



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

**ASOCIACIÓN ENTRE LA AVIDEZ DE ANTICUERPOS
ANTI-INFLUENZA Y LA GRAVEDAD DE LA INFECCIÓN**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA

DR. JONNATHAN OMAR CÁZARES LARA

TUTORES DE TESIS

**DR. SANTIAGO PÉREZ PATRIGEON
DR. EDUARDO CARRILLO MARAVILLA**

Ciudad de México
2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Título de Tesis:

ASOCIACIÓN ENTRE LA AVIDEZ DE ANTICUERPOS ANTI-INFLUENZA Y LA GRAVEDAD DE LA INFECCIÓN



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

Dr. Sergio Ponce de León Rosales
Director de Enseñanza INCMNSZ

Dr. Alfonso Gujias Herrero
Subdirector de Servicios Médicos
Profesor Titular del Curso de Medicina Interna

Dr. Santiago Pérez Patrigeon
Profesor adscrito de Infectología
Tutor de Tesis

Dr. Eduardo Carrillo Maravilla
Profesor Adscrito de Medicina Interna
Tutor de Tesis

Dr. Jonnathan Omár Cázares Lara
Residente de cuarto año de Medicina Interna

AGRADECIMIENTOS:

A mis amigos, por volver ligero este esfuerzo.

A mi tutor Santiago, por su dedicación a este trabajo y la guía que me ha dado durante varios años.

Al Instituto de Nutrición, que me enseñó la forma más exigente de llevar mi comportamiento médico por el resto mi vida.

A mi familia, por los años de esfuerzo que me ha permitido llegar a esta nueva titulación y porque sé que seguirán en mi compañía para toda la vida en los nuevos retos que me sigo planteando.

Lo bueno de lograr una meta es compartirla y acoplarla a los demás aspectos que te completan como ser humano.

INDICE

Resumen	5
1. Introducción	6
I. La infección por el virus de Influenza	
a. Importancia de brotes y pandemias	
b. Shift y Drift	
c. Hipermutación somática	
d. La hiperrespuesta inmune en influenza	
II. La Red Mexicana de Investigación Clínica en Enfermedades Emergentes REDMEXEI y el estudio de Influenza	
a. La REDMEXEI	
b. El estudio de ILI002	
3. Justificación	9
4. Planteamiento del problema.....	9
5. Hipótesis	10
6. Objetivos.....	10
a. 5.1. Objetivo General	
b. 5.2. Objetivos Particulares	
7. Material y Métodos	10
8. Resultados	12
9. Discusión.....	29
10. Conclusión.....	31
11. Bibliografía.....	31

RESUMEN:

INTRODUCCIÓN:

Los factores humorales relacionados con la gravedad de la influenza aún no se conocen por completo. La avidéz del anticuerpo anti-influenza se ha estudiado como un marcador de gravedad. Existe evidencia de que los pacientes con enfermedad grave muestran un porcentaje de avidéz más alto que los pacientes con enfermedad más leve, pero otros estudios han demostrado lo contrario. Nuestro estudio comparó la avidéz de la respuesta humoral anti-Influenza H1N1 y H3N2 analizando su asociación con la gravedad en pacientes pertenecientes a la cohorte ILI002.

METODO:

El proyecto ILI002 incluyó pacientes de abril de 2010 hasta abril de 2014, ≥ 18 años de edad, que se presentaron con enfermedad similar a influenza a 6 hospitales de referencia en México, se evaluaron prospectivamente con seguimiento al día de inclusión o Día 0 y al Día 28. Se obtuvieron muestras de sangre e hisopados nasofaríngeos en cada visita. Para este sub-estudio solo se incluyeron los sueros de pacientes con una prueba positiva de PCR de Influenza H1N1 o H3N2. Los títulos de anticuerpos anti-influenza (Ab) se midieron con un ELISA basal y la avidéz se midió agregando al ELISA basal una concentración a 4M o 10M de Urea. Las medianas se compararon usando la prueba de rango con signo de pares apareados de Wilcoxon y prueba de Mann Whitney. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism v7.

RESULTADOS:

Se incluyeron 228 pacientes con H1N1 y 204 pacientes con H3N2. Los títulos de anticuerpos anti-influenza H1N1 de todos los pacientes aumentaron el Día 28 (0.7795 vs 1.095 $p < 0.0001$) y la diferencia se mantuvo al separar el grupo de pacientes Grave y No Grave. Al Día 28, los pacientes Graves tenían títulos de Ac más altos en comparación con los No Graves (1.305 vs 1.038 $p < 0.0001$). Con diferencias significativas en el porcentaje de avidéz al Día 28 a una concentración 4M (96.46 vs 93.58 $p = 0.0281$).

Los títulos de anticuerpos anti-influenza H3N2 aumentaron el Día 28 (1.151 vs 0.9215 $p < 0.0001$) y la diferencia se mantuvo al separar el grupo de pacientes Graves y No Graves. Se encontró un mayor porcentaje de avidéz en pacientes Graves al Día 0 a concentraciones de Urea 4M y 10M (92.66 vs 85.55 $p = 0.0045$ y 76.80 vs 70.28 $p = 0.0133$) y al Día 28 únicamente a 10M (89.53 vs 81.31 $p = 0.0161$), resultados que se refuerzan en las restas de ELISA basal – ELISA con Urea, con diferencias significativas al Día 0 restando el resultado del suero expuesto Urea 4M (0.0500 vs 0.1230 $p = 0.0028$) y al Día 28 con ambas concentraciones de Urea (0.03175 vs 0.0665 $p = 0.0122$ y 0.1178 vs 0.2175 $p = 0.0009$).

CONCLUSIÓN:

Nuestros hallazgos sugieren un comportamiento distinto entre H1N1 y H3N2, en cuanto a la inmunidad humoral. Un porcentaje importante de pacientes en este estudio tienen al Día 0 inmunidad previa a H1N1 y H3N2, aunque después de 28 días sus títulos aumentan. La avidéz de anticuerpos es un marcador predictor de la gravedad de la influenza desde el Día 0 para H3N2; pero no para H1N1, en el cual se encontró una mayor avidéz en pacientes Graves hasta el Día 28.

INTRODUCCIÓN:

No existe enfermedad febril aguda con síntomas respiratorios que pueda propagarse tan rápidamente a un gran número de personas como la influenza. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en las epidemias anuales se ve afectada entre el 5 y el 15% de la población a nivel mundial, de 3 a 5 millones de casos son graves y causa entre 290 000 a 650 000 muertes (1).

El virus de influenza puede presentarse en su forma estacional, como un brote o como una pandemia. Los brotes y las pandemias son resultado de cambios en las cepas circulantes o de la aparición de nuevas cepas, esto gracias al reordenamiento viral dependiente de la variación antigénica, la cual envuelve principalmente las dos glucoproteínas externas del virus, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). A los mecanismos productores de variación antigénica se les conoce como *drift* o *shift* antigénico, dependiendo si la variación es pequeña o grande. El *drift* antigénico se refiere a alteraciones relativamente menores y es el resultado de un acumulo gradual de cambios en aminoácidos en uno o más de los sitios antigénicos identificados de las glucoproteínas externas. Debido a que la generación de anticuerpos por exposición a cepas previas no neutraliza la nueva variante efectivamente, la selección inmunológica toma lugar y la nueva variante suplanta las cepas previas como el virus predominante. El *Shift* antigénico se presenta en intervalos impredecibles con cambios radicales en la hemaglutinina y neuraminidasa o en ambos, que tienden a generar un esparcimiento grande e incluso pandemias, pues resultan en virus hacia los que la población tiene poca o nula inmunidad y hacia los que tendrá alta susceptibilidad (5).

El siglo pasado ocurrieron 3 pandemias importantes, en 1918 la gripe española, en 1957 la gripe asiática que inició en Pekín y en 1968 la gripe de Hong Kong. Siendo la de 1918 la de mayor relevancia por haber causado un estimado de 30 a 50 millones de muertes alrededor del mundo (2,3,4). Como ya comentamos, son las características inherentes al virus lo que provoca este comportamiento repetitivo de brotes y pandemias, generando interés y preocupación en la comunidad hasta la fecha. Los 16 subtipos de hemaglutininas y 9 tipos de neuraminidasa identificadas en el humano y diferentes fuentes de zoonosis (principalmente en aves), forman un reservorio permanente y una amenaza para una nueva propagación (5).

Mayo de 2009, fue la última ocasión en que una pandemia por el virus de influenza se hizo presente. Un nuevo virus denominado H1N1, conformado de un triple arreglo genético de origen aviar, porcino y humano (4,6), afectó de forma grave a poblaciones muy distintas a lo que se tenía acostumbrado y surgieron nuevos factores de riesgo asociados a peores desenlaces. En contraste con la influenza estacional, los pacientes jóvenes y previamente sanos desarrollaban enfermedad grave; entre los pacientes hospitalizados hasta el 34 % requería cuidados en terapia intensiva debido a falla respiratoria que se asociaba a mortalidad de hasta el 46% (7,8,9,10), sin observar desenlaces tan graves en la población de mayor edad (4), a este hallazgo se le dio explicación por la exposición previa del grupo etario de mayor edad a cepas de virus que llevaron en su estructura antígenos en común con la nueva cepa H1N1 pandémica, otorgando reactividad cruzada de anticuerpos contra el nuevo agente. Esta información se sustentó al documentar la infección por influenza porcina en sueros congelados desde 1958 (11) y la evidencia de infección en el primer humano en 1974 (12)

La pandemia resulto en la oportunidad de investigar la respuesta inmune en pacientes jóvenes nunca antes expuestos a los antígenos que componían el nuevo agente infeccioso, y en pacientes de mayor edad expuestos previamente a partículas similares pertenecientes a virus en circulación de años previos; y se encontró, dependiendo de los antecedentes, respuestas diferentes del sistema inmunológico; por ejemplo la vacunación previa provoca títulos de anticuerpos basales más altos para múltiples antígenos de hemaglutinina, el antecedente de infección por influenza A reduce la morbilidad y mortalidad causada por otro tipo de influenza A antigénicamente divergente, por los heterosubtipos de anticuerpos neutralizantes que pueden conferir protección ante influenza AH1N1 pandémica por reactividad cruzada (13), una respuesta que se ha encontrado limitada a pacientes de mayor edad, aunque sin provocar beneficio alguno (14,15,16); y es justamente la diferencia generacional el antecedente que más queremos destacar, pues refleja la variabilidad en el repertorio inmunológico

de cada individuo para responder a un virus que no tenía precedentes en la totalidad de su estructura, pero sí de algunos de sus componentes.

El repertorio de inmunoglobulinas para la identificación de nuevos agentes infecciosos se logra a través de la diversificación, la cual es dependiente del antígeno y genera mayor afinidad de la región variable de las cadenas de inmunoglobulina a través de la hipermutación somática (17). La suma de las afinidades de cada anticuerpo con un antígeno da como resultado la avidéz.

La avidéz es un subgrado de la maduración del sistema inmunológico ante estímulos antigénicos. Por ejemplo, la revacunación anual incrementa la avidéz de los anticuerpos y disminuye los títulos de IgG neutralizante para influenza, observando que un número bajo de anticuerpos neutralizantes de alta avidéz es suficiente para otorgar protección ante una infección, como un proceso de madurez de anticuerpos (18), además de generar control viral a través de citotoxicidad dependiente de complemento y mediada por anticuerpos.

No existen muchos estudios que asocien desenlaces clínicos con avidéz de anticuerpos. Con resultados opuestos entre los estudios de Kelvin K.W et al, donde los pacientes con enfermedad grave tenían mayor avidéz en anticuerpos no neutralizantes que los pacientes con enfermedad leve (19), totalmente opuesto a la asociación de una mayor avidéz en anticuerpos no neutralizantes con mejores desenlaces clínicos que Monsalvo (20) había postulado. Sin volver a encontrar estudios en la literatura que intenten esclarecer este rubro en la respuesta del sistema inmunológico.

Otros aspectos inmunológicos en los que si se ha ahondado, son la activación del perfil inflamatorio y poca regulación del sistema inmune cuando está respondiendo al virus pandémico. Nelson et al. encontraron correlación entre la elevación sostenida de citocinas proinflamatorias (e.g. IL-6, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, sTNFR-1) con peores desenlaces y la supresión en inmunidad adaptativa Th1/Th17 liberadora de citocinas (CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, IL-17^a e IFN-alfa) al ser comparada con influenza estacional (21). Estudios in vitro e in vivo muestran que la respuesta pro-inflamatoria exuberante de citocinas innatas es la marca característica de la influenza grave tanto en influenza pandémica como estacional (22,23,24,25,26,27,28). IL-16 induce inflamación excesiva de tejido, FNT-alfa destruye el tejido pulmonar y CCL2/MCP-1 con CXCL8/IL-8 reclutan y activan monocitos/macrófagos y neutrófilos respectivamente, en modelos de neumonía por influenza, hasta progresar a síndrome de insuficiencia respiratoria aguda grave (SIRA), además de asociarse a signos de gravedad como fiebre, taquipnea, desaturación y peores desenlaces, como estancia en terapia intensiva y hospitalización prolongada; en cuanto a la cinética, los altos niveles de citocinas disminuyen en un corto plazo en influenza estacional, mientras se mantienen elevadas en la influenza pandémica, lo cual se asocia a carga viral elevada (21,22,28) y con una regulación a la baja de genes responsables de la inmunidad adaptativa (25,29) y de células T en H1N1 pandémico (30,31). En resumen, la alta carga viral mantiene la prolongada carga de citocinas, que se traduce en los graves desenlaces en los brotes pandémicos, que no son tan comunes en influenza estacional.

La respuesta innata temprana del sistema inmune al virus de influenza puede jugar un papel importante para controlar la replicación viral y manejar el pico de carga viral, debido a que la mayoría de los pacientes que tienen enfermedad grave fueron admitidos al hospital a los 5 días del inicio de los síntomas (19), pues es a las 48 horas de la inoculación cuando se observa el mayor incremento de la carga viral, justo cuando la respuesta innata del huésped falla. Esta defensa depende del reclutamiento de linfocitos T citotóxicos que responde específicamente a una nucleoproteína antigénica altamente homóloga presente en todos los virus de influenza A y que puede mantener suprimida la carga viral (32,33). A estos mecanismos de respuesta innata se le agregan el reconocimiento de receptores, mecanismos antivirales relacionados a interferón, la cascada del complemento, péptidos antimicrobianos (19, 34,35), y de los que se debe resaltar la presencia de anticuerpos de reactividad cruzada inducidos por infecciones por influenza previas, donde se incluyen anticuerpos de reactividad cruzada preexistentes y la respuesta secundaria de anticuerpos de las células B de memoria (19, 36).

La revacunación anual busca la maduración del sistema inmune, pero cuando el sistema inmune confronta los *Orthomyxoviridae*, una familia de virus que se reestructura, nunca se logra alcanza una respuesta efectiva, pues la vacuna se crea en base a cepas que predominaron una temporada previa, nos mantenemos de forma obligada

detrás de las modificaciones que los virus sean capaces de hacer para su permanencia y cada cierto tiempo las modificaciones estructurales coincidirán con un repertorio inmunológico común que es distribuido y compartido en la población, el cual se formó a través de años de exposición constante a epítopes de antígenos y al juntar ambos factores, da como resultado brotes y pandemias, por la reestructuración de un virus al que el sistema inmune de la población no es capaz de detener, pero que de igual manera se activa descontroladamente (5).

Inicio del brote en México

El 12 de abril de 2009, México respondió a una solicitud de verificación por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de un brote de enfermedad respiratoria aguda en la pequeña comunidad de La Gloria, Veracruz. Durante 15-17 de abril de 2009 la Secretaría de Salud de México recibió la notificación informal de grupos de neumonía grave rápidamente progresiva que se produjeron principalmente en la zona metropolitana de la Ciudad de México y el estado de San Luis Potosí.

La Red Mexicana de Investigación Clínica en Enfermedades Emergentes (REDMEXEI) y el estudio de la influenza.

En respuesta al brote, la Secretaría de Salud de México identificó la necesidad de desarrollar un programa de investigación coordinando enfermedades infecciosas emergentes a través de México.

Con este fin, una red de investigación clínica mexicana, “La RED” se inició en septiembre de 2009 entre el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas y Alergias (NIAID), EE.UU. y la Secretaría de Salud de México. Esta Red fue creada para llevar a cabo la investigación clínica en colaboración frente a las amenazas emergentes y contribuyendo directamente a mejorar el manejo clínico de enfermedades infecciosas de importancia para la salud pública.

La Red está compuesta por la Secretaría de Salud de México, el NIAID en los Estados Unidos y seis instituciones de salud mexicanas ubicadas en México:

Hospital Central de San Luis Potosí “Dr. Ignacio Morones Prieto”(SLP; 2012)
Hospital General “Dr. Manuel Gea González” (GAG; 2009)
Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIM; 2010)
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ; 2009)
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER; 2009)
Instituto Nacional de Pediatría (INP; 2009)

El estudio de ILI002

El primer estudio que se llevó a cabo en la REDMEXEI fue el ILI002 que inició en abril de 2010. Fue un estudio prospectivo longitudinal multicéntrico, llevado a cabo en los cinco centros en la Ciudad de México y uno en el estado de San Luis Potosí. Esta cohorte está formada de sujetos de cualquier edad que presentaban una enfermedad similar a la influenza o ILI (influenza-like illness).

Los participantes que se incluyeron podían presentar un ILI leve (éstos se trataron como pacientes ambulatorios), así como individuos que inicialmente presentaban un ILI más grave que requerían hospitalización, específicamente debido a una de las siguientes complicaciones:

Afecciones respiratorias que requirió oxígeno suplementario
Exacerbación de una condición médica preexistente
Colapso circulatorio, definido como: requisito de vasopresor a pesar de una hidratación adecuada
Lesión renal aguda
Insuficiencia hepática aguda
Complicaciones relacionadas con el embarazo, por ejemplo: parto prematuro, aborto espontáneo (≤ 20 semanas de gestación) y nacimiento (> 20 semanas de gestación)

Otras disfunciones orgánicas graves, por ejemplo, encefalitis, meningitis, enfermedad neurológica periférica, miocarditis, enteritis, miositis.

Se redactó una breve historia médica, se tomaron pruebas de laboratorio (citología hemática, proteína C reactiva (PCR), Creatinfosfocinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH)) y distintos tipos de muestras nasofaríngeas, suero y sangre, que se enviaron al laboratorio de Biología Molecular del departamento de enfermedades infecciosas, INCMNSZ, en la Ciudad de México.

Las muestras nasofaríngeas fueron analizadas por PCR transcriptasa inversa en tiempo real para Influenza A siguiendo el protocolo CDC 2009 (Organización Mundial de la Salud) del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. Las muestras de sangre y suero, se obtuvieron en la visita inicial y en la visita de seguimiento (día 28). Ya en el laboratorio se procesaron para la separación de suero, plasma y células mononucleares de sangre periférica o PBC (peripheral blood mononuclear cells) y se almacenaron a -70°C para su preservación para futuros estudios.

En el presente estudio se utilizaron las muestras de sueros almacenados de pacientes con diagnóstico positivo a influenza A H1N1 Y H3N2.

JUSTIFICACION

Hasta el momento hay información contradictoria que no permite aclarar si es que existe una avidéz fuerte o débil de los anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de influenza A H1N1 y A H3N2 en pacientes con enfermedad grave. Estas dudas surgen a raíz de intentar esclarecer el motivo de los casos graves en adultos de mediana edad sin antecedentes patológicos, Monsalvo encontró en 2011 una asociación entre desenlaces graves con títulos altos de anticuerpos no protectores con baja avidéz (20). Tan solo 1 año después Kelvin K.W. et al. encontró resultados contrastantes, con una asociación de títulos altos de anticuerpos por ELISA, que en la mayor parte eran no neutralizantes y niveles más altos de avidéz (evaluado por el índice de avidéz) en pacientes con enfermedad grave, definida como aquellos pacientes que requerían un ingreso a la unidad de terapia intensiva, requirieran soporte ventilatorio o fallecieran (19).

Encontrando la postura correcta a esta interrogante se podrá acoplar con los estudios de Synnove Eidem et al. que describieron la maduración de anticuerpos a través de vacunación continua, donde fue notable que con forme los anticuerpos se volvían neutralizantes no es necesario que los títulos incrementen, lo que incrementa es la avidéz y con eso es suficiente para presentar una adecuada respuesta inmune. Dejando al incremento de la avidéz como pieza fundamental en la maduración del sistema inmunológico (18) o acoplarlo a la postura de Lee et al. (22) con sus descripciones de la tormenta de citosinas pro inflamatoria sostenida por las cargas virales altas en la influenza pandémica y se le dará una nueva interpretación al origen de los desenlaces graves debido a una sobre activación de la respuesta inmune.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El virus de influenza es un patógeno en constante cambio cuyo huésped es expuesto de forma repetida a antígenos similares a lo largo de la vida, pudiendo condicionar una respuesta inmune tanto no neutralizante como neutralizante pero deletérea cuando la infección se hace presente.

La avidéz es un subrogado de la memoria inmunológica, e información discordante sobre su comportamiento en relación con la gravedad de la enfermedad se ha dado en años previos. Si bien se han sumado avances en describir el perfil inflamatorio al inicio de la infección, no ha quedado resultado el peldaño previo en donde los anticuerpos que están reaccionando al reconocimiento viral son los responsables del inicio de toda esta respuesta descontrolada e incluso sin eficacia alguna. ¿Cuándo se reconoce el antígeno por el anticuerpo se está llevando a cabo un enlace por medio de avidéz fuerte o débil?, ¿cuál es el tipo de avidéz que predominará en los pacientes

con peores desenlaces? y ¿cómo se acoplara esta información a todo lo descrito hasta el momento en cuanto a la forma en que se monta la respuesta inmune?

HIPOTESIS

Existe un peor desenlace clínico en los pacientes infectados con influenza H1N1 o H3N2 que presentan anticuerpos con mayor avidéz por la hemaglutinina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Comparar el índice de avidéz que presentan los anticuerpos de los pacientes Graves vs No Graves con infección por influenza H1N1 y H3N2.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar los títulos de anticuerpos anti-Influenza mediante una prueba de inhibición de la hemaglutinación.

Determinar la avidéz de los anticuerpos anti-Influenza para con su antígeno.

Comparar la avidéz de los pacientes al Día 0 y al Día 28 de seguimiento

Correlacionar estas 3 variables con la gravedad de la enfermedad por Influenza.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de Estudio

Estudio de Corte transversal prospectivo

Ubicación Temporal y Espacial

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se utilizaron los pacientes pertenecientes a La Red Mexicana de Investigación Clínica en Enfermedades Emergentes REDMEXEI y al estudio de influenza ILI002.

Criterios de Selección de la Muestra

La cohorte de ILI002 cuenta con aproximadamente 5662 muestras de pacientes Graves y No Graves positivos para influenza A H1N1 (378) y H3N2 (283), de las cual se analizaron 154 muestras de sueros de pacientes por tener seguimiento al Día 0 y Día 28, 85 dieron positivos para Influenza A H1N1 pdm y 69 para H3N2.

Criterios de Inclusión

Pacientes Graves y No Graves que hayan sido incluidos en el estudio ILI 002 con previa firma de consentimiento informado y autorización para usar sus pruebas de sangre para estudios

Pacientes adultos (18+) que sean diagnosticados con influenza A H1N1pdm o H3N2 con RT-PCR

Pacientes con muestra de suero al Día 0 y al Día 28

Criterios de Exclusión

Pacientes pediátricos

Muestra de suero insuficiente

Datos incompletos en la base de datos

Análisis de variables:

Variable Dependientes:

Títulos de anticuerpos anti-influenza A presentes en muestras de sueros de pacientes con diagnóstico positivo para Influenza A H1N1 y H3N2

Variable Independiente:

Pacientes con diagnóstico positivo para influenza A H1N1 y H3N2

Gravedad del paciente (Graves vs No Graves)
Día de seguimiento (Día 0 vs Día 28)

Descripción del análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad PRISM (versión 6.0f) para Mac. Se realizó la comparación de la media de las densidades ópticas de anticuerpos presentes en el día cero y día 28, las medias de las densidades ópticas de las muestras tratadas con urea al 4M y 10M y las medias de los porcentajes de avidéz utilizando la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes y para muestras pareadas se utilizó prueba de Willcoxon. $p > 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Descripción Operativa del Estudio.

Para realizar la técnica de ELISA indirecta se utilizó la proteína recombinante de Hemaglutinina de Influenza H1N1 (A/California/07/2009) y H3N2 (A/Wyoming/03/2003) SB Sino Biological, life technologies) como antígeno de recubrimiento.

ELISA.

El método ELISA se realizó con algunas modificaciones de los protocolos publicados. Placas inmunológicas de 96 pocillos (Bottom Immuno plate MaxiSorp, Thermo Scientific) se recubrieron con $1 \mu\text{g}$ HA/ml de carbonatos (NaHCO_3 , pH 9,6) durante la noche a 4°C , transcurrido en tiempo de incubación se bloqueó la placa con $200 \mu\text{l}$ de albumina bovina (BSA) al 5% y se incubó a 37°C durante 1 h. Después de lavar 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 0,05% de Tween 20 (PBST), se agregaron $100 \mu\text{l}$ de muestras de suero en dilución 1:100 por duplicado, se incubaron a 37°C durante 1h. La placa se lavó 3 veces terminado el tiempo de incubación, y se le agregó $100 \mu\text{l}$ de peroxidasa de rábano anti-humana (diluido 1: 1200) (Zymax; Invitrogen) a cada pocillo e incubó durante 2 hora a 37°C . Después de la incubación se realizaron 6 lavados, enseguida se le adiciono a cada pocillo $100 \mu\text{L}$ de sustrato, se incubó durante 15 min a 37°C . La lectura se realizó a 450 nm. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, y se calculó la media de la absorbancia. El título de ELISA fue la dilución a la que la absorbancia era la más cercana a 1^{26} .

Determinación de la Avidéz.

La prueba de Avidéz tiene un procedimiento parecido a la ELISA previamente descrito, con algunas modificaciones. Inicialmente se añadieron sueros a una dilución 1:100. Seguido de una incubación de 1 hora, se añadió urea 4 y 10 M posteriormente se incubaron las placas durante 30 min.

La avidéz se evaluó con la técnica de ELISA indirecta utilizando los valores de densidad óptica (DO) con y sin urea, que es un agente caotropico que rompe la unión entre el antígeno y el anticuerpo. Si un anticuerpo se une al antígeno débilmente, a continuación, la adición de urea interrumpirá la unión, lo que resulta en un valor de DO inferior.

El índice de Avidéz.

A continuación mostramos la fórmula que utilizamos para definir nuestras variable, la cual expresaremos como porcentaje de avidéz:

$$\text{OD del suero con urea} / \text{OD del suero sin tratar} \times 100\%$$

Para obtener más resultados en base a las densidades ópticas obtenidas usaremos las siguientes fórmulas:

PORCENTAJES DE AVIDEZ (ELISA con UREA/ELISA basal) X 100

VELOCIDADES (ELISA DÍA 28-ELISA DÍA 0) /28

DELTA (ELISA DÍA 28-ELISA DÍA 0)
DELTA % (VALOR % DÍA 28-VALOR % DÍA 0)
DIFERENCIAS (ELISA basal –ELISA con UREA)

DEFINICIÓN:

Densidad óptica: puede significar una diferencia de título de anticuerpos entre grupos cuando se utiliza el ELISA basal. Puede referirse a una diferencia en la avidéz de anticuerpos cuando se utiliza el resultado del ELISA expuesto urea.

Porcentaje de avidéz: representa una proporción de anticuerpos que permanece unido a su antígeno después de ser expuesto a las diferentes concentraciones del agente caotrópico. Siendo la totalidad el Elisa previo a la exposición a urea y la fracción resultante es el valor del ELISA posterior a exponerlo a las diferentes concentraciones de Urea.

DELTA: Cambio total después de los 28 días, del valor de los títulos de anticuerpos cuando se utiliza el ELISA basal. Cambio total después de los 28 días en la avidéz de los anticuerpos, cuando se utiliza el ELISA expuesto a urea.

DELTA %: cambio total después de los 28 días en una proporción de anticuerpos que permanece unido a su antígeno después de ser expuesto a las diferentes concentraciones del agente caotrópico.

RESULTADOS:

Se incluyeron 228 pacientes con H1N1 y 204 pacientes con H3N2. **A continuación presentamos los resultados, esta sección se divide de acuerdo al agente infeccioso, en la primera parte mostraremos los resultados de H1N1 y posteriormente de H3N2.**

H1N1:

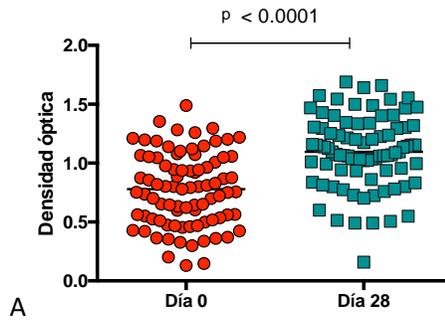
Medición de anticuerpos por ELISA en los pacientes Graves vs No Graves

En H1N1 en el ELISA basal:

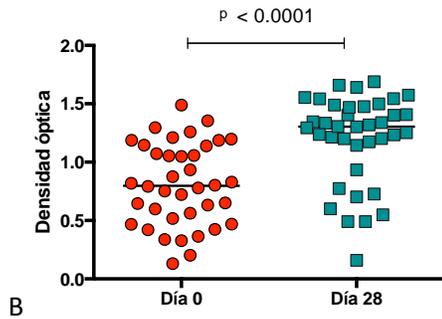
En la gráfica de Todos los pacientes (suma de Graves y No Graves), al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.7795 vs 1.095, $p < 0.0001$), **FIGURA 1 A**. En pacientes Graves, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.7978 vs 1.305, $p < 0.0001$), **FIGURA 1 B**. En pacientes No Graves, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día de 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.7515 vs 1.038, $p < 0.0001$), **FIGURA 1 C**. Al Día 0, al comparar la densidad óptica de anticuerpos entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia no fue estadísticamente significativa (0.7515 vs 0.7978, $p = 0.3993$), **FIGURA 1 D**. Al Día 28, al comparar la densidad óptica de anticuerpos entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia fue estadísticamente significativa (1.305 vs 1.038, $p < 0.0001$), **FIGURA 1 E**.

En la **FIGURA 1 A** el incremento de las DO representa el incremento en el número de anticuerpos después de 28 días de haberse expuesto al virus H1N1, como se esperarí en el seguimiento de cualquier proceso infeccioso y el resultado se mantiene aun analizando por separado a los pacientes Graves de los No graves en las **FIGURAS 1 B y 1 C** . En las **FIGURAS 1 D y 1 E** al comparar pacientes Graves vs No Graves, la diferencia no se observó al Día 0, se observó una mayor producción de anticuerpos en pacientes Graves hasta los 28 días de seguimiento.

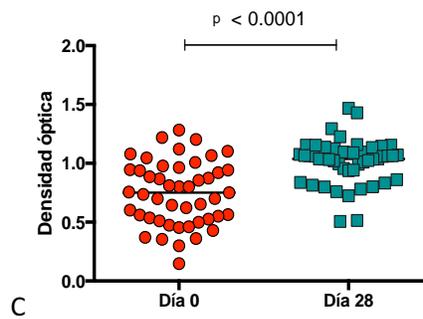
H1N1 ELISA basal Todos Día 0 vs Día 28



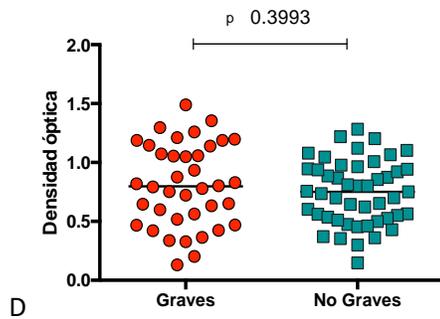
H1N1 ELISA basal Graves Día 0 vs Día 28



H1N1 ELISA basal No Graves Día 0 vs Día 28



H1N1 ELISA basal Día 0 Graves vs No Graves



H1N1 ELISA basal Día 28 Graves vs No Graves

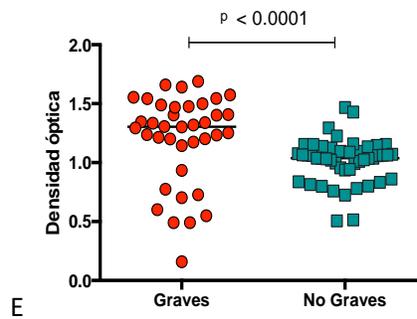


FIGURA 1. Diferencia entre las densidades ópticas. Día 0 círculo rojo y Día 28 cuadro verde, figura A, B y C. Pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figura D y E. Todos los pacientes, Día 0 vs Día 28. A. Pacientes Graves y No graves, día 0 vs día 28 respectivamente. B y C. Día 0 y Día 28, Graves vs No graves respectivamente. D y E. ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

Resultados de anticuerpos determinados por ELISA en pacientes Graves y No Graves expuestos a Urea.

En H1N1 ELISA con Urea 4 Molar:

Al Día 0, al comparar la densidad óptica entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia no fue estadísticamente significativa (0.7110 vs 0.6870, $p = 0.4349$), **FIGURA 2 A**. Al Día 28, al comparar la densidad óptica entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia fue estadísticamente significativa (1.247 vs 0.9890, $p < 0.0001$), **FIGURA 2 B**.

En H1N1 ELISA con Urea 10 Molar:

Al Día 0, al comparar la densidad óptica entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia no fue estadísticamente significativa (0.5973 vs 0.5500, $p = 0.4348$), **FIGURA 2 C**. Al Día 28, al comparar la densidad óptica entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia fue estadísticamente significativa (1.167 vs 0.9105, $p = 0.0010$), **FIGURA 2 D**.

En H1N1 Graves:

A una concentración de Urea 4M, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.7110 vs 1.247, $p < 0.0001$), **FIGURA 2 E**. A una concentración de Urea 10M, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.5973 vs 1.167, $p < 0.0001$), **FIGURA 2 F**.

En H1N1 No Graves:

A una concentración de Urea 4M, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día 0 vs día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.6870 vs 0.9890, $p < 0.0001$), **FIGURA 2 G**. A una concentración de Urea 10M, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.5500 vs 0.9105, $p < 0.0001$), **FIGURA 2 H**.

En las **FIGURAS 2 A, 2 B, 2 C y 2 D** observamos que en los pacientes Graves quedan más anticuerpos unidos a su antígeno después de intentar separarlos con concentraciones de Urea 4M y 10M, pero esto se observó hasta que han pasado 28 días de seguimiento y no se observó al Día 0. Lo que analizamos en esta prueba es la fuerza de unión del antígeno con su anticuerpo, lo cual es una respuesta que implica calidad de cada uno de los enlaces antígeno anticuerpo y no un incremento en la producción de anticuerpos, el hecho de que veamos una medición de DO, implica que existen anticuerpos pegados a su antígeno los cuales generan luminiscencia, por ello las DO que comparamos representan la cantidad de anticuerpos que conservo su enlace después de ser expuestos al agente caotrópico, o sea la Urea.

En las **FIGURAS 2 E, 2 F, 2 G y 2 H** se observó que tanto en los pacientes Graves como No Graves la fuerza de unión se incrementa al Día 28 y esto es evidente con ambas concentraciones de Urea, lo cual es una respuesta humoral esperada en el seguimiento de cualquier proceso infecciosos en el mismo grupo de pacientes.

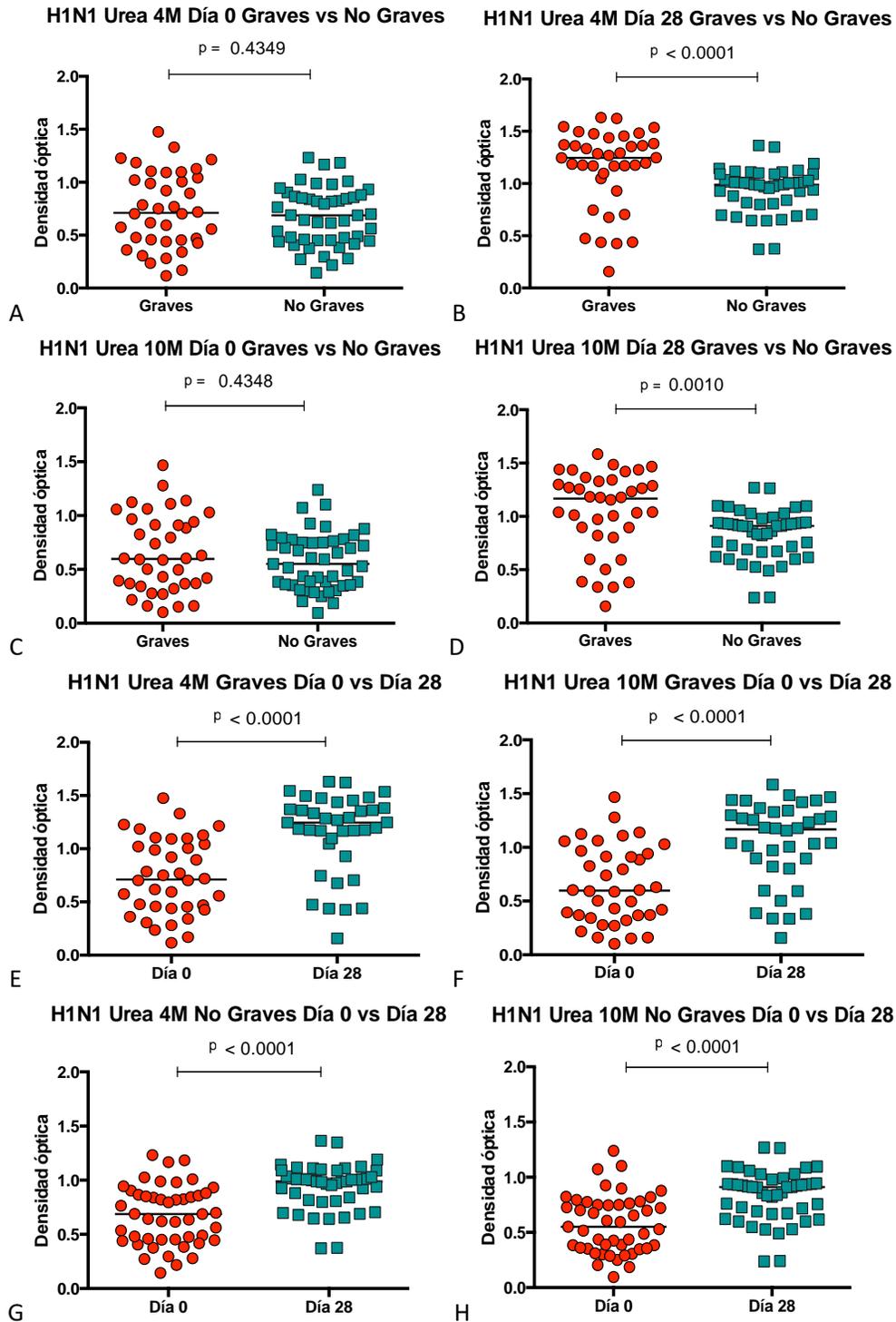


FIGURA 2. Diferencia entre las densidades ópticas, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A, B, C y D, Día 0 en círculo rojo y Día 28 en cuadro verde, figura E, F, G y H. Urea 4M Día 0 y Día 28, Graves vs No Graves, respectivamente. A y B. Urea 10M Día 0 y Día 28, Graves vs No Graves, respectivamente. C y D. Graves Urea 4M y 10M Día 0 vs Día 28, respectivamente E y F. No Graves Urea 4M y 10M, Día 0 vs Día 28, respectivamente G y H. **M: Molar.**

Porcentaje de avidéz al Día 0 y Día 28 en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (ELISA UREA/ELISA basal) X100.

En H1N1 al Día 0:

Al exponerlos los anticuerpos a concentraciones de Urea a 4M y 10M y comparar el % de avidéz de anticuerpos entre los pacientes Graves vs No Graves, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (91.01 vs 91.57, $p = 0.7004$ y 75.75 vs 76.91, $p = 0.6427$), **FIGURA 3 A y 3 B.**

En H1N1 al Día 28:

Al exponerlos los anticuerpos a una concentración de Urea y comparar el % de avidéz de anticuerpos entre los pacientes Graves vs No Graves, la diferencia fue estadísticamente significativas a una concentración de 4M (96.46 vs 93.58, $p = 0.0281$) y no se encontró diferencias significativas a una concentración de Urea 10 M (86.48 vs 81.72, $p = 0.0860$), **FIGURA 3 C y 3 D.**

En H1N1 pacientes Graves:

Al exponerlos los anticuerpos a una concentración de Urea 4M y 10M y comparar el % de avidéz de anticuerpos entre Día 0 vs Día 28, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (91.01 vs 96.45, $p = 0.0002$ y 75.75 vs 86.48, $p = 0.0015$), **FIGURA 3 E y 3 F.**

En H1N1 pacientes No Graves:

Al exponerlos los anticuerpos a una concentración de Urea y comparar el % de avidéz de anticuerpos entre Día 0 vs Día 28, la diferencia no fue estadísticamente significativa a una concentración de 4M (91.57 vs 93.58, $p = 0.0676$) y sí se encontró diferencias significativas a una concentración de Urea 10 M (76.91 vs 81.72, $p = 0.0029$), **FIGURA 3 G y 3 H.**

En la **FIGURA 3 C** el mayor porcentaje de avidéz en los pacientes Graves, demuestra que hay un incremento en el número de anticuerpos que se mantiene unido a su antígeno después de exponerlos un agente caotrópico, dicho de otra forma, una mayor avidéz en los anticuerpos de pacientes Graves infectados por H1N1. La diferencia significativa se observa únicamente a una concentración de Urea a 4M y apoya la hipótesis de que los pacientes más graves tienen una mayor avidéz de anticuerpos. Esta diferencia no es encontrada al Día 0 pero sí estuvo presente al Día 28, lo que vemos son cambios en el sistema inmune humoral posterior a la exposición del antígeno.

En las FIGURAS 3 E, 3 F, 3 G y 3 H lo que vemos es el cambio de los diferentes grupos de pacientes a lo largo de los 28 días de seguimiento. En las **FIGURAS 3 E y 3 F** se observó como en los pacientes Graves incrementó el porcentaje de avidéz al Día 28 sin importar la concentración de Urea a la que sean expuestos y en las **FIGURAS 3 G y 3 H** en los pacientes No Graves el mayor porcentaje de avidéz al Día 28 únicamente se observó al exponer los anticuerpos a la mayor concentración de Urea (10M). Estos resultados son esperados por las modificaciones que ocurren en el sistema inmune humoral después de haber reconocido a un agente infeccioso.

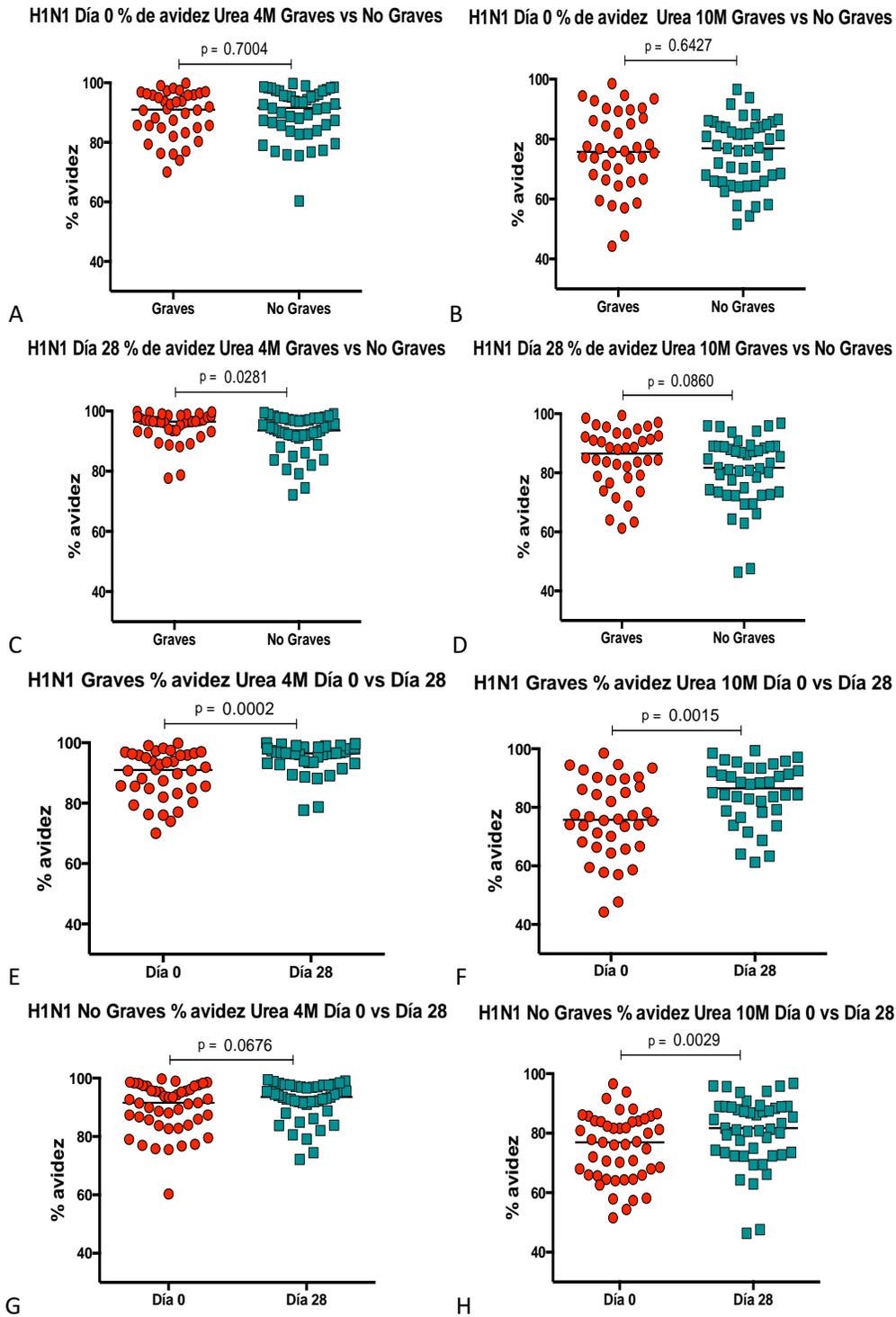


FIGURA 3. Diferencia entre los % de avidez, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figura **A**, **B**, **C** y **D**. Día 0 círculo rojo y Día 28 en cuadro verde, figuras **E**, **F**, **G** y **H**. Día 0 Urea 4M y 10M, Graves vs No Graves, respectivamente **A** y **B**. Día 28 Urea 4M y 10M, Graves vs No Graves, respectivamente **C** y **D**. Graves Urea 4M y 10M, Día 0 vs Día 28 **E** y **F**. No Graves Urea 4M y 10M, Día 0 vs Día 28 **G** y **H**. **M: Molar**.

Delta en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (ELISA DÍA28-ELISA DÍA 0)

En H1N1:

En los Deltas no hay diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes Graves y No Graves, tanto en los resultados de ELISA basal, ni en los ELISA que se expusieron a una concentración de Urea a 4M o 10M (0.3953 vs 0.2355 $p = 0.1837$, 0.3408 vs 0.2730 $p = 0.1364$ y 0.3795 vs 0.2925 $p = 0.1283$), FIGURA 4 A, 4 B y 4 C.

Delta % en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (VALOR % DÍA 28-VALOR % DÍA 0)

En H1N1:

El Delta del % de avidéz, al exponer los anticuerpos a una concentración de Urea 4M o 10M y comparar el grupo de pacientes Graves vs No Graves, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (3.916 vs 2.667, $p = 0.1869$ y 4.913 vs 7.900 $p = 0.6054$), FIGURA 5 A y 5 B.

Velocidad en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (ELISA DÍA 28-ELISA DÍA 0) /28

En H1N1:

En la velocidad no hay diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes Graves y No Graves, tanto en los resultados de ELISA basal, ni en los ELISA que se expusieron a una concentración de Urea a 4M o 10M (0.01415 vs 0.0084, $p = 0.1837$, 0.01215 vs 0.0098, $p = 0.1375$ y 0.01355 vs 0.0104, $p = 0.1317$), FIGURA 6 A, 6 B y 6 C.

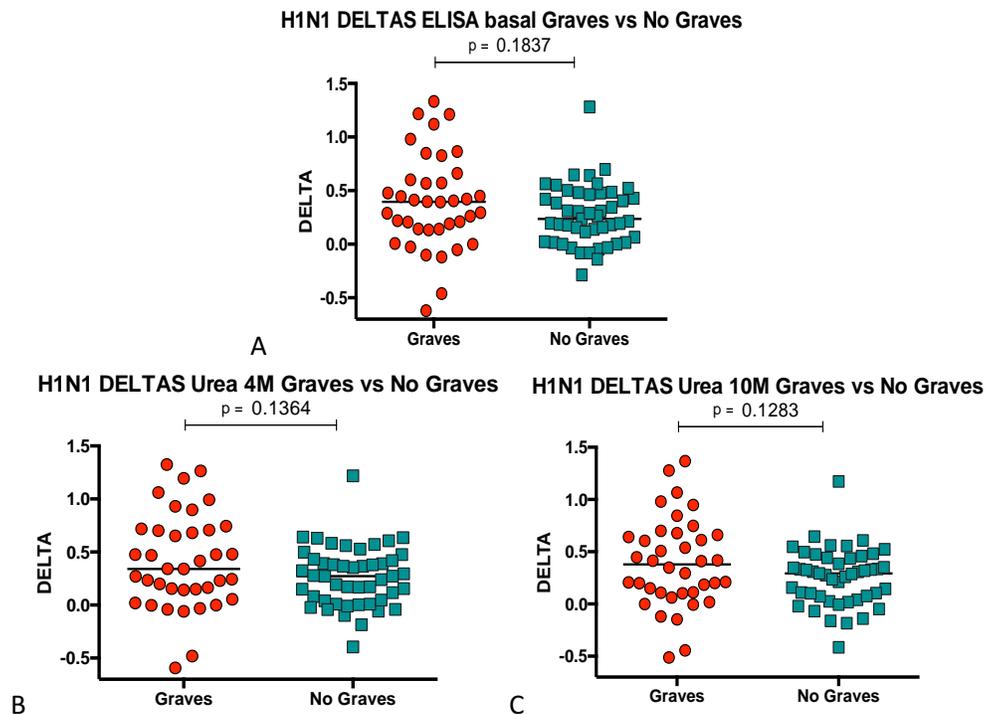


FIGURA 4. Delta, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A, C y B. ELISA basal, Elisa con Urea 4M y 10M, Graves vs No Graves, respectivamente A, B y C. M: Molar, DELTA: ELISA DÍA 28-ELISA DÍA 0, ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

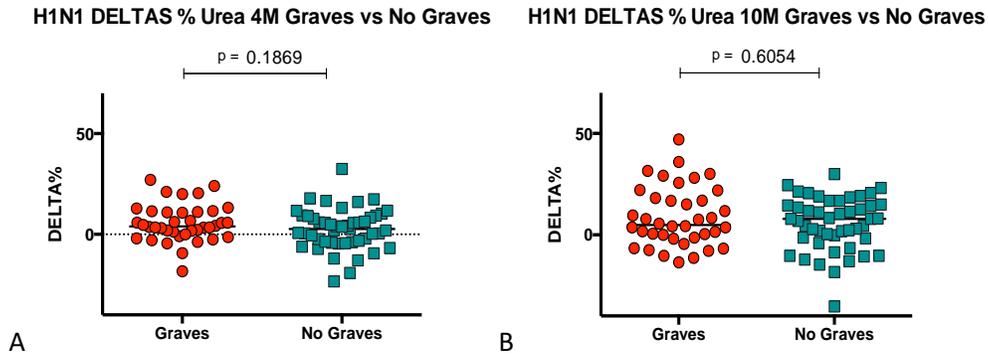


FIGURA 5. Delta %, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A y B. Urea 4 M y 10M, Graves vs No Graves. A y B. M: Molar, DELTA %: VALOR % DÍA 28-VALOR % DÍA 0.

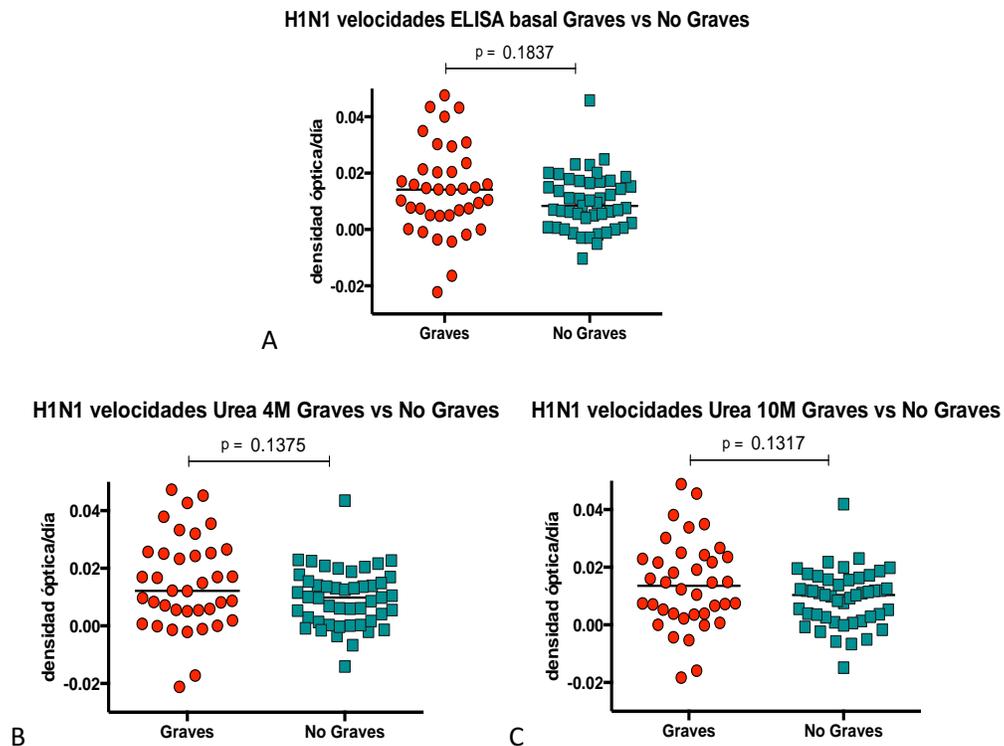


FIGURA 6. Velocidad, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A, B y C. ELISA basal, Elisa con Urea 4M y 10M, Graves vs No Graves, respectivamente A, B y C. M: Molar, ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

Diferencias en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (ELISA-UREA)

En H1N1:

Al Día 0, en ELISA basa – ELISA expuesto a Urea 4M y 10M, comparando pacientes Graves vs No Graves, no se encontraron diferencia estadísticamente significativa (0.0600 vs 0.0705, $p = 0.9492$ y 0.1475 vs 0.1630 , $p = 0.5424$), FIGURA. 7 A y B.

Al Día 28, en ELISA basa – ELISA expuesto a Urea 4M y 10M, comparando pacientes Graves vs No Graves, no se encontraron diferencia estadísticamente significativa (0.04675 vs 0.0650 , $p = 0.0971$ y 0.1450 vs 0.1740 , $p = 0.2247$), FIGURA. 7 C y D.

En las FIGURAS 7 A, 7 B, 7 C y 7 D se evalúa nuevamente la intensidad de la avidéz. Se obtiene un valor en DO de los anticuerpos en su ELISA basal y se le resta el valor de DO de los mismos anticuerpos al exponerlos a Urea (lo cual significa que es después de separar los anticuerpos). El grupo de pacientes que tengan una menor diferencia serán los que tengan anticuerpos con una mayor fuerza de enlace a su antígeno o sea mayor avidéz. La única tendencia observada en la FIGURA 7 C correspondiente al Día 28 expuesta a una concentración de Urea 4M, a favor de una menor separación de anticuerpos en el grupo Graves por su mayor avidéz, lo que muestra cambios en la avidéz que es mayor en pacientes Graves por la activación del sistema inmunológico, lo cual no están presentes al día de inclusión.

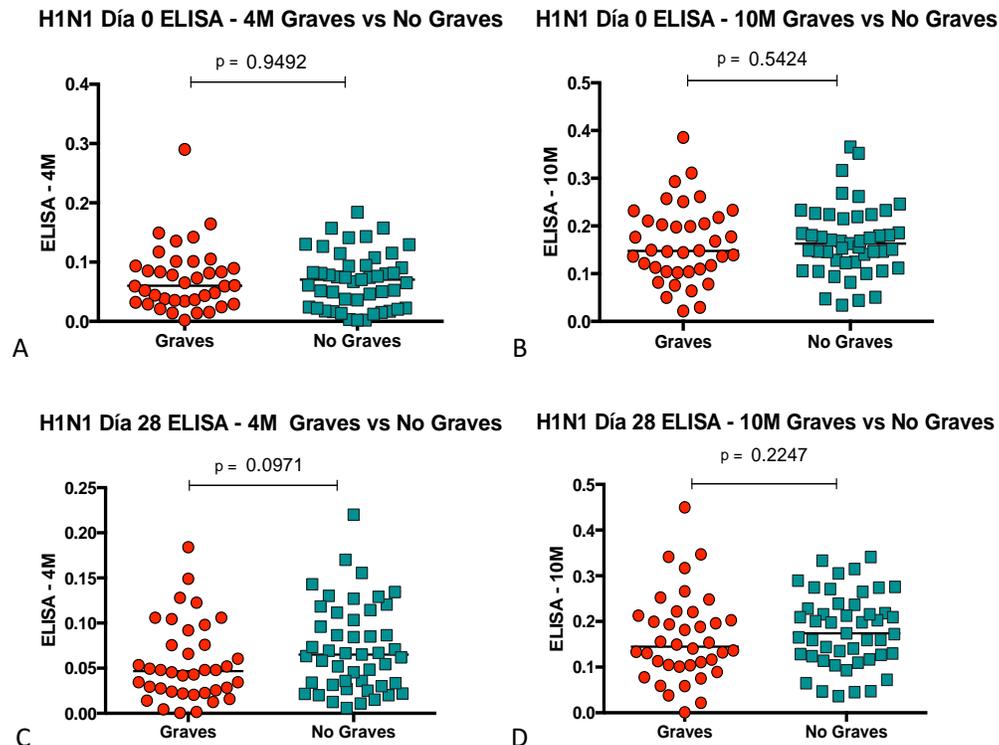


FIGURA 7. Diferencias, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A, B, C y D. Al Día 0, ELISA basal - ELISA con Urea 4 M y ELISA basal - ELISA con Urea 10 M, Graves vs No Graves. **A y B.** Al Día 28, ELISA basal - ELISA con Urea 4 M y ELISA basal - ELISA con Urea 10 M, Graves vs No Graves. **C y D.** M: Molar, ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

Resultados H3N2:

Medición de anticuerpos por ELISA en los pacientes Graves vs No Graves

En H3N2 en el ELISA basal:

En la gráfica de Todos los pacientes, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día de 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.9215 vs 1.151, $p < 0.0001$), FIGURA 8 A. En pacientes Graves, al comparar la densidad óptica de anticuerpos al Día 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.9418 vs 1.261, $p = 0.0007$), FIGURA 8 B. En pacientes No Graves, al comparar la densidad óptica de anticuerpos al Día de 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.9215 vs 1.113, $p < 0.0001$), FIGURA 8 C. Al Día 0, al comparar la densidad óptica de anticuerpos entre pacientes Graves y No Graves, la diferencia no fue estadísticamente significativa (0.9418 vs 0.9215, $p = 0.4417$), FIGURA 8 D. Al día 28, al comparar la densidad óptica

de anticuerpos entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia fue estadísticamente significativa (1.261 vs 1.113, $p = 0.0122$), FIGURA 8 E.

En la FIGURA 8 A observamos el incremento de las DO que representa el incremento en el número de anticuerpos después de 28 días de haberse expuesto al virus H3N2, como se esperaría en el seguimiento de cualquier proceso infeccioso. El resultado se mantiene aun analizando por separado a los pacientes Graves de los No graves en las FIGURAS 8 B y 8 C. En las FIGURAS 8 D y 8 E al comparar pacientes Graves vs No Graves, la diferencia no se observó al Día 0, fue al Día 28 en que se vuelve significativa, lo que demuestra la mayor producción de anticuerpos en pacientes Graves y esta diferencia se vuelve significativa después de que ha pasado 28 días, debido a que la respuesta humoral ya ha sido estimulada.

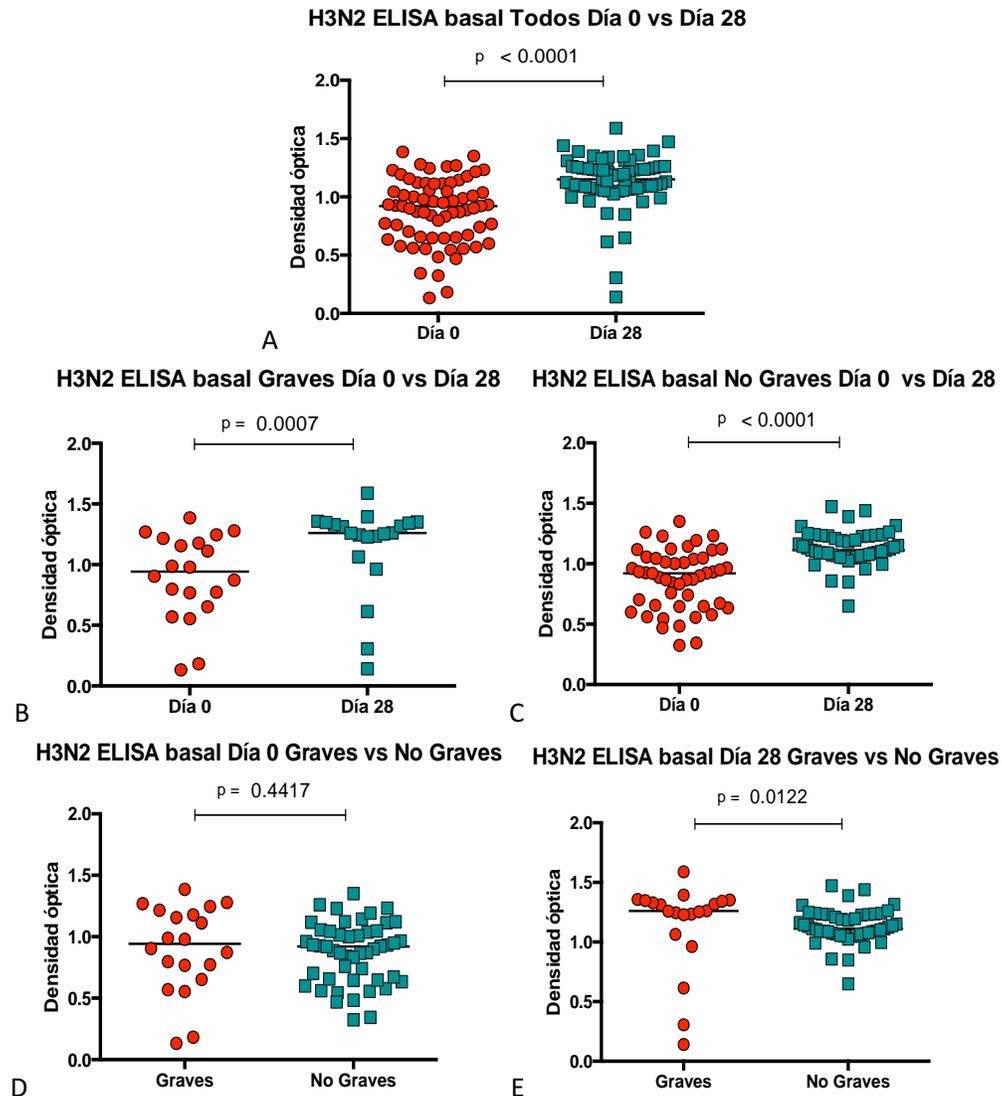


FIGURA 8. Diferencia entre las densidades ópticas. Día 0 círculo rojo y Día 28 cuadro verde, figura A, B y C. Pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figura D y E. Todos los pacientes, Día 0 vs Día 28. A. Pacientes Graves y No graves, día 0 vs día 28 respectivamente. B y C. Día 0 y Día 28, Graves vs No graves respectivamente. D y E. ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

Resultados de anticuerpos determinados por ELISA en pacientes Graves y No Graves expuestos a Urea.

En H3N2 ELISA con urea 4 Molar:

Al Día 0, al comparar la densidad óptica entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia no fue estadísticamente significativa (0.7993 vs 0.7890, $p = 0.3324$), FIGURA 9 A. Al día 28, al comparar la densidad óptica entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia fue estadísticamente significativa (1.216 vs 1.051, $p = 0.0122$), FIGURA 9 B.

En H3N2 ELISA con urea 10 Molar:

Al Día 0, al comparar la densidad óptica entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia no fue estadísticamente significativa (0.6098 vs 0.6250, $p = 0.4441$), FIGURA 9 C. Al Día 28, al comparar la densidad óptica entre pacientes Graves vs No Graves, la diferencia fue estadísticamente significativa (1.146 vs 0.9180, $p = 0.0098$), FIGURA 9 D.

En H3N2 Graves:

A una concentración de Urea 4M, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día de 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.7993 vs 1.216, $p = 0.0009$), FIGURA 9 E. A una concentración de Urea 10M, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.6098 vs 1.146, $p = 0.0006$), FIGURA 9 F.

En H3N2 No Graves:

A una concentración de Urea 4M, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día 0 vs día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.7890 vs 1.051, $p < 0.0001$), FIGURA 9 G. A una concentración de Urea 10M, al comparar la densidad óptica de anticuerpos del Día de 0 vs Día 28, la diferencia fue estadísticamente significativa (0.6250 vs 0.9180, $p < 0.0001$), FIGURA 9 H.

En las FIGURAS 9 A, 9 B, 9 C y 9 D observamos que en los pacientes Graves quedan más anticuerpos unidos a su antígeno después de intentar separarlos al exponerlos a Urea 4M y 10M, esto es significativo hasta que han pasado 28 días de seguimiento y no se observa al Día 0. Lo que analizamos en esta prueba es la fuerza de unión del antígeno con su anticuerpo, lo cual es una respuesta que implica calidad de cada uno de los enlaces antígeno anticuerpo y no un incremento en la producción de anticuerpos, el hecho de que veamos una medición de DO, implica que existen anticuerpos pegados a su antígeno los cuales generan luminiscencia, por ello las DO que comparamos representan la cantidad de anticuerpos que conservo su enlace después de ser expuestos al agente caotrópico, o sea la Urea.

En las FIGURAS 9 E, 9 F, 9 G y 9 H observamos que tanto en los pacientes Graves como No Graves la fuerza de unión se incrementa al día 28 y esto es evidente con ambas concentraciones de Urea, lo cual es una respuesta humoral esperada en el seguimiento de cualquier proceso infeccioso en un mismo grupo de pacientes.

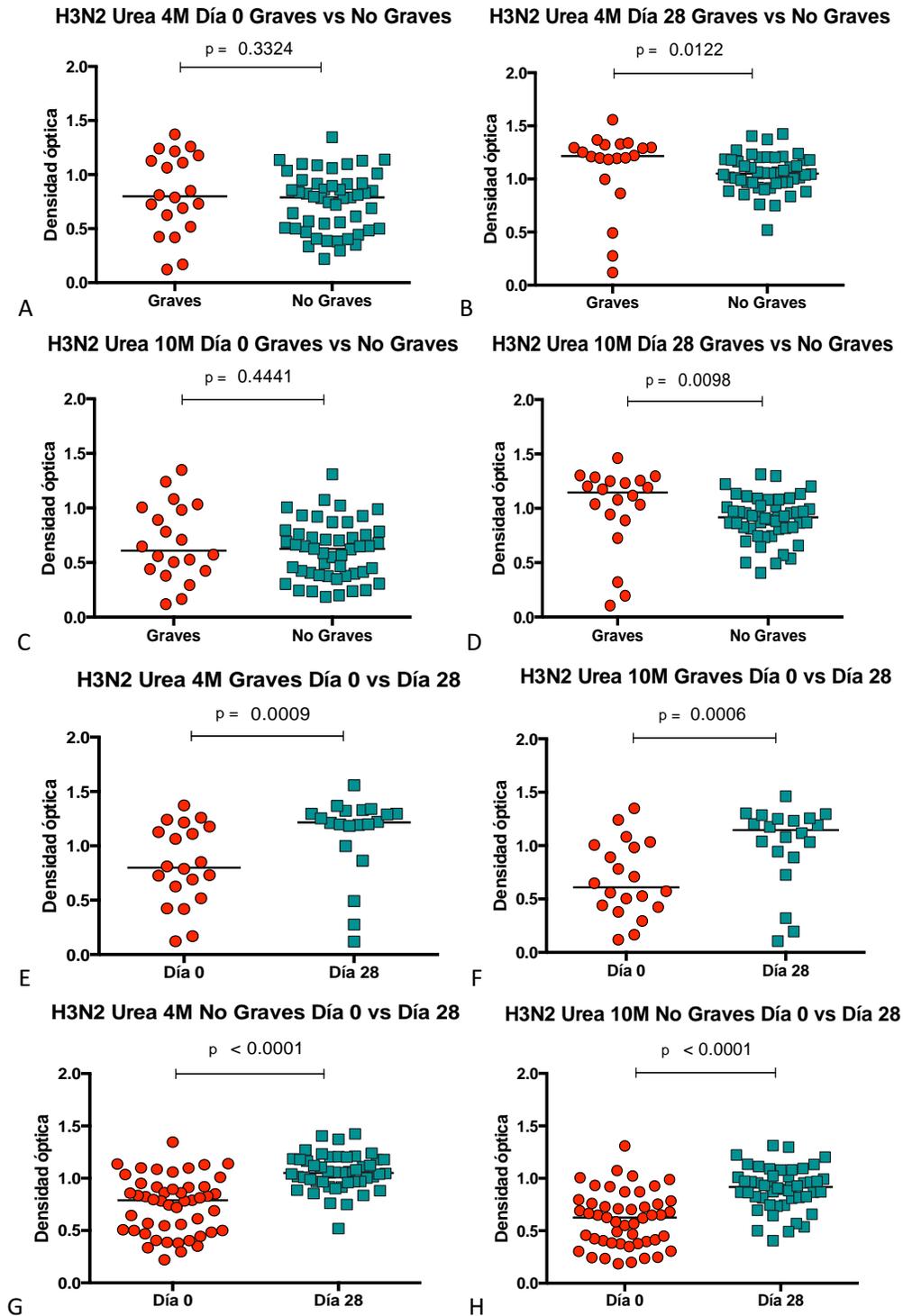


FIGURA 9. Diferencia entre las densidades ópticas, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A, B, C y D, Día 0 en círculo rojo y Día 28 en cuadro verde, figura E, F, G y H. Urea 4M Día 0 y Día 28, Graves vs No Graves, respectivamente. A y B. Urea 10M Día 0 y Día 28, Graves vs No Graves, respectivamente. C y D. Graves Urea 4M y 10M Día 0 vs Día 28, respectivamente E y F. No Graves Urea 4M y 10M, Día 0 vs Día 28, respectivamente G y H. M: Molar.

Porcentaje de avidéz al Día 0 y Día 28 en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (UREA/ELISA) X100.

En H3N2 al Día 0:

Al exponer los anticuerpos a concentraciones de Urea a 4M y 10M y comparar el % de avidéz de anticuerpos entre los pacientes Graves vs No Graves, las diferencias fueron estadísticamente significativas (92.66 vs 85.55, $p = 0.0045$ y 76.80 vs 70.28, $p = 0.0133$), FIGURA 10 A y 10 B.

En H3N2 al Día 28:

Al exponer los anticuerpos a una concentración de Urea a 4M y 10M y comparar el % de avidéz de anticuerpos entre los pacientes Graves vs No Graves, la diferencia solo fue estadísticamente significativa con las concentraciones más altas de Urea (97.03 vs 94.02, $p = 0.0703$ y 89.53 vs 81.31, $p = 0.0161$), FIGURA 10 C y 10 D.

En H3N2 pacientes Graves:

Al exponer los anticuerpos a una concentración de Urea 4M y 10M y comparar el % de avidéz de anticuerpos entre Día 0 vs Día 28, se encontraron tendencias (92.65 vs 97.02, $p = 0.0759$ y 76.79 vs 89.52, $p = 0.0583$), FIGURA 10 E y 10 F.

En H3N2 pacientes No Graves:

Al exponer los anticuerpos a una concentración de Urea 4M y 10M y comparar el % de avidéz de anticuerpos entre Día 0 vs Día 28, se encontraron diferencia estadísticamente significativa (85.55 vs 94.02, $p = 0.0001$ y 70.28 vs 81.31, $p = 0.0001$), FIGURA 10 G y 10 H.

En las FIGURAS 10 A, 10 B, 10 C y 10 D se observó un mayor porcentaje de avidéz en los pacientes Graves infectados por el virus H3N2. A una concentración de 4M al Día 0 la diferencia es significativa y al Día 28 se vuelve significativa a una concentración alta de Urea 10M en la FIGURA 10 D. Las diferencias significativas se observaron a concentración de Urea 10M, tanto al Día 0 como al Día 28. Se apoya la hipótesis de que los pacientes más graves tienen una mayor avidéz de anticuerpos, además de ser una diferencia vista desde el día de inclusión (Día 0), lo que nos habla de respuestas tempranas o pre existente del sistema inmunológico humoral.

Las FIGURAS 10 E, 10 F, 10 G y 10 H muestran la respuesta del sistema inmune posterior a la exposición del antígeno, tanto en pacientes Graves como No Graves. En lo pacientes Graves se observaron tendencias, la cual se acerca más a la significancia estadística en las concentraciones altas de urea 10M y en los pacientes No Graves la diferencia es significativa, FIGURAS 10 G y 10 H. Estos resultados son esperados por las modificaciones que ocurren en el sistema inmune humoral después de haber reconocido a un agente infeccioso.

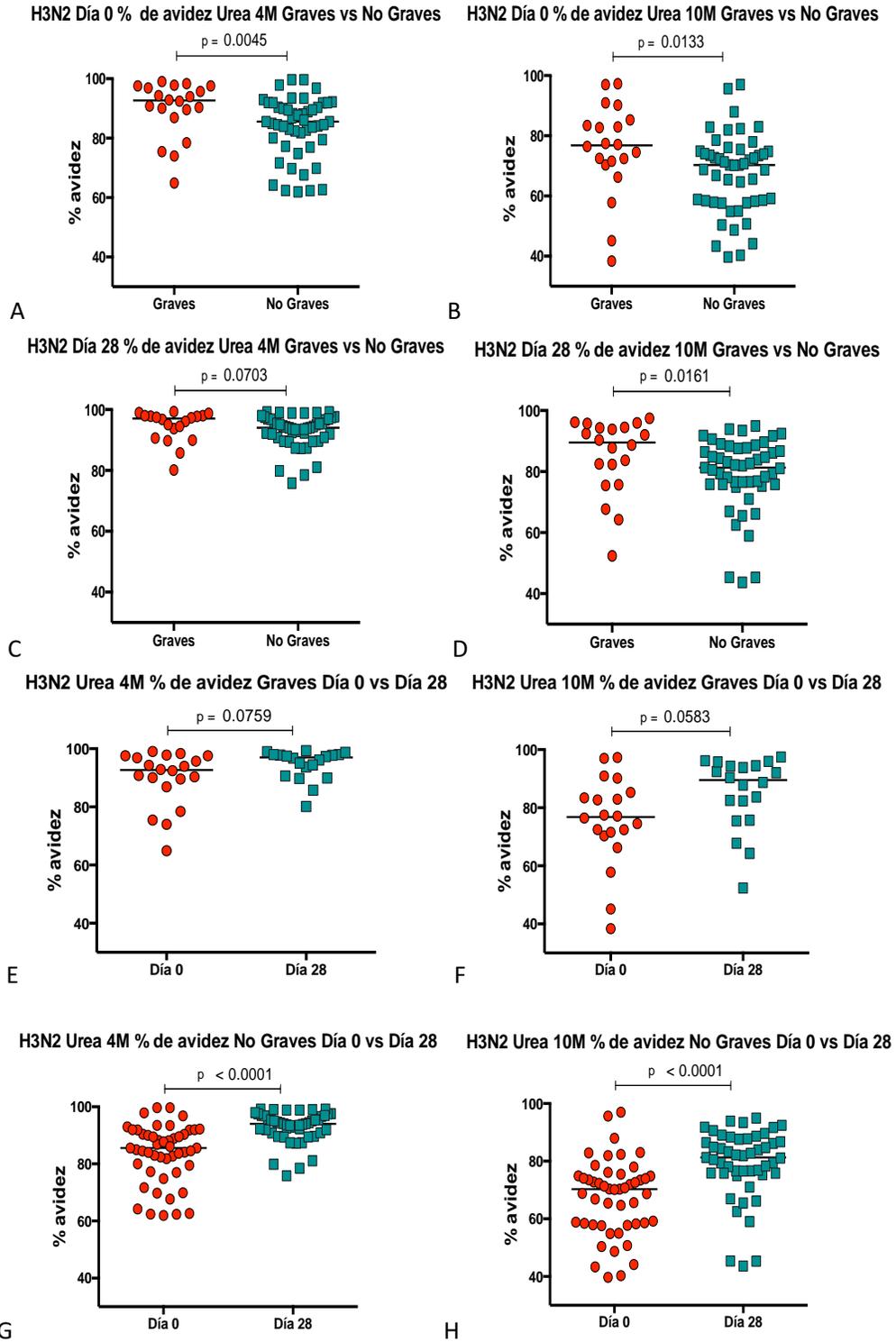


FIGURA 10. Diferencia entre los % de avidéz, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figura **A, B, C y D.** Día 0 círculo rojo y Día 28 en cuadro verde, figuras **E, F, G y H.** Día 0 Urea 4M y 10M, Graves vs No Graves, respectivamente **A y B.** Día 28 Urea 4M y 10M, Graves vs No Graves, respectivamente **C y D.** Graves Urea 4M y 10M, Día 0 vs Día 28 **E y F.** No Graves Urea 4M y 10M, Día 0 vs Día 28 **G y H.** **M: Molar.**

Delta en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (ELISA DÍA28-ELISA DÍA 0)

En H3N3:

En los Deltas no hay diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes Graves y No Graves, tanto en los resultados de ELISA basal, ni en los ELISA que se expusieron a una concentración de Urea a 4M o 10M (0.2778 vs 0.2235, $p = 0.6594$, 0.3365 vs 0.2945, $p = 0.9242$ y 0.2760 vs 0.2645, $p = 0.7075$, respectivamente), FIGURA 12 A, 12 B y 12 C. El incremento de avidéz después de 28 días es similar entre los grupos que están en condiciones idénticas (tipo de virus, tiempo de evolución y cada uno de las concentraciones de urea).

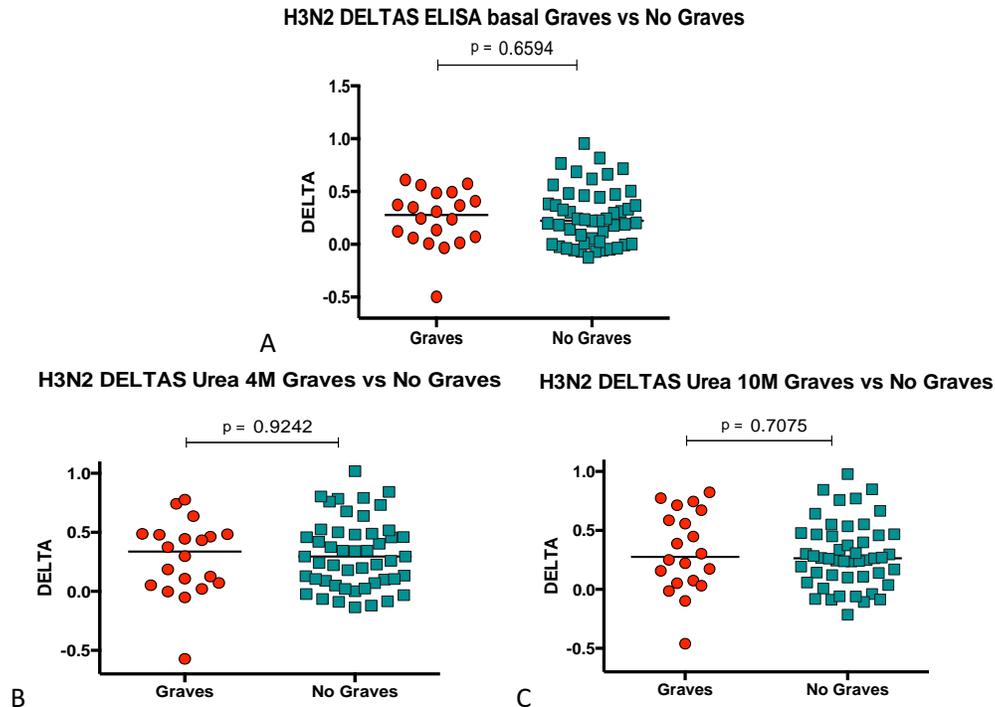


FIGURA 11. Delta, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A, C y B. ELISA basal, Elisa con Urea 4M y 10M, Graves vs No Graves, respectivamente A, B y C. M: Molar, DELTA: ELISA DÍA 28-ELISA DÍA 0, ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

Delta % en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (VALOR % DÍA 28 - VALOR % DÍA 0)

En H3N2:

El Delta del % de avidéz al exponer los anticuerpos a una concentración de Urea 4M y comparar el grupo de pacientes Graves vs No Graves, mostró una tendencia (2.545 vs 7.970 $p: 0.0882$). Al exponer los anticuerpos a una concentración de Urea 10M, no se encontró diferencia estadísticamente significativa (8.345 vs 10.57 $p: 0.4535$). FIGURA. 13 A y B. El cambio en el número de anticuerpos que se mantiene unido a su antígeno después de exponerlos un agente caotrópico, es similar entre pacientes Graves y No Graves después de 28 días.

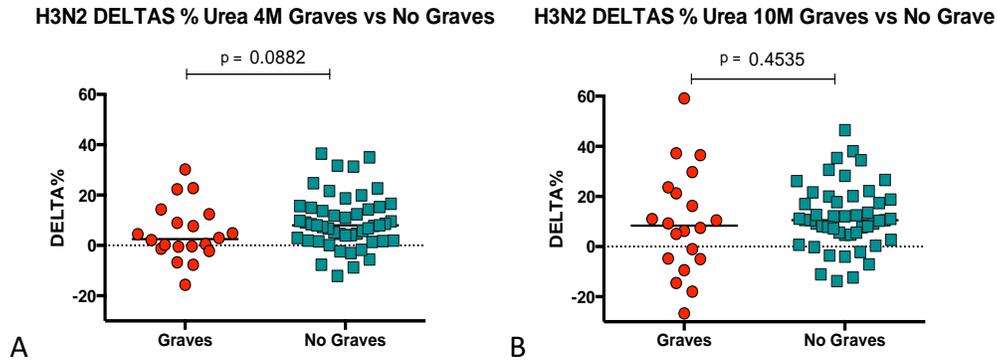


FIGURA 12. Delta %, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A y B. Urea 4 M y 10M, Graves vs No Graves. A y B. M: Molar, DELTA %: VALOR % DÍA 28-VALOR % DÍA 0.

Velocidad en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (ELISA DÍA 28-ELISA DÍA 0) /28

En H3N2:

En la velocidad no hay diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes Graves y No Graves, tanto en los resultados de ELISA basal, ni en los ELISA que se expusieron a una concentración de Urea a 4M o 10M (0.00995 vs 0.0080, $p = 0.6579$, 0.01205 vs 0.0105, $p = 0.9295$ y 0.00985 vs 0.0094, $p = 0.7158$, respectivamente). FIGURA 11 A, B y C. La velocidad, que es el incremento de la avidéz por día, no muestra diferencia significativa debido al valor fraccionado, ya que desde el cambio total de los 28 días no se observan resultados significativos.

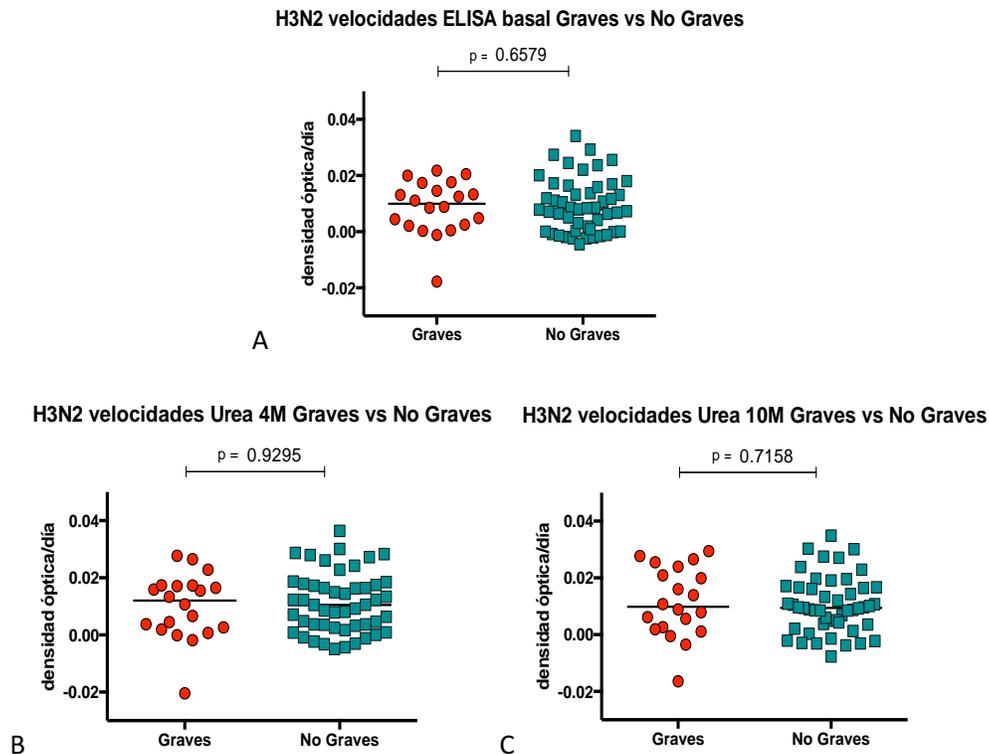


FIGURA 13. Velocidad, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras A, B y C. ELISA basal, Elisa con Urea 4M y 10M, Graves vs No Graves, respectivamente A, B y C. M: Molar, ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

Diferencias en pacientes Graves, No Graves y expuestos a Urea (ELISA basal - ELISA con UREA)

En H3N2:

Al Día 0, la diferencia del ELISA basa – ELISA expuesto a Urea 4M, comparando pacientes Graves vs No Graves, se encontró una diferencia estadísticamente significativa (0.0500 vs 0.1230, $p = 0.0028$). En ELISA basal – ELISA expuesto a Urea 10 M, comparando pacientes Graves vs No Graves, se encontró una tendencia (0.2115 vs 0.2550, $p = 0.0559$), **FIGURA. 14 A y B.**

Al Día 28, la diferencia del ELISA basa – ELISA expuesto a Urea 4M, comparando pacientes Graves vs No Graves, se encontró una diferencia estadísticamente significativa (0.03175 vs 0.0665, $p = 0.0122$). En ELISA basal – ELISA expuesto a Urea 10 M, comparando pacientes Graves vs No Graves, se encontró una diferencia estadísticamente significativa (0.1178 vs 0.2175, $p = 0.0009$). **FIGURA. 14 C y D.**

En la **FIGURA 14 A, 14 B, 14 C y 15 D** se observó cómo se desprenden más los anticuerpos del grupo de pacientes No Graves al exponernos a cualquier concentración de urea en cualquier momento del transcurso de la enfermedad, tanto al día de inclusión (Día 0) como al Día 28 de seguimiento, por lo tanto, los Graves tienen mayor avidéz.

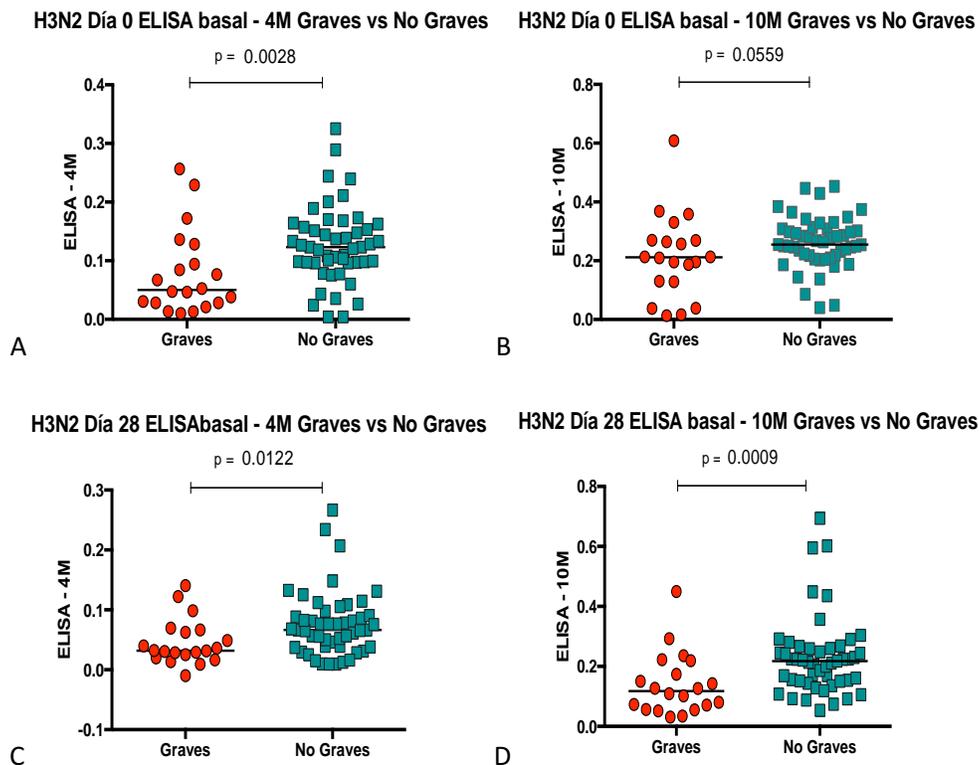


FIGURA 14. Diferencias, pacientes Graves en círculo rojo y pacientes No Graves en cuadro verde, figuras **A, B, C y D.** Al Día 0, ELISA basal - ELISA con Urea 4 M y ELISA basal – ELISA con Urea 10 M, Graves vs No Graves. **A y B.** Al Día 28, ELISA basal - ELISA con Urea 4 M y ELISA basal – ELISA con Urea 10 M, Graves vs No Graves. **C y D.** M: Molar, ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

DISCUSIÓN:

Este estudio mostró diferencias en la avidéz de anticuerpos de acuerdo con el estado de gravedad de los pacientes con influenza, además de diferentes resultados de acuerdo al virus de influenza que produjo la infección, ya sea H1N1 o H3N2.

Se encontró una mayor avidéz desde el Día 0 únicamente en H3N2, lo cual podría ser asociado a que es una cepa que ha estado en circulación por más tiempo, siendo más probable que la población haya estado expuesta previamente a este virus, incluso de forma repetida. En H1N1 no se observó este tipo de comportamiento probablemente porque fue a partir de finales del 2009 cuando la cepa pandémica sustituyó por completo a la estacional, pero si se observó un mayor porcentaje de avidéz en los pacientes Graves después de los 28 días de seguimiento, una vez que la respuesta inmune humoral ya ha realizado una reestructuración para responder al antígeno identificado. Con esto dejamos claro que los pacientes Graves presentan mayor avidéz de anticuerpos tanto en H1N1 como en H3N2, solo que se presentan en diferentes momentos de la infección y por lo tanto este aumento de la avidéz debe ser provocado por mecanismos distintos en cada uno de los virus.

La gravedad de la enfermedad podría estar asociada con el incremento de la avidéz en anticuerpos no neutralizantes mediante reacciones cruzadas, las cuales generan una respuesta inmune poco efectiva para eliminar el virus, pero muy extensa, con activación excesiva de la respuesta inflamatoria y provocando daño tisular. En cuanto a la información que existe sobre esta respuesta inflamatoria excesiva Ying Chi et al. describieron en el 2013 en una nueva cepa nombrada H7N9, la presencia de un patrón de hiperactivación proinflamatorio mediado por citocinas inductoras de Th1/Th17, como lo son IL-2, IL-6, IL-17 e IP-10, que generan eliminación de patógenos y regulan el sistema inmune, pero a la vez provocan destrucción del tejido mediante la acción de linfocitos T, con asociación entre los valores altos de estas citocinas y gravedad de la enfermedad (37). Este mismo patrón ya ha sido descrito en H5N1 asociado a una carga viral elevada (38) y en infección por H1N1 grave se ha visto incremento de estas citocinas en tejido extrapulmonar (39), cuya hiperrespuesta era sostenida en la primera exposición, es decir, durante la pandemia y cuando la infección se presentó de forma estacional la respuesta inflamatoria era más corta, estos resultados se obtuvieron al comparar influenza estacional del 2008 con el virus de influenza pandémica del 2009 (21). Tanto Th1 como Th17 intervienen en la eliminación de patógenos intracelulares.

Otros grupos han examinado la relación entre la avidéz y otras características demográficas. Algunos encontraron que la avidéz de los anticuerpos incrementa a mayor edad, al igual que se ha encontrado una avidéz de anticuerpos más alta en ancianos que en pacientes vacunados más jóvenes; como sea existen otras investigaciones en las que no se corroboró esta diferencia. Nosotros no realizamos análisis con la edad.

Las principales diferencias en nuestro estudio son: la evaluación de anticuerpos séricos que estaban presentes poco después del inicio de una infección, en el Día 0 o día de inclusión, que son diferentes a los anticuerpos que surgen en la fase de convalecencia (después de la infección o vacunación) al Día 28, el uso de HA recombinante pura sin otras proteínas virales (en otros estudios se utilizó una vacuna contra la gripe de virus fraccionados, que contiene HA y otras proteínas virales), lo cual aísla la avidéz de los anticuerpos dirigiéndolos contra la hemaglutinina y elimina las reacciones atribuidas a otras proteínas virales, cuyo reconocimiento si bien es importante *in vivo*, el hecho de que vengan contenidas en la presentación de la vacuna, hace que se mezclen con reactantes encargados de potencializar la respuesta inmune, conocidos como *boost*, generando resultados en los experimentos que no reflejan necesariamente una respuesta exclusiva a proteínas virales; y aun así, si nos enfocáramos únicamente en las proteínas que conforman la vacuna, lo que se detecta es la suma de una amplia gama de inmunoglobulinas G contra diferentes componentes virales, en lugar de una respuesta IgG específica, limitada a una proteína en particular, lo cual complica la interpretación, porque los anticuerpos pueden tener efectos sinérgicos contra una amplia cantidad de proteínas en lugar de sólo responder contra una proteína viral.

Aún se debe investigar si nuestro hallazgo de asociación de peores desenlaces con una alta avidéz es debido a una mayor presencia de anticuerpos no neutralizantes o neutralizantes, que podrían ser pre-existentes o el resultado de un anticuerpo heterotípico secundario, que responde en contra de un epítipo conservado; dicho de otra forma,

la respuesta temprana de IgG puede ocurrir pocos días después de la infección debido al *priming* inmune generado de la previa exposición a epítomos virales similares y compartidos con otras cepas, una vez que ocurre la infección con A (H1N1) pandémica, las células B de memoria proliferan rápidamente y generan una gran carga de estos anticuerpos, pudiendo ser en nuestros pacientes Graves no neutralizantes o neutralizantes de alta avidéz (19). Esto concuerda con la observación de un número elevado de células B periféricas en pacientes con enfermedad grave en el estadio temprano de la enfermedad (19,40).

Hablando únicamente de anticuerpos no neutralizantes se han encontrado efectos protectores, neutros o no protectores contra influenza, lo cual depende del sitio de unión al que vayan dirigidos y algunos de estos efectos se acoplan con la activación de la cascada del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (19) y la respuesta exagerada de citocinas inflamatorias que se ve en influenza pandémica debido a una respuesta exagerada y poco organizada, debido a la supresión de linfocitos moduladores (21), en cuyo caso lo único que se necesita es pasar por el periodo de maduración del sistema inmunológico para la producción de anticuerpos neutralizantes a través de los linfocitos B.

Si la alta avidéz en nuestros pacientes Graves resultara ser de anticuerpo neutralizantes, valdría la pena ver si al montarse la infección por influenza, la cinética de anticuerpos neutralizantes se comporta igual que con la maduración vista en los estudios de reforzamientos con vacunas (18), de ser así, lo que explicaría los desenlaces graves podría ser los títulos elevados, como se puede ver de forma indirecta en las **FIGURA 8 E** de H3N2, con el aumento significativo de las densidades ópticas en pacientes Graves, que se traduce como una alta producción de anticuerpo en este grupo, que terminaría provocando una respuesta exagerada e insostenible por el organismo huésped y si la carga viral es muy alta, se rebasa el punto de desajuste antigénico que puede ser tolerado antes de que los anticuerpos neutralizantes no sean más capaces de inhibir la infección (19,41).

De los principales sesgos en el estudio, uno es por la forma de incluir a los pacientes, que en su mayoría acudieron a atención médica, lo cual limita nuestra población a casos más graves (42). Dejando sin resolver si existen diferencias significativas de la avidéz al comparar nuestros resultados con subpoblaciones con enfermedades leves o asintomáticas, aunque lo que en realidad interesa en nuestro estudio es distinguir y describir a los pacientes graves y si se encuentran diferencias significativas con el grupo que se encuentra por debajo de él en cuanto a síntomas de gravedad, es de imaginarse que con los grupos de aun menor afección la diferencia sería aún más evidente. Otras variables que debieron incluirse en los análisis son la edad, el antecedente de vacunación, infección previa por H1N1 (información difícil de obtener) y el IMC por ser estos los principales factores de riesgo asociados a gravedad en la pandemia y los antecedentes que más se han estudiado para explicar el comportamiento de la respuesta humoral de acuerdo a factores de riesgo (43,4).

Nuestros resultados no pueden extrapolarse al comportamiento del sistema inmunológico durante pandemias, debido a que el estudio inició en el año 2010, un año después de que se dio el primer brote y no tenemos muestras de suero previas que aseguren que no exista antecedente de exposición. Se debe aclarar que a finales del 2009, el H1N1 pandémico había sustituido por completo a la cepa de H1N1 estacional, la información analizada corresponde a una respuesta de influenza estacional más que a un brote pandémico por un virus nuevo.

En todos los estudios de asociación de avidéz a peores desenlaces incluido el nuestro, no se puede saber si los anticuerpos medidos en los pacientes eran pre-existentes, debido a que no se tiene muestras previas a la infección.

En etapas posteriores se incluirán ensayos de microneutralización de anticuerpos e inhibición de la hemaglutinina para ver si el incremento en la avidéz de anticuerpos está dado por el predominio de anticuerpos no neutralizantes o neutralizantes y si los títulos de estos se encuentran incrementados.

CONCLUSIÓN:

Nuestros hallazgos sugieren un comportamiento distinto entre H1N1 y H3N2, en cuanto a la inmunidad humoral. Un porcentaje importante de pacientes en este estudio tienen al Día 0 inmunidad previa a H1N1 y H3N2, aunque después de 28 días sus títulos aumentan. La avidez de anticuerpos es un marcador predictor de la gravedad de la influenza desde el Día 0 para H3N2; pero no para H1N1, en el cual se encontró una mayor avidez en pacientes Graves hasta el Día 28.

Bibliografía:

1. Hay AJ, McCauley JW. The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS)—A future perspective. *Influenza Other Respi Viruses*. 2018;1–7.
 2. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56:152–79.
 3. Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic Threat Posed by Avian influenza A Viruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:129–49.
 4. Dawood FS, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N Engl J Med*. 2009; 360:2605-15.
 5. Bennett JB, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th Edition. 2017; 167: 2000-24.
 6. Ginsberg M. Swine influenza A (H1N1) Infection in Two Children--Southern California, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:400-2.
 7. Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, et al. Clinical Aspects of Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus Infection. *N Engl J Med*. 2009. 362: 1708–1719.
 8. Ison MG, Lee N. Influenza 2010-2011: Lessons from the 2009 pandemic. *Cleve Clin J Med*. 2010. 77: 812–820.
 9. Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, et al. Hospitalized Patients with 2009 H1N1 Influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med*. 2009. 361: 1935–1944.
 10. Louie JK, Acosta M, Winter K, Jean C, Gavali S, et al. Factors Associated With Death or Hospitalization Due to Pandemic 2009 Influenza A(H1N1) Infection in California. *JAMA*. 2009. 302: 1896–1902.
 11. Kluska V, Macku M, Mensik J. Demonstration of antibodies against swine influenza viruses in man. *Cesk Pediatr* 1961; 16:408-14.
 12. Smith TF, Burgert EO, Jr., Dowdle WR, Noble GR, Campbell RJ, Van Scoy RE. Isolation of Swine Influenza Virus from Autopsy Lung Tissue of Man. *N Engl J Med* 1976; 294:708-10.
 13. Huijskens EW, Reimerink J, Mulder PH, et al. Profiling of Humoral Response to Influenza A(H1N1)pdm09 Infection and Vaccination Measured by a Protein Microarray in Persons with and without History of Seasonal Vaccination. *PLoS ONE*. 2013. 8(1).
 14. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med*. 2009. 361: 1945–1952.
 15. Jefferies S, Earl D, Berry N, Blackmore T, Rooker S, et al. (2011) Effectiveness of the 2009 seasonal influenza vaccine against pandemic influenza A(H1N1)2009 in healthcare workers in New Zealand, June-August 2009. *Euro Surveill* 16. 2011.
 16. Kelly H, Grant K (2009) Interim analysis of pandemic influenza (H1N1) 2009 in Australia: surveillance trends, age of infection and effectiveness of seasonal vaccination. 2009. *Euro Surveill* 14 (31).
 17. Teng G, Papavasiliou FN. Immunoglobulin Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Genet* .2007. RA. 17:56.
 18. Eidem S, Tete SM, Jul-Larsen A, et al. Persistence and avidity maturation of antibodies to A (H1N1) pdm 09 in healthcare workers following repeated annual vaccination. *Vaccine*. 2015. 33; 4146-4154.
 19. To, K. K. W., Zhang, A. J. X., Hung, I. F. N., Xu, T., Ip, W. C. T., Wong, R. T. Y, et al. High Titer and Avidity of Nonneutralizing Antibodies against Influenza Vaccine Antigen Are Associated with Severe Influenza. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. 19(7), 1012–1018.
-

20. Monsalvo AC, Batalle JP, Lopez MF, Krause JC, Klemenc J, Hernandez JZ, et al. Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complex. *Nat Med*. 2011; 17 (2): 195-9.
 21. Lee N, Wong CK, Chan PK, Chan MW, Wong RK, Lun SM. Et al. Cytokine Response Patterns in Severe Pandemic 2009 H1N1 and Seasonal Influenza among Hospitalized Adults. *PLoS ONE*. 2011, 6(10), e26050.
 22. Lee N, Chan PK, Wong CK, Wong KT, Choi KW, et al. Viral clearance and inflammatory response patterns in adults hospitalized for pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus pneumonia. *Antivir Ther*. 2011.16: 237–247.
 23. To KK, Hung IF, Li IW, Lee KL, Koo CK, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis*. 2010. 50: 850–859.
 24. Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2009. 13: R201.
 25. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2010. 14: R167.
 26. Sato M, Hosoya M, Wright PF. Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. *Cytokine*. 2009. 47: 65–68.
 27. Svitek N, Rudd PA, Obojes K, Pillet S, von Messling V. Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology*. 2008. 376: 53–59.
 28. Lee N, Wong CK, Chan PK, Lun SW, Lui G, et al. Hypercytokinemia and hyperactivation of phospho-p38 mitogen-activated protein kinase in severe human influenza A virus infection. *Clin Infect Dis*. 2007. 45: 723–731.
 29. Arankalle VA, Lole KS, Arya RP, Tripathy AS, Ramdasi AY, et al. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients. *PLoS One*. 2010. 5(10). pii: e13099.
 30. Agrati C, Gioia C, Lalle E, Cimini E, Castilletti C, et al. Association of profoundly impaired immune competence in H1N1v-infected patients with a severe or fatal clinical course. *J Infect Dis*. 2010. 202: 681–689.
 31. Jiang TJ, Zhang JY, Li WG, Xie YX, Zhang XW, et al. Preferential loss of Th17 cells is associated with CD4 T cell activation in patients with 2009 pandemic H1N1 swine-origin influenza A infection. *Clin Immunol*. 2010. 137: 303–310.
 32. To KK, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin. Infect. Dis*. 2010. 50:850 – 859
 33. Webb SA, et al. Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. *N. Engl. J. Med*. 2009. 361:1925–1934
 34. Ehrhardt C, et al. Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect*. 2010. 12:81– 87.
 35. Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immun*. 2010. 16:151–159.
 36. Waffarn EE, Baumgarth N. Protective B cell responses to flu—no fluke! *J. Immunol*. 2011 .186:3823–3829.
 37. Chi Y, Zhu Y, Wen T, Cui L. Et al. Cytokine and chemokine levels in patients infected with the novel avian influenza A (H7N9) virus in China. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013, 208(12), 1962–1967.
 38. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*. 2006; 12:1203-7
 39. Short KR, Veeris R, Leijten LM, van de Brand JM. et al. Pro-inflammatory cytokine responses in extra-respiratory tissues during severe influenza. *Journal of Infectious Diseases*. 2017. 216(7), 829–833.
 40. Guo X, et al. Dynamic variations in the peripheral blood lymphocyte subgroups of patients with 2009 pandemic H1N1 swine-origin influenza A virus infection. *Virol. J*. 2011. 8:215.
 41. Casadevall A, Pirofski LA. A new synthesis for antibody-mediated immunity. *Nat. Immunol*. 2011. 13:21–28.
 42. Galindo FA, Ortiz HA, Ramírez VA., Vázquez RV, et al. Clinical characteristics and outcomes of influenza and other influenza-like illnesses in Mexico City. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2013. 17(7).
 43. Milner JJ, Beck AM. Micronutrients, immunology and inflammation The impact of obesity on the immune response to infection. *Proceedings of the Nutrition Society*,2012. 71(2), 298–306.
-