among children and adults – Colorado, 2003. *MMWR* 2004;53(31):707-710.
 55. Almansa R, et al. H5 influenza haemagglutinin and cytokine profiles in cultured PBMCs from adults and children. *Inmunología*. 2011. doi:10.1016/j.inmuno.2011.06.001
 56. Bethell D, Saunders D, Jongkaewwattana A, Kramyu J, Thitithayanont A, et al. Evaluation of In Vitro Cross-Reactivity to Avian H5N1 and Pandemic H1N1 2009 Influenza Following Prime Boost Regimens of Seasonal Influenza Vaccination in Healthy Human Subjects: A Randomised Trial. *PLoS ONE* 2013;8(3): e59674. doi:10.1371/journal.pone.0059674
 57. Ambrose CS, Walker RE, Connor EM. Live attenuated influenza vaccine in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006;17: 206-212.
 58. Jürgen Stech. Attenuated influenza A viruses with modified cleavage sites in hemagglutinin as live vaccines. *Expert Review of Vaccines* 2008;7(6):739-743 (doi: 10.1586/14760584.7.6.739)
 59. Wei CJ, Boyington JC, McTamney PM, Kong WP, Pearce MB, et al. Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science* 2010;329: 1060-1064.
 60. Corti D, Langedijk JP, Hinz A, Seaman MS, Vanzetta F, et al. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One* 2010;5: e8805.
 61. Wrammert J, Koutsonanos D, Li GM, Edupuganti S, Sui J, et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med* 2011;208: 181-193.
 62. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, Liu F, Dong L, DeVos JR, Gargiullo PM, Brammer TL, Cox NJ, Tumpey TM, Katz JM. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N. Engl. J. Med.* 2009;361:1945–1952.
 63. Ikonen N, Strengell M, Kinnunen L, Osterlund P, Pirhonen J, Broman M, Davidkin I, Ziegler T, Julkunen I. High frequency of crossreacting antibodies against 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus among the elderly in Finland. *Euro Surveill.* 2010;15:19478.
 64. 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 –1108.

65. Corti D, Suguitan AL, Jr, Pinna D, Silacci C, Fernandez-Rodriguez B, Vanzetta F, Santos C, Luke C, Torres-Velez F, Temperton N, Weiss R, Sallusto F, Subbarao K, Lanzavecchia A. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J. Clin. Invest.* 2010;120:1663–1673. doi:1610.1172/JCI41902.
66. Wrammert J, Koutsonanos D, Li GM, Edupuganti S, Sui J, et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med* 2011;208: 181-193.
67. Waleed H. Mahallawi, Anand V. Kasbekar, Maxwell S. McCormick, Katja Hoschler, Nigel Temperton, Samuel C. Leong, Helen Beer, Francesca Ferrara, Paul S. McNamara, Qibo Zhanga. Infection with 2009 H1N1 Influenza Virus Primes for Immunological Memory in Human Nose-Associated Lymphoid Tissue, Offering Cross-Reactive Immunity to H1N1 and Avian H5N1 Viruses. *J Virol.* 2013. 87:5331-5339
68. Ekiert DC, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science.* 2009;324:246–251.
69. Mahallawi WH, Kasbekar AV, McCormick MS, et al. Infection with 2009 H1N1 influenza virus primes for immunological memory in human nose-associated lymphoid tissue, offering cross-reactive immunity to H1N1 and avian H5N1 viruses. *J Virol.* 2013; 87(10):5331-9. doi: 10.1128/JVI.03547-12
70. Yo Han Jang, Young Ho Byun, Yoon Jae Lee, Yun Ha Lee, Kwang-Hee Lee, Baik Lin Seong. Cold-Adapted Pandemic 2009 H1N1 Influenza Virus Live Vaccine Elicits Cross-Reactive Immune Responses against Seasonal and H5 Influenza A Viruses. *J Virol.* 2012;86(10): 5953–5958. doi: 10.1128/JVI.07149-11
71. Noisumdaeng P, Pooruk P, Kongchanagul A, Assanasen S, Kitphati R, Auewarakul P, Puthavathana P. Biological properties of H5 hemagglutinin expressed by vaccinia virus vector and its immunological reactivity with human sera. *Viral Immunol.* 2013;26(1):49-59. doi: 10.1089/vim.2012.0055.
72. Taia T. Wang, Gene S. Tan, Rong Hai et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(44): 18979–18984. doi: 10.1073/pnas.1013387107

