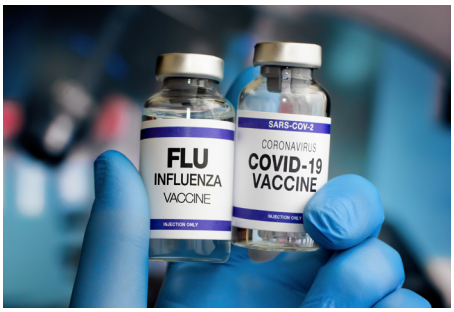
LA VACCINAZIONE ANTINFLUENZALE POTENZIA LA RISPOSTA AL VACCINO ANTI-SARS-CoV-2 IN INDIVIDUI SANI



Daniela Di Placido[1], Antonella Riccomi[1], Claudia Maria Trombetta[2], Maria Dorrucci[1], Nunzia Sanarico[3], Francesca Farchi[1], Roberto Giuseppetti[1], Umbertina Villano[1], Cinzia Marcantonio[1], Serena Marchi[2], Antonio Ciaramella[4], Patrizio Pezzotti[1], Emanuele Montomoli[2], Catia Valdarchi[1], Anna Rita Ciccaglione[1] e Silvia Vendetti[1]

[1]Dipartimento Malattie Infettive, ISS
[2]Dipartimento di Medicina Molecolare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Siena
[3]Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, ISS
[4]Servizio Tecnico Scientifico Coordinamento e Promozione della Ricerca, ISS

RIASSUNTO - Diversi studi suggeriscono che la vaccinazione antinfluenzale possa offrire protezione contro il COVID-19, sebbene i meccanismi alla base di questa associazione non siano del tutto chiari. Questo studio ha valutato l'effetto del vaccino antinfluenzale 2021-2022 sulla risposta al richiamo anti-SARS-CoV-2. Le analisi sul sangue pre e post-vaccinazione hanno evidenziato una risposta potenziata al vaccino anti-COVID-19 nei soggetti vaccinati contro l'influenza. I titoli anticorpali anti-proteina spike sono rimasti elevati fino a 12 settimane. I partecipanti sono stati classificati come "high" o *low responder* in base alla risposta al vaccino antinfluenzale; gli *high responder* hanno mantenuto una risposta robusta al vaccino COVID-19 anche a 4 e 12 settimane, mentre i *low responder* sono stati meno reattivi. Questi dati indicano che sia fattori esterni come la vaccinazione antinfluenzale, sia la capacità intrinseca di ogni individuo di rispondere agli stimoli giocano un ruolo nella capacità di rispondere alle vaccinazioni.
Parole chiave: vaccinazione antinfluenzale; SARS-CoV-2; risposta immunitaria

SUMMARY (*Influenza vaccination improves response to SARS-CoV-2 vaccine in healthy individuals*) - Several studies suggest that influenza vaccination may offer protection against COVID-19, although the mechanisms behind this association are not entirely clear. This study evaluated the effect of the 2021/2022 seasonal influenza vaccine on the response to the anti-SARS-CoV-2 booster dose. Analyses of blood samples collected before and after vaccination showed an enhanced response to the COVID-19 vaccine in individuals who received the flu shot. Anti-spike protein antibody levels remained elevated for up to 12 weeks. Participants were classified as "high" or "low responders" based on their response to the influenza vaccine; high responders maintained a strong response to the COVID-19 vaccine after 4 and 12 weeks, while low responders were less reactive. These data indicate that both external factors, such as influenza vaccination, and each individual's intrinsic capacity to respond to stimuli play a role in vaccine responsiveness.
Key words: flu vaccination; SARS-CoV-2; immune response
silvia.vendetti@iss.it

I vaccini sono considerati uno dei trattamenti medici più efficaci nella storia della medicina, in quanto svolgono un ruolo fondamentale nel prevenire le infezioni e le malattie (1). Tuttavia, la loro efficacia può variare molto da individuo a individuo, pertanto è importante capire meglio i meccanismi che regolano le risposte immunitarie alle vaccinazioni, al fine di prevedere chi risponderà meglio e integrare queste conoscenze nello sviluppo e nella produzione dei vaccini. Recenti studi hanno dimostrato che alcuni vaccini come quello anti-tubercolosi (Bacillo di Calmette-Guérin, BCG), il vaccino anti morbillo o quello anti-poliomelite esercitano un effetto protettivo in modo non specifico contro diverse malattie non correlate (2-4), suggerendo che l'impatto delle vaccinazioni esistenti potrebbe essere molto più ampio e proteggere contro una varietà di patogeni.

In linea con questo concetto, studi recenti hanno evidenziato che la vaccinazione contro l'influenza ha un impatto sull'incidenza e la gravità della malattia causata dall'infezione con SARS-CoV-2 (5-7). Tali studi dimostrano che c'è un'associazione inversa tra la vac- ▶

cinazione contro l'influenza e il rischio di contrarre la malattia COVID-19 e focalizzano l'analisi sull'associazione con gli esiti clinici della malattia come la mortalità, l'ospedalizzazione e il ricovero in terapia intensiva per coloro che sono infettati dal virus SARS-CoV-2 (8).

Anche se la vaccinazione antinfluenzale è la misura più efficace per prevenire l'influenza e le sue complicanze, la copertura vaccinale è relativamente bassa, soprattutto tra le persone più fragili. In generale, la risposta al vaccino antinfluenzale varia notevolmente all'interno delle popolazioni e alcuni soggetti non sono protetti anche quando ricevono il vaccino che si allinea con i ceppi virali prevalenti in quella stagione (9).

L'aumento dei titoli anticorpali contro gli antigeni influenzali dopo la vaccinazione e il raggiungimento di un titolo anticorpale pari a 40 è considerato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità il livello soglia oltre il quale c'è una riduzione maggiore o uguale al 50% della probabilità di contrarre l'influenza. La capacità di risposta varia da persona a persona e dipende da diversi fattori come l'età, il sesso, la presenza di anticorpi preesistenti e la storia vaccinale individuale (10). Tuttavia, le principali cause di variabilità tra individui sono ancora da identificare. Prevedere chi ha la capacità di rispondere o meno ai vaccini e capire i meccanismi alla base delle risposte potrebbe aiutare a migliorare le strategie vaccinali esistenti e di nuova generazione.

In questo studio, è stata esaminata l'associazione tra la vaccinazione contro l'influenza e la risposta immunitaria alla dose di richiamo del vaccino contro il SARS-CoV-2 in un gruppo di individui sani ed è stato osservato che la capacità di rispondere alla vaccinazione antinfluenzale ha un impatto positivo sulla capacità di rispondere alla vaccinazione anti SARS-CoV-2.

Lo studio

Descrizione della coorte e campionamento

Una coorte di individui sani (n. 113) è stata reclutata tra ottobre 2021 e gennaio 2022. Le persone partecipanti allo studio senza malattie significative sono state considerate per l'analisi (n. 74) (Tabella). In particolare, sono stati esclusi dallo studio gli individui che hanno contratto l'infezione con SARS-CoV-2, con diagnosi di cancro,

Tabella - Caratteristiche socio-demografiche della coorte

	Due vaccini		Un vaccino		Totale	
Caratteristiche	n.	%	n.	%	n.	%
Genere						
Maschio	18	33	6	30	24	32
Femmina	36	67	14	70	50	68
Età						
Mediana	57		51		54	
IQR; intervallo	(49-60); (35-70)		(49-56); (31-72)		(49-60); (31-72)	
Istruzione						
Alta	41	76	12	60	53	72
Media o bassa	13	24	8	40	21	28
Fragilità						
In ottima salute	8	15	7	35	15	20
In buona salute	39	72	12	60	51	69
In salute	7	13	1	5	8	11
Indice di massa corporea						
Sottopeso	1	2	0	0	1	1
Normopeso	30	55	12	60	42	57
Sovrappeso	20	37	6	30	26	35
Obesità	3	6	2	10	5	7
Fumo						
Sì	7	13	5	25	12	16
No	47	87	15	75	62	84
Patologie						
Sì	23	43	11	55	34	46
No	31	57	9	45	40	54
Totale	**54**	**73**	**20**	**27**	**74**	**100**

disturbi immunologici, sottoposte a terapia immunosoppressiva, a trapianto o a vaccinazioni negli ultimi 6 mesi, affette da malattie croniche o infezioni virali o batteriche e donne in gravidanza. Tutti gli individui hanno ricevuto la dose di richiamo del vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2 e cinquantaquattro di loro hanno ricevuto il vaccino antinfluenzale quadrivalente inattivato (QIV) Flucelvax (Seqirus) prima della vaccinazione anti-COVID-19. Il vaccino influenzale raccomandato conteneva le proteine neuraminidasi ed emagglutinina dei seguenti ceppi virali: A/Wisconsin/588/2019, A/Cambodia/e0826360/2020, B/Phuket/3073/2013 e B/Washington/02/2019. Il numero di individui di sesso femminile era più elevato di quello di sesso maschile (68% *vs* 32%), tuttavia circa le stesse proporzioni sono state mantenute negli individui che hanno ricevuto due vaccini (67% *vs* 33%) o un vaccino (70% *vs* 30%). Le persone coinvolte sono state sottoposte a prelievo ematico prima e dopo 28 giorni dalla vaccinazione antinfluenzale e prima (T0) e dopo uno (T1) e tre (T3) mesi dopo aver ricevuto la dose di richiamo del vaccino anti-SARS-CoV-2. Dopo ogni vaccinazione, sono state rilevate le risposte immunitarie umorali contro gli antigeni influenzali inclusi nel vaccino e contro le proteine spike (S) e nucleoproteina (Np) del virus SARS-CoV-2.

Risultati

Benefici della vaccinazione antinfluenzale sulla risposta al vaccino anti-SARS-CoV-2

Gli individui che hanno ricevuto il vaccino antinfluenzale prima della vaccinazione anti-COVID-19 mostrano una risposta migliore al vaccino anti-SARS-CoV-2 dopo 4 settimane (T1), tale risposta si mantiene fino a 12 settimane (T3) rispetto a chi ha ricevuto solo il vaccino anti-SARS-CoV-2 (titolo anti-S medio al T1: 28.871 ± 1.885 *vs* 20.823 ± 1.804, p = 0,04 e titolo anti-S medio al T3: 15.421 ± 1.670 *vs* 9.745 ± 1.212, p = 0,04) (Figura 1). Gli anticorpi specifici anti-S sono stati misurati attraverso un ▶

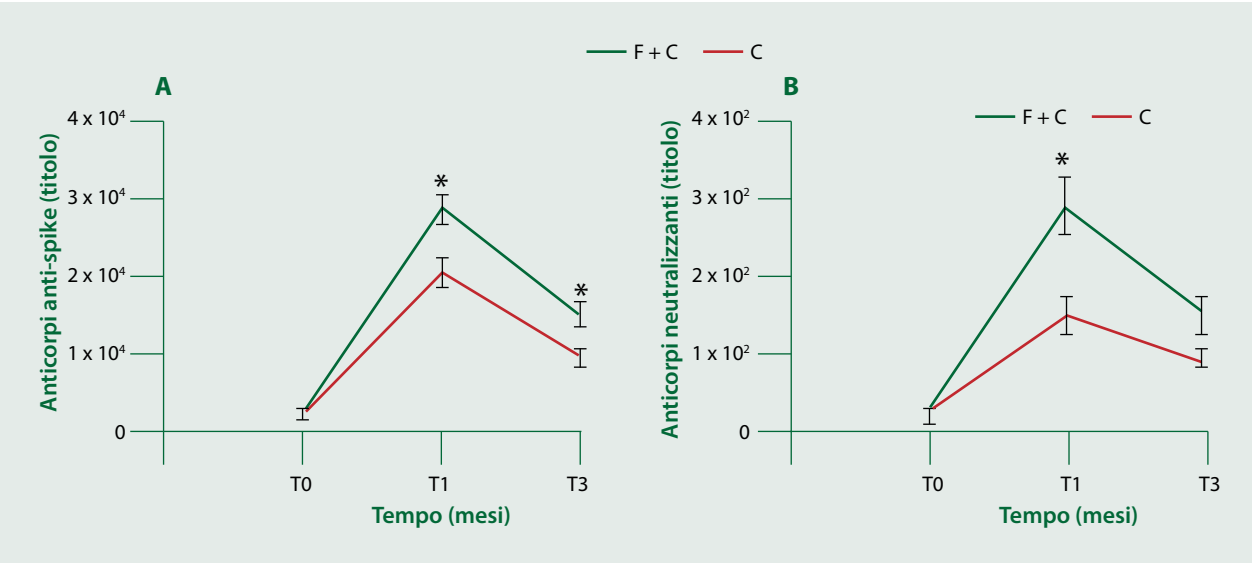
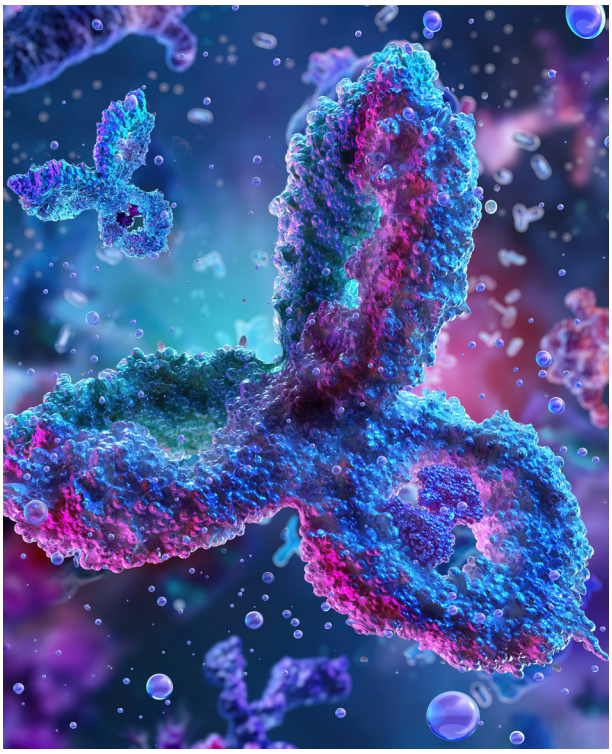


Figura 1 - Effetto della vaccinazione antinfluenzale sulla risposta al richiamo del vaccino anti-SARS-CoV-2. Titoli degli anticorpi anti-spike (**A**) e titoli degli anticorpi neutralizzanti (**B**) in individui che hanno ricevuto il vaccino anti-influenzale e il vaccino anti-SARS-CoV-2 (F+C) e in coloro che hanno ricevuto solo il vaccino anti-SARS-CoV-2 (**C**). Prima (T0), dopo un mese (T1) e dopo 3 mesi (T3) dalla vaccinazione anti-SARS-CoV-2. L'asterisco indica che le differenze sono significative: p <0,05



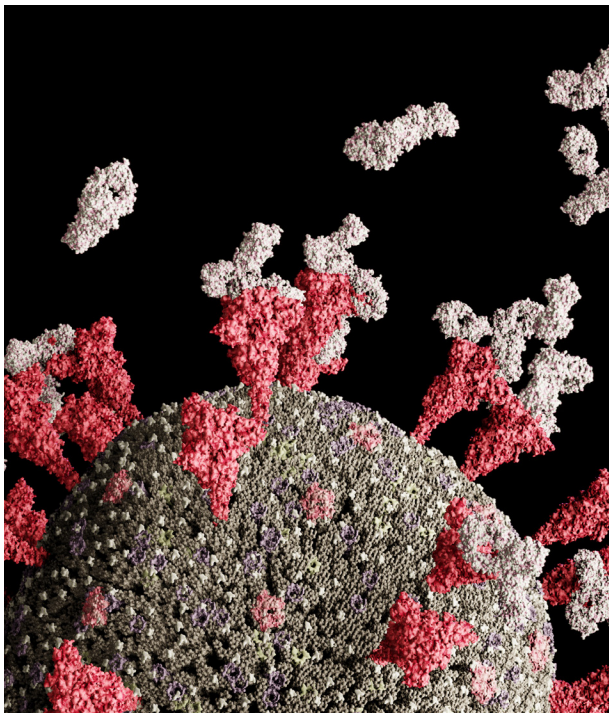
saggio immunometrico (Figura 1A). Inoltre, per analizzare la funzione degli anticorpi specifici per il virus, è stato effettuato un saggio di neutralizzazione *in vitro*, usando il virus SARS-CoV-2, ed è stato osservato un titolo più elevato di anticorpi anti-SARS-CoV-2 in grado di neutralizzare l'infezione virale in individui che hanno ricevuto due vaccini rispetto a chi ha ricevuto solo la vaccinazione anti-COVID-19 (titolo medio degli anticorpi neutralizzanti: 301 ± 37 *vs* 158 ± 23, p = 0,04) (Figura 1B). Per verificare che non ci fosse stata una infezione asintomatica con SARS-CoV-2, è stato valutato il titolo degli anticorpi anti-Np ad ogni prelievo effettuato. Gli individui infettati con SARS-CoV-2 con un titolo anti-Np maggiore di 1,4 in accordo con il saggio utilizzato, sono stati esclusi dall'analisi.

Inoltre, attraverso l'applicazione di un test non parametrico (Mann-Whitney) non sono state osservate differenze significative tra maschi e femmine nei doppi vaccinati verso gli antigeni influenzali (p = 0,154) e verso la proteina S (p = 0,688) e neanche nei singoli vaccinati verso la proteina S (p = 0,677). Questo potrebbe essere legato a diversi fattori come la numerosità del campione, l'età, la presenza di anticorpi preesistenti e la storia vaccinale individuale di ciascun individuo.

Risposte immunitarie al vaccino antinfluenzale della stagione 2021-2022

Per valutare la risposta alla vaccinazione antinfluenzale, sono stati valutati gli anticorpi prima della vaccinazione (D0) e dopo 28 giorni (D28) attraverso il saggio dell'inibizione della emoagglutinazione (HI) e attraverso il saggio di microneutralizzazione (MN) *in vitro*, verso i 4 antigeni presenti nel vaccino. È stato osservato un aumento significativo degli anticorpi contro tutti e quattro i ceppi contenuti nel vaccino dopo 28 giorni (Figura 2A). Molti partecipanti erano già protetti prima della vaccinazione, anche se la protezione era diversa per i diversi ceppi influenzali. Tutto ciò potrebbe essere dovuto a esposizioni precedenti ai virus o a vaccinazioni passate. In generale, è stato osservato un aumento della protezione dopo la vaccinazione. I test di MN hanno confermato che gli anticorpi prodotti in risposta alla vaccinazione sono efficaci nel neutralizzare il virus influenzale (dati non mostrati).

A causa dell'elevata variabilità delle risposte al vaccino antinfluenzale tra gli individui, i soggetti che hanno ricevuto entrambi i vaccini sono stati stratificati sulla base della loro capacità di rispondere alla vaccinazione antinfluenzale, considerando



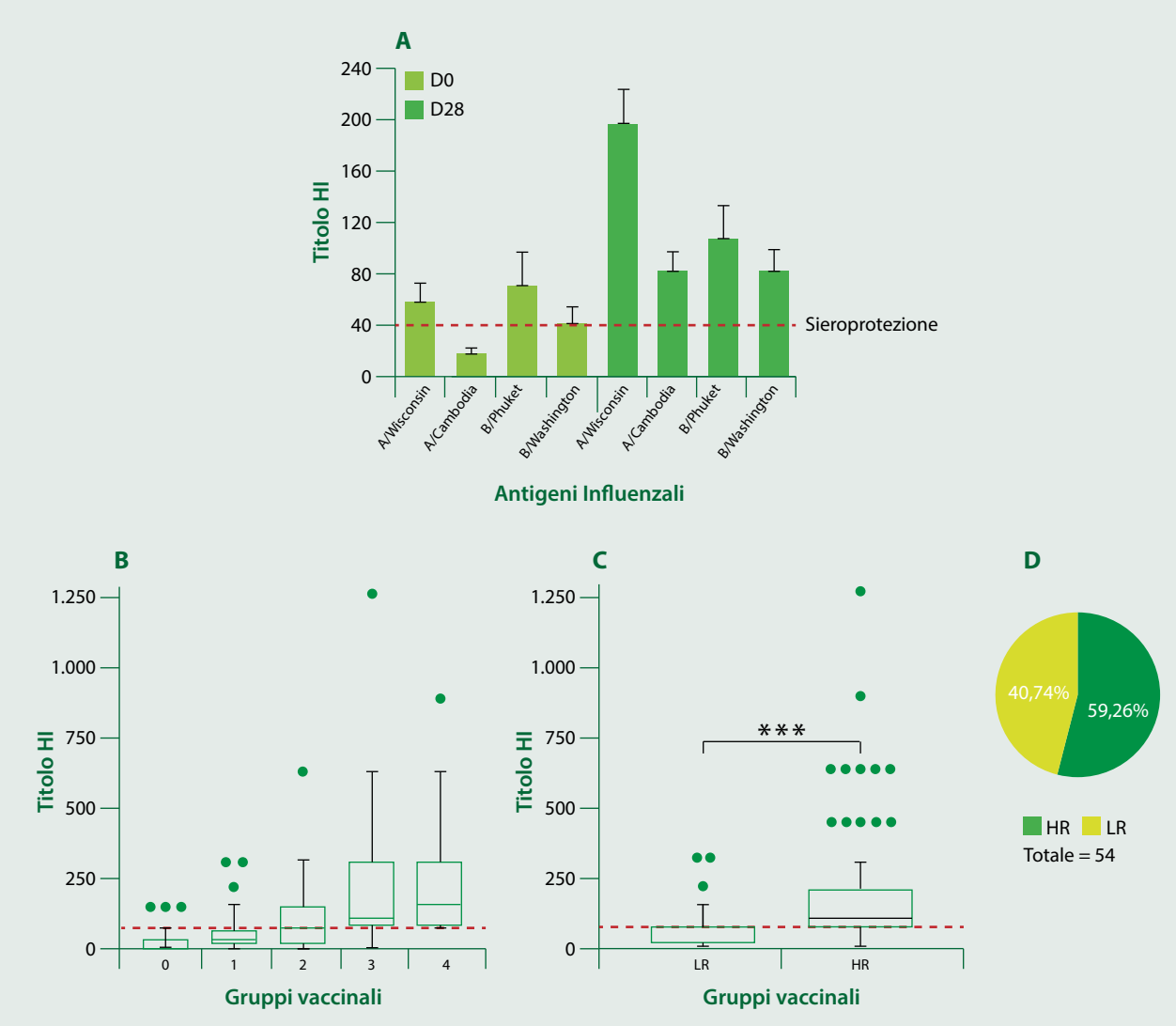
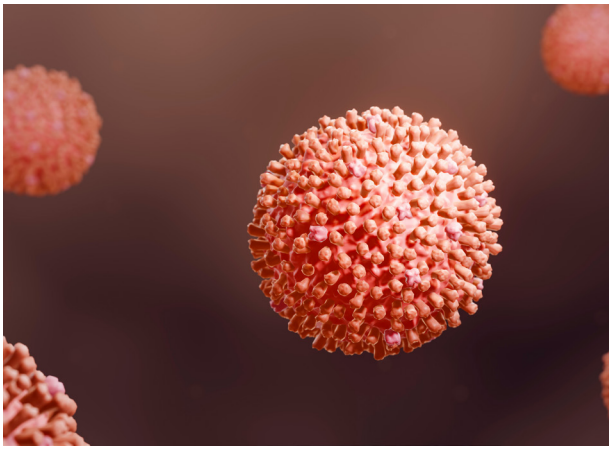
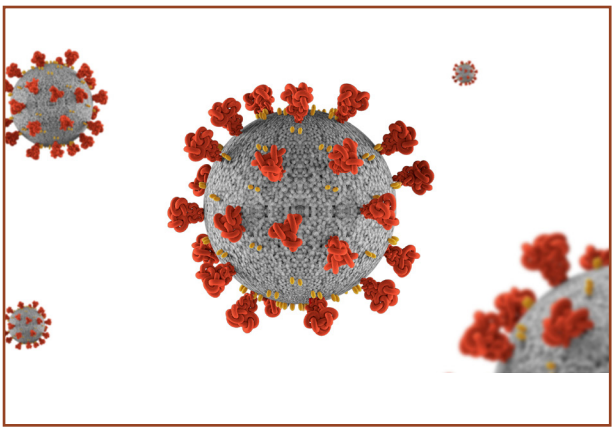


Figura 2 - Risposte alla vaccinazione antinfluenzale. (**A**) Media dei titoli HI pre (D0) e post (D28) vaccinazione; (**B, C**) stratificazione delle persone in *high responder* (HR) e *low responder* (LR); (**D**) rappresentazione delle frequenze di HR e LR nel gruppo di persone che ha ricevuto la vaccinazione antinfluenzale. L'asterisco indica che le differenze sono significative: $p < 0{,}001$



come riferimento la mediana del titolo HI di ciascun antigene specifico dopo 28 giorni dalla vaccinazione. La popolazione è stata suddivisa in cinque gruppi: individui senza nessun titolo HI specifico sopra la mediana post-vaccinazione (D28) (n. 12), individui con uno (n. 13), due (n. 9), tre (n. 16) e quattro (n. 4) titoli HI specifici sopra la mediana 28 giorni dopo la vaccinazione. Gli individui appartenenti ai gruppi 0 o 1 sono stati classificati come *low responder* (LR), mentre quelli appartenenti ai gruppi 2, 3 o 4 sono stati classificati come *high responder* (HR) (Figura 2). Le differenze tra questi gruppi sono risultate statisticamente significative. ▶



Analisi della risposta anti-SARS-CoV-2 negli individui classificati come HR ed LR

Successivamente, sono state analizzate le risposte al vaccino anti-SARS-CoV-2 confrontando i titoli degli anticorpi anti-S degli HR e degli LR con le risposte degli individui che hanno ricevuto soltanto il vaccino anti SARS-CoV-2. Sono state osservate differenze altamente significative tra gli HR e coloro che hanno ricevuto un solo vaccino (titolo anti-S medio: 31.083 ± 2.372 (HRs) *vs* 20.823 ± 1.804 (No-flu-vax), p = 0,008) al T1, mentre non sono state osservate differenze tra le risposte degli LR e coloro che hanno ricevuto solo il vaccino anti-COVID-19. Queste differenze sono state osservate anche dopo tre mesi (titolo anti-S medio: 16.600 ± 2.050 (HRs) *vs* 9.745 ± 1.212 (No-Flu-vax), p = 0.024) (Figura 3A). Tali risultati sono stati confermati anche attraverso i test di neutralizzazione virale (Figura 3B). Questi risultati indicano che sia fattori estrinseci, come il vaccino antinfluenzale, sia fattori intrinseci legati alla capacità di rispondere agli stimoli sono importanti per generare una risposta efficace alle vaccinazioni.

Conclusioni

In questo studio è stato osservato che la vaccinazione antinfluenzale migliora le risposte al vaccino anti-SARS-CoV-2 in una coorte di individui sani. Inoltre, la capacità intrinseca di rispondere alla vaccinazione antinfluenzale correla con la capacità di sviluppare una forte risposta anticorpale al vaccino anti-SARS-CoV-2. Inoltre, gli anticorpi anti-spike sono funzionali e proteggono dall'infezione. Questi risultati sono in accordo con altre osservazioni che suggeriscono un legame tra la vaccinazione antinfluenzale e una riduzione dell'incidenza e della gravità del COVID-19. Evidenze immunologiche suggeriscono che la vaccinazione con il vaccino antinfluenzale è in grado di indurre una riprogrammazione delle cellule dell'immunità innata che acquisiscono la capacità di rispondere meglio a ulteriori stimoli e conferiscono protezione anche verso patogeni non correlati allo stimolo (3). Questo fenomeno è chiamato *trained immunity* e sarà oggetto di ulteriori studi

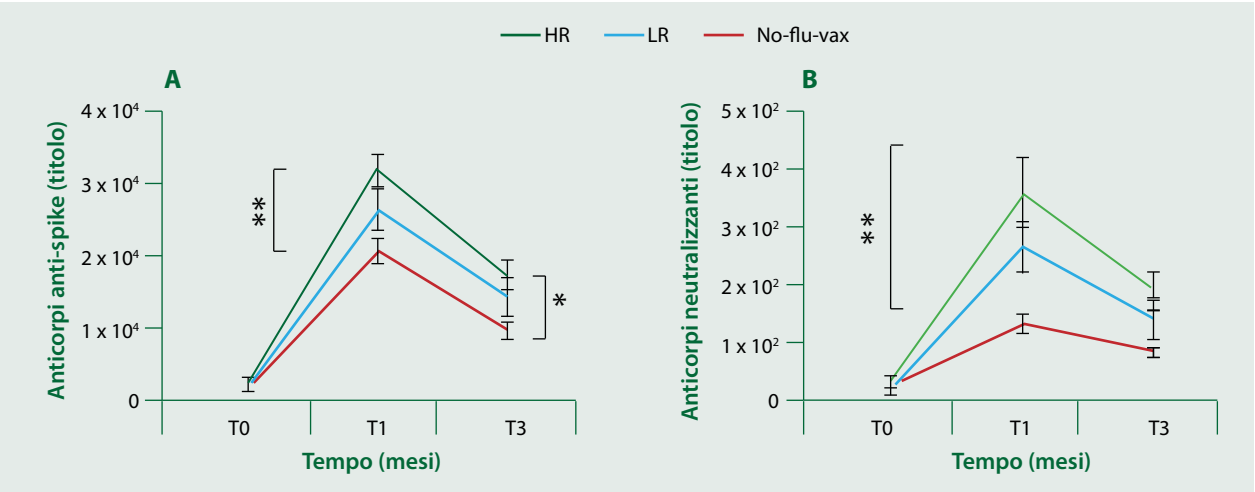


Figura 3 - Effetto della vaccinazione antinfluenzale sulla risposta al richiamo del vaccino anti-SARS-CoV-2 negli *high responder* (HR) e nei *low responder (*LR). Titoli degli anticorpi anti-spike (**A**) e titoli degli anticorpi neutralizzanti (**B**) in HR, LR e individui che hanno ricevuto solo il vaccino anti-SARS-CoV-2 (No-flu) sono mostrati prima (T0), dopo un mese (T1) e dopo 3 mesi (T3) dalla vaccinazione anti-SARS-CoV-2. L'asterisco indica che le differenze sono significative: *p <0,05, **p <0,01

per capire se nella coorte analizzata in questo studio c'è stata un'induzione di *trained immunity*. Le risposte alle vaccinazioni variano ampiamente nella popolazione, con alcuni individui che rispondono bene e altri che non sviluppano alcuna protezione. Gli individui che hanno risposto positivamente al vaccino antinfluenzale hanno mostrato una forte risposta al vaccino anti-SARS-CoV-2, mentre quelli con una risposta meno robusta non hanno mostrato differenze significative rispetto a coloro che hanno ricevuto solo il vaccino anti-SARS-CoV-2. I risultati sottolineano l'importanza di considerare i fattori individuali nella risposta alle vaccinazioni e l'analisi dei singoli profili immunitari prima della vaccinazione. Questo approccio potrebbe aiutare a identificare i potenziali biomarcatori capaci di predire le risposte immunitarie ai vaccini con lo scopo di ottimizzare e personalizzare le future strategie vaccinali. ■

Dichiarazione sui conflitti di interesse

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

Riferimenti bibliografici

1. Plotkin S. History of Vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(34):12283-7 (doi: 10.1073/pnas.1400472111).
2. Lee A, Floyd K, Wu S, *et al*. BCG vaccination stimulates integrated organ immunity by feedback of the adaptive immune response to imprint prolonged innate antiviral resistance. *Nat Immunol* 2024;25(1):41-53 (doi: 10.1038/s41590-023-01700-0).
3. Goodridge HS, Ahmed SS, Curtis N, *et al*. Harnessing the beneficial heterologous effects of vaccination. *Nat Rev Immunol* 2016;16(6):392-400 (doi: 10.1038/nri.2016.43).
4. Nielsen S, Sujan HM, Benn CS, *et al*. Oral Polio Vaccine Campaigns May Reduce the Risk of Death from Respiratory Infections. *Vaccines (Basel)* 2021;9(10):1133 (doi: 10.3390/vaccines9101133).
5. Angeletti PM, Marchi S, Trombetta CM, *et al*. Flu Vaccine Administration in the Period before SARS-CoV-2 Infection and Its Outcomes: An Umbrella Review. *Prev Med Rep* 2023:38:102575 (doi: 10.1016/j.pmedr.2023.102575).
6. Fink G, Orlova-Fink N, Schindler T, *et al*. Inactivated Trivalent Influenza Vaccination Is Associated with Lower Mortality among Patients with COVID-19 in Brazil. *BMJ Evid Based Med* 2021;26-192-3.
7. Candelli M, Pignataro G, Torelli E, *et al*. Effect of Influenza Vaccine on COVID-19 Mortality: A Retrospective Study. *Intern Emerg Med* 2021;16(7):1849-55 (doi: 10.1007/s11739-021-02702-2).
8. Wang R, Liu M, Liu J. The Association between Influenza Vaccination and COVID-19 and Its Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Vaccines (Basel)* 2021;9(5):529 (doi: 10.3390/vaccines9050529).
9. Lewnard JA, Cobey S. Immune History and Influenza Vaccine Effectiveness. *Vaccines (Basel)* 2018;6(2):28 (doi: 10.3390/vaccines6020028).
10. Tsang JS, Schwartzberg PL, Kotliarov Y, *et al*. Global Analyses of Human Immune Variation Reveal Baseline Predictors of Postvaccination Responses. *Cell* 2014;157(2):499-513 (doi: 10.1016/j.cell.2014.03.031).

TAKE HOME MESSAGES

- La vaccinazione antinfluenzale potenzia la risposta immunitaria alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2.
- Chi risponde bene alla vaccinazione antinfluenzale è più predisposto per il richiamo anti-COVID-19 o per altri vaccini non correlati e mantiene una protezione nel tempo (effetti a lungo termine).
- Le caratteristiche individuali fanno la differenza: predire le risposte immunitarie ai vaccini aiuta a ottimizzare e a personalizzare le strategie vaccinali.