

Influenza. Vacunas clásicas y novedosas a las puertas de otra pandemia

Raiza Martínez, Nevis Amín, Alicia Aguilar, Frank Camacho, Ela María Pérez

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600.
Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: rmartinez@finlay.edu.cu

Los virus de la influenza A, además del hombre, infectan otros mamíferos y una gran variedad de especies de aves. Desde 1997 se sabe que cepas aviarias son capaces de infectar al hombre provocando una enfermedad generalmente leve. El brote actual de gripe aviar H5N1 en humanos ha puesto en alerta a la comunidad científica internacional, no solo por su elevada mortalidad sino por su potencialidad en la generación de una nueva pandemia. Las autoridades sanitarias han puesto en marcha un amplio programa para la preparación ante esta contingencia, que abarca diferentes campos, desde el diagnóstico y la detección precoz de los brotes tanto en animales como en humanos, la caracterización sistemática de las cepas circulantes, el sacrificio de aves infectadas, la producción masiva de antivirales y por supuesto el desarrollo y producción a gran escala de vacunas eficaces. En este último tema se trabaja intensamente tanto en el mejoramiento de las vacunas ya existentes como en la búsqueda de alternativas basadas en tecnologías de nueva generación.

Palabras clave: Influenza, vacunas

Introducción

La influenza o gripe es una enfermedad respiratoria viral aguda de distribución universal que afecta a personas de todas las edades y que en algunos casos trae consigo la aparición de complicaciones severas y potencialmente mortales (1-3). Desde el punto de vista epidemiológico puede presentarse en forma de casos aislados, brotes o epidemias de magnitud variable y aparición estacional (invierno) y devastadoras pandemias. La vacunación y el uso de drogas antivirales, aunque con limitaciones, han mostrado ser medidas útiles para el control de esta enfermedad (4).

Aunque acompaña al hombre desde la antigüedad, la influenza ha cobrado una importancia extraordinaria en los últimos tiempos. La gripe aviar ha saltado peligrosamente la barrera de especie y amenaza con extenderse entre la población humana dejando una estela de alta mortalidad y abriendo las puertas al surgimiento de un virus pandémico.

La comunidad científica y médica se enfrenta al gran reto de evitar millones de muertes y el desastre económico que ocasionaría una pandemia de influenza.

Con este trabajo nos proponemos hacer una revisión básica, sintética y actualizada del tema, sobre todo en el campo de las vacunas, por ser este el frente en el que con seguridad combatiremos en esta singular batalla.

Agente etiológico. Clasificación

De etiología viral, la influenza es producida por un miembro de la familia Orthomixoviridae (5). Estos virus presentan una envoltura lipídica donde se insertan a manera de corona, espículas glicoproteicas, conocidas como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), muy importantes para el reconocimiento del virus por parte del receptor celular y del sistema inmune entre otras funciones. En su interior el virus presenta un genoma constituido por ARN de simple cadena que tiene como característica importante la de ser segmentado (5).

Las diferencias antigénicas de dos de las proteínas estructurales internas: NP y M, se utilizan para clasificar los virus de la influenza en los tipos A, B y C. El tipo B es exclusivo en humanos y el C, aunque se ha aislado fundamentalmente en el hombre, también ha sido encontrado en cerdos en China. La influenza A además del hombre, infecta naturalmente otras especies de mamíferos como cabras, cerdos, caballos y foca, así como a una amplia variedad de especies de aves, siendo las aves salvajes sus reservorios fundamentales en la naturaleza. Este tipo de influenza puede, además, ser clasificado en subtipos en base a la HA y la NA que presente en su superficie. Hasta el momento se han descrito 16 subtipos de HA (6) y 9 de NA, por lo que son posibles múltiples combinaciones diferentes de estos (5). Algunos subtipos como H1N1, H1N2 y H3N2 son los que circulan actualmente en humanos. H5, H7, H9 son los subtipos más prominentes que infectan aves (7).

Desviación y cambio antigénico

La inestabilidad genética de las proteínas de superficie es una importante característica de los virus de la influenza A y en menor grado de la B. Ambos antígenos de superficie experimentan variaciones de forma independiente. Las desviaciones antigénicas (*drift*) son cambios menores donde se conserva el subtipo y están dados por la ocurrencia de mutaciones a nivel del gen que resultan en variaciones de aminoácidos en las proteínas de superficie. Una variante debe experimentar dos ó más mutaciones antes de que surja una cepa nueva con importancia epidemiológica. El cambio antigénico (*shift*), por otra parte, refleja una modificación drástica de cualesquiera de las proteínas de superficie y conlleva a un cambio de subtipo. Este tipo de modificación es propio solamente del tipo A de influenza. El mecanismo propuesto para que ocurra el *shift* es el reordenamiento genético que puede ocurrir en el interior de una célula doblemente infectada, lo que está condicionado por la naturaleza segmentada del genoma (5). Esta mezcla pudiera tener lugar entre cepas humanas y animales, como ocurre particularmente en el cerdo, que por ser sensible a la infección con cepas humanas y

aviaras, constituye una fuente de nuevas cepas que al no tener antecedentes de circulación en una población determinada y encontrar a esta desprotegida desde el punto de vista inmunológico, pudiera causar un brote de proporciones variables en la misma (8). Bajo estas condiciones es precisamente donde se han gestado las tres grandes pandemias de influenza que han afectado a la humanidad en el siglo XX.

Pandemias de influenza

Se estima que en 1918 la llamada “gripe española” (H1N1) debe haber causado alrededor de 500 millones de fallecidos a nivel mundial. La “gripe asiática” (H2N2) en 1957-58 y la de “Hong-Kong” (H3N2) en 1968-69 causaron 70 000 y 34 000 muertos respectivamente sólo en los Estados Unidos (9). Las pandemias son eventos que afectan virtualmente a todos los países y una vez que se establecen son indetenibles dada la alta eficiencia en la transmisión del virus a través de la tos y el estornudo y a la existencia de casos asintomáticos que diseminan la enfermedad sin padecerla (5). Las pandemias también crean un caos económico nada despreciable ocasionando grandes pérdidas en materia de diagnóstico, tratamiento y ausentismo escolar y laboral con sus obvias consecuencias (10). Hoy, no sin temor y preocupación, se prevé la proximidad de una nueva pandemia, desencadenada por la epidemia de gripe aviar y su fatal paso al humano.

Gripe aviar. Su paso al humano

La influenza o gripe aviar es producida por cepas que habitualmente infectan solo aves y más raramente a cerdos. Se cree que todas las especies de aves son susceptibles. Las aves migratorias son consideradas su reservorio natural y diseminan la infección a través de grandes distancias. Los ejemplares infectados eliminan el virus a través de la saliva, las secreciones respiratorias y sobre todo de las heces fecales (11). El virus ha mostrado viabilidad por más de 30 días a 0 °C, 3 meses en las heces de animales y 4 días en agua a 22 °C (12). La infección puede pasar de las aves salvajes a las domésticas donde se manifiesta en dos formas principales: una de baja y otra de alta patogenicidad. En el primer caso los síntomas son ligeros y están dados sobre todo por una disminución en la producción de huevos. En el segundo, la mortalidad puede elevarse hasta casi el 100% en apenas 48 h (12).

Aunque no es común, el virus aviar puede cruzar la barrera de especie e infectar al humano. Esto ocurre fundamentalmente en individuos expuestos directamente al contacto con aves infectadas y a objetos o superficies contaminados por sus heces (8).

La Tabla 1 muestra cómo desde 1997 se conocen antecedentes confirmados de la infección humana por cepas aviarias, si bien ha sido escaso el número de individuos infectados (13-17).

Tabla 1. Infección humana por cepas de influenza aviar

Año	Cepa (subtipo)	Región	Número de infectados	Número de fallecidos
1997	H5N1	Hong Kong	18	6
1999	H9N2	China	2	0
		Hong Kong		
2002	H7N2	EEUU	1	0
2003	H5N1	China	2	1
		Hong Kong		
2003	H7N7	Holanda	89	1
2003	H9N2	Hong Kong	1	0
2003	H7N2	EEUU	1	0
2004	H7N3	Canadá	2	
2004	H10N7	Egipto	2	0
2004-2006	H5N1	Vietnam	93	42
		Thailandia	22	14
		Indonesia	32	24
		Cambodia	6	6
		Turquía	12	4
		Azerbaijan	8	5
		China	18	12
		Egipto	12	4
		Iraq	2	2

De las cepas aviarias de influenza que han pasado al humano la H5N1, responsable del brote actual, ha causado el cuadro clínico más severo y la mayor mortalidad (12).

A diferencia de la influenza estacional, la gripe aviar presenta un curso anormalmente agresivo, con toma pulmonar y daño multiorgánico que pueden llevar al rápido deterioro y la muerte de

más del 50% de los pacientes, siendo estos en su mayoría, niños y adultos previamente sanos (12).

Independientemente de este riesgo para la salud individual, la gripe aviar representa también otro importante riesgo: pudiera ser el punto de partida para una nueva pandemia de influenza. Hasta el momento no está demostrado que la transmisión interhumana de la enfermedad sea eficiente, aunque se reportan algunos casos en familiares de infectados cuya fuente de contagio se encuentra aún bajo investigación (18). Sin embargo, dadas las posibilidades de recombinación y variabilidad genética propias de los virus de influenza, no se descarta que ocurra en algún momento un cambio que favorezca la transmisión del virus de hombre a hombre y por tanto la diseminación de la enfermedad a escala global.

El hecho de que el número de animales y las zonas geográficas afectadas sean cada vez mayores, aumenta las probabilidades de ocurrencia de casos humanos y por tanto favorece la posibilidad de un aumento de la transmisibilidad entre los mismos. Este hecho marcaría el inicio de una nueva y devastadora pandemia.

Medidas emergentes contra la gripe aviar y la posible pandemia

Ante esta contingencia, autoridades sanitarias internacionales, como la OMS, la OIE y la FAO, trabajando de conjunto, toman medidas con el objetivo de detener la pandemia o al menos minimizar sus efectos (19). En el campo veterinario se trabaja arduamente en la detección temprana de las aves infectadas, la toma de medidas para contener los brotes y evitar la contaminación de humanos a partir de las aves (20, 21), así como en la obtención de una vacuna eficaz para la prevención (22, 23, 24). Se refuerza y centraliza la vigilancia epidemiológica de casos humanos y el monitoreo de las cepas circulantes desde el punto de vista genético (25, 26, 27). Están previstas las acciones de aislamiento, tratamiento individual y cuarentena que deben acometerse ante la aparición de casos humanos (28) y se establecen mecanismos para la producción y suministro masivo de antivirales eficaces. Sin dudas, uno de los campos donde con más interés se trabaja en la actualidad, por considerarse la principal vía de solución a largo plazo, es en la producción e investigación de vacunas contra la influenza (19).

Vacunas contra la influenza

La profilaxis mediante vacunas constituye la primera opción para reducir la morbimortalidad por influenza (29). Las mutaciones frecuentes y periódicas que experimenta el virus hacen que las vacunas sean obsoletas en forma continua por lo que anualmente es necesario preparar una vacuna que contenga los antígenos de las cepas que han circulado en una temporada y que con mayores probabilidades circularán en la próxima temporada de alza de la enfermedad que usualmente ocurre en invierno (30).

La vacuna normalmente es trivalente, es decir, contiene dos cepas de influenza A (H1N1) y una de B, que pueden o no variar de un año al siguiente en dependencia de los resultados de la vigilancia. Si la predicción epidemiológica coincide con la circulación real de cepas, los niveles de protección alcanzados por la vacuna son satisfactorios,

pero si no ocurre así los reportes de fallo vacunal pueden ser elevados, tal como ocurrió en la temporada 2004/2005 (31).

Tipos de vacunas

Las vacunas de influenza actualmente en uso pueden ser divididas de manera general en dos tipos: inactivadas (virus completo y por subunidades) y atenuadas. Todas, de manera general se obtienen a partir de virus cultivados en huevos embrionados en un largo proceso que toma entre 6 y 8 meses (31).

o Vacunas inactivadas

En las vacunas inactivadas de virus enteros el virus es cultivado en el saco alantoideo de los huevos embrionados en combinación con la cepa de crecimiento rápido A/PR8/34 (H1N1) que es incapaz de multiplicarse en humanos (32, 33). En estas condiciones, de manera natural ocurrirá el llamado reordenamiento clásico, proceso azaroso que resulta en un virus que contiene 6 genes de la cepa A/PR8/34 (H1N1) y los de la HA y NA de la cepa estacional. Este nuevo virus es entonces multiplicado en huevos embrionados, purificado, concentrado y finalmente inactivado usando formaldehído o β -propiolactona según el fabricante (34, 35).

Las vacunas por subunidades son producidas de igual manera, pero las partículas virales son fragmentadas mediante el uso de detergentes y la HA y NA son purificadas eliminándose otros componentes virales. Estas vacunas causan menos reactogenicidad local y una simple dosis genera niveles adecuados de anticuerpos contra el virus (34, 35, 36).

Las vacunas inactivadas se administran generalmente por vía intramuscular (IM), aunque las vías intradérmica (ID) (37, 38, 39) e intranasal (IN) (40) son actualmente investigadas.

o Vacunas atenuadas

Desde julio de 2003 se dispone de una vacuna atenuada de aplicación intranasal. La vacuna consiste en una cepa atenuada mediante adaptación a la multiplicación a bajas temperaturas (25 °C.) en la cual se insertan los genes de la HA y NA de las cepas circulantes. Se ha demostrado que el proceso de adaptación causa mutaciones estables en los genes PA, PB1 y PB2 del genoma viral (34, 35).

Las ventajas de esta vacuna estriban en su capacidad para generar inmunidad neutralizante local, respuesta inmune mediada por células y respuesta cruzada de mayor duración (36). Entre sus desventajas se encuentra la posibilidad de reversión de la cepa al estado virulento y de recombinación con una cepa salvaje resultando en una nueva cepa (41), así como la limitación de su uso en individuos inmunodeprimidos y la posible interferencia entre las cepas de la formulación vacunal trayendo consigo la disminución de la eficacia.

La Tabla 2 muestra las principales vacunas contra la influenza disponibles comercialmente en la actualidad (31).

Tabla 2. Principales vacunas contra la influenza disponibles en el mercado

Fabricante	Nombre comercial	Tipo de vacuna
Sanofi-Pasteur	Fluzone	Inactivada
	Fluzone libre de preservantes	
	Vacuna inactivada de virus particulado BP	
	Vacuna inactivada de virus particulado uso pediátrico	
	Inflexal V	
Glaxo Smith Kline Chiron Vaccines	Vaxigrip	Inactivada
	Mutagrip	
	Fluarix	
Wyeth Solvay Healthcare	Fluvirin	Inactivada
	Enzira	
MASTA SmithKline Beecham	Agrippal	Inactivada
	Influvac Sub-Unit	
	Invivac	
MedImmune Vaccines	MASTAFLU	Atenuada
	X-Flu	
	FluMist	

Eficacia de las vacunas contra la influenza

De manera general la eficacia de todas las vacunas contra la influenza en adultos sanos oscila entre el 80% y 100% después de la primera dosis. La respuesta de anticuerpos es medida usando la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

La Tabla 3 muestra un estimado general de los niveles de eficacia alcanzados por la vacuna en diferentes poblaciones (31).

Tabla 3. Rangos de eficacia de las vacunas contra la influenza en diferentes poblaciones humanas

Población	Eficacia %
Adultos y niños saludables	80-100
Insuficiencia renal crónica	66
Trasplantados de riñón	18-93
Hemodializados	25-100
Trasplantados de médula ósea	24-71
Enfermos de cáncer	18-60
Infectados con VIH	15-80

Efectos colaterales

Además de los eventos asociados de la alergia a las proteínas del huevo (la vacuna contiene trazas de este sustrato en el que se cultivó el virus), el Síndrome de Guillain-Barré es el efecto adverso de mayor importancia relacionado con la vacunación contra la influenza. Su incidencia ha disminuido de 0,17 por 100 000 vacunados en 1993-1994 a 0,04 en 2003-2004 (42). Las reacciones locales (10-64%) y sistémicas como fiebre, cefalea, mialgias y

decaimiento (5%) son los efectos más frecuentemente reportados (43, 44).

En el caso de las vacunas atenuadas los efectos colaterales son raros y están dados por congestión y secreción nasal, dolor de garganta, cefalea, mialgias, vómitos y dolor abdominal (44).

Grupos diana para la vacunación

La OMS (45, 46), el CDC (47) y otras autoridades sanitarias recomiendan de manera general vacunar a los siguientes grupos de riesgo:

- Individuos mayores de 65 años y de entre 6 y 23 meses de edad.
- Trabajadores e internos de hogares de ancianos y discapacitados y otras instituciones similares.
- Enfermos crónicos de Diabetes Mellitus, enfermedad crónica cardíaca o respiratoria, cáncer, inmunodepresión, insuficiencia renal, trasplante de órganos, entre otras.
- Embarazadas.
- Trabajadores de la salud.

Contraindicaciones

La alergia a las proteínas del huevo, aunque raramente, puede manifestarse con un cuadro severo de anafilaxia. Ante la presencia de una enfermedad febril aguda la vacunación debe posponerse. Se excluyen las enfermedades respiratorias altas ligeras y las rinitis alérgicas.

Vacunar durante el primer trimestre del embarazo así como a personas con antecedentes de un Síndrome de Guillain-Barré

constituían hasta hace poco una contraindicación, en la actualidad estas condiciones han dejado de considerarse como tal (48).

El uso de las vacunas atenuadas está contraindicado en menores de 5 años y en mayores de 65, en pacientes inmunodeprimidos, en individuos con historia previa de Guillain-Barré y en menores de 18 años que reciban tratamiento con aspirina (por su asociación con el Síndrome de Reye). Es importante tener en cuenta que la seguridad de esta vacuna en asmáticos, así como la teratogenicidad y la excreción con la leche materna no ha sido aún bien establecida (49).

Disponibilidad actual de la vacuna VS posibilidad de una pandemia

En el presente, el mundo cuenta con la capacidad de producir aproximadamente 300 millones de vacunas trivalentes (900 millones de vacunas monovalentes) anuales concentrada en 9 países, cuando lo ideal sería contar con 12 billones de vacunas monovalentes. Si contrastamos esta realidad con la amenaza real de una pandemia de influenza, es obvio que las capacidades resultan insuficientes para hacerle frente, máxime cuando se desconoce la cantidad de antígeno vacunal necesario, aunque todo apunta a que deberán ser superiores a las que se utilizan para las vacunas actuales (50).

Por tal motivo, las autoridades sanitarias internacionales, lideradas por la OMS en colaboración con la industria y las organizaciones regulatorias han establecido procedimientos acelerados y definido estrategias para garantizar una preparación adecuada ante la pandemia en materia de vacunas y otros aspectos. Nos circunscribiremos en este trabajo a las medidas relacionadas con las vacunas.

Medidas estratégicas

○ Economizar antígeno

Una de las direcciones en las que debe trabajarse es tratando de sacar el máximo provecho a las escasas cantidades de antígeno que pueden aportar las capacidades productivas actuales. El uso de adyuvantes eficientes es una de las vías para lograrlo. Se experimenta actualmente con varios adyuvantes, algunos conocidos desde hace tiempo y otros novedosos. Entre otros se trabaja con el componente C3d del complemento murino (51), la subunidad B recombinante de la toxina lábil de *E. Coli* (52), el IFN γ murino (53), los ISCOMs (Complejos inmunoestimulantes) (54), el llamado protollin (proteosoma unido de forma no covalente a LPS) (55), y la IL 12 (56).

Se conoce que las células dendríticas son capaces de inducir respuesta de células T así como formación de anticuerpos dependientes de células T (57). La inyección intradérmica de un inmunógeno es capaz de estimular eficientemente la actividad de estas células. Utilizando esta vía se ha demostrado que 40, 20 y 10% de la dosis estándar intramuscular (15 μ g de antígeno) de una vacuna inactivada contra la influenza, produce una respuesta similar a la de la dosis completa (37, 38, 39).

○ Sustitución de los huevos embrionados por cultivos celulares

Esta estrategia ofrece ventajas significativas y representa una nueva generación de vacunas contra la influenza. Se trabaja actualmente en

la inoculación de células Vero y MDCK (derivadas de riñón de mono verde africano y perro respectivamente) que pudieran ser crecidas en microtransportadores, lo que aumentaría aún más la superficie de cultivo (58). Entre las compañías abanderadas que conducen ensayos clínicos usando esta tecnología se encuentra Chiron (MDCK) y Sanofi Pasteur que propone por primera vez usar una línea de origen humano: la PER.C6, derivada de retina (59).

○ Sustitución del reordenamiento clásico por la genética reversa

El reordenamiento clásico --como ya se explicó--, es un largo y azaroso proceso que puede ser evitado aplicando la genética reversa. Esta metodología permite la atenuación de cepas mediante la manipulación genética. De manera general en un cultivo de células se introducen plásmidos con 6 genes internos provenientes de una cepa semilla atenuada que deberán recombinarse con los genes de la HA y la NA de la cepa de influenza circulante. El método permite la modificación o eliminación intencional de zonas relacionadas con la virulencia en los genes de la HA y la NA (60, 61). Varios candidatos vacunales contra la cepa aviar H5N1 han sido desarrollados usando esta tecnología (62, 63).

○ Vacunas recombinantes

Se ensayan también vacunas recombinantes que contienen diferentes proteínas virales (HA, NA, NP, M1, y/o M2) expresadas en diferentes sistemas: Baculovirus, Adenovirus y *E Coli*, (64, 65, 66, 67, 68).

○ Vacunas de ADN

Otro campo en el que desde hace años se trabaja y cuyo inicio fue precisamente con el virus de la influenza es el de las vacunas de ADN (69). Diversas construcciones que contiene genes de HA, NA, NP, M1 y NS combinados de diferentes maneras y asociados generalmente a inmunopotenciadores han sido empleadas (70, 71, 72, 73). A pesar de lo promisorio de esta tecnología, consideraciones fundamentalmente de tipo regulatorio han impedido su total desarrollo. Es de esperar que ante la contingencia que se nos avecina y conociendo sus potencialidades de todo tipo, se abra y facilite el camino en las investigaciones y la aplicación de las vacunas de DNA.

○ Vacuna universal

Un aspecto muy importante y que en conjunción con la aplicación de las tecnologías ya expuestas, resolvería definitivamente el problema de las vacunas contra la influenza es la utilización de antígenos conservados para generar protección contra la enfermedad en lugar de antígenos tan variables como la HA. En la creación de una vacuna universal contra la influenza también se trabaja desde la última década del pasado siglo (69). Las proteínas NP, M y M2 han demostrado ser protectogénicas y de reacción cruzada en los estudios hechos hasta el momento (70, 71).

La mayoría de los candidatos vacunales referidos han llegado exitosamente hasta la inoculación y reto en modelos animales y en

muchos casos se prevé su paso a ensayos en humanos en un futuro próximo.

La situación actual en que nos encontramos en relación con una nueva pandemia de influenza, tal como advierte la OMS, es diferente y ventajosa con respecto a las anteriores: estamos sobre aviso desde hace más de un año y por tanto tenemos una oportunidad sin precedentes para prepararnos. El éxito de esta gigantesca tarea dependerá de lo que seamos capaces de hacer cada uno de nosotros en el frente que nos corresponda.

Referencias

4. Monto AS, Kiomerh F. The Tecumseh Study of respiratory illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966-1971. *Am J Epidemiol* 1975;102:553-63.
5. Barker WH. Excess pneumonia and influenza associated hospitalization during influenza epidemic in the United States, 1970-78 *Am J Public Health* 1986;76:761-5.
6. Glezen WP. Serious morbidity and mortality associated with influenza epidemics. *Epidemiol Rev* 1982;4:2-44.
7. *MMWR* 2004; 53 (NO. RR-6)1-40.
8. Murphy BR WR. Orthomixoviruses. In: Fields KD, Howley PM, eds. *Fields virology*. Philadelphia, PA: Lippincott; 1996:1397-445.
9. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black headed gulls. *J Virol* 2005;79(5):2814-22.
10. Centers for Diseases Control (CDC), USA, 2005. Influenza Viruses. Types, Subtypes and Strains. November 2005. <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses.htm> .
11. Centers for Diseases Control (CDC), USA, 2004. Transmission of Influenza A viruses between animals and people. January 2004 <http://www.cdc.gov/flu/about/fluviruses.htm> .
12. Centers for Diseases Control (CDC), USA, 2006. Key Facts about Pandemic Influenza. January 2006. <http://www.cdc.gov/flu/pandemic/keyfacts.htm#history> .
13. Meltzer MI, Cox NI, Fakuda K. The economic impact of pandemic influenza in the United States: priorities for intervention. *Emerg Infect Dis* 1999;5:659-71.
14. Centers for Diseases Control (CDC), USA, 2005. Spread of avian influenza viruses among birds. October 2005. <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/spread.htm> .
15. WHO Avian influenza frequently asked questions. December 2005. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avian_faqs/en/index.html .
16. Centers for Diseases Control (CDC), USA, 2006. Avian influenza infection in humans. January 2006. <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/avian-flu-humans.htm> .
17. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999; 354: 916-7.
18. Butt KM, Smith GJD, Chen H, Zhang LJ, LeungYHC, Xu KM, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza in Hong Kong. 2005. *J Clin Microbiol* 2005;43:5760-7.
19. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1356-61.
20. Avian influenza virus A (H10N7) circulating among humans in Egypt. *EID Weekly Updates* 2004; 2:2.
21. WHO 2006. Avian influenza situation in Iraq. January 2006. http://www.who.int/csr/don/2006_1_30a/en/index.html .
22. WHO 2005. Respuesta a la amenaza de una pandemia de gripe aviar. Medidas estratégicas recomendadas. Septiembre 2005. http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_8/en/index.html .
23. <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/documents/ai/concmlaysia.pdf>
24. WHO 2005. WHO laboratory guidelines for the collection of animal specimens for diagnosis of influenza. January 2005. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/animalspecimens/en/index.html .
25. Capua I, Terregino C, Catolli G, Mutinelli F, Rodríguez JF. Development of a DIVA- Differentiating infected from vaccinated animals-strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 2003;32: 47-55.
26. Luschow D, Werner O, Mettenleiter TC, Fuchs W. Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. *Vaccine* 2001;19:4249-4259.
27. Swaine DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, Suárez DL. Protección against highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine* 2000;18:1088-1095.
28. WHO 2005. WHO laboratory guidelines for the collection of human specimens for diagnosis of influenza. January 2005. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/index.html .
29. WHO 2005. Guidance for the timely sharing of influenza viruses/specimens with potential to cause human influenza pandemics. March 2005. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/Guidance_sharing_viruses_specimens/en/index.html .
30. WHO 2005. WHO guidance on public health measures in countries experiencing their first outbreaks of H5N1 avian influenza. October 2005. http://www.who.int/entity/csr/disease/avian_influenza/guidelines/firstoutbreak/en/index.html .
31. WHO 2004. WHO interim guidelines on clinical management of human infected by influenza A (H5N1). March 2004. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/clinicalmanagement/en/index.html .

32. WHO 2005. WHO checklist for influenza pandemic preparedness planning. April 2005. http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005.
33. Centers for Diseases Control (CDC), USA, 2005. Vaccination Resources for Health Care Professionals. September 2005. <http://www.cdc.gov/flu/professionals/vaccination/#recs>.
34. Korsman S. Vaccines in Kamps BS, Hoffman C, Preiser W, eds. Influenza Report 2006. <http://www.influenzareport.com/ir/vaccines.htm>
35. Beare AS, Schild GC, Craig JW. Trials in man with live recombinants made from A/PR/8/34 (HON1) and wild H3N2 influenza viruses. *Lancet* 1975;2:729-32.
36. Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y. An improved reverse genetic system for influenza virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16825-9.
37. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002;20:3068-87.
38. Potter J, Stott DJ, Roberts MA, et al. Influenza vaccination of health care workers in long-term-care hospitals reduces the mortality of elderly patients. *J Infect Dis* 1997;175:1-6.
39. Couch RB, Keitel WA, Cate TR. Improvement of inactivated influenza virus vaccines. *J Infect Dis* 1997;176:Suppl 1.
40. Belshe RB, Newman FK, Cannon J, et al. Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. *N Engl J Med* 2004; 351:2286-94.
41. Cooper CL, Davis H, Cameron DW. Influenza vaccination with 1/10th the full dose. *N Engl J Med* 2004;351:2339-40.
42. Kenney RT, Frech SA, Muenz LR, Villar CP, Glenn GM. Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N Engl J Med* 2004; 351:2295-301.
43. Langley JM, Halperin SA, McNeil S, et al. Safety and immunogenicity of a Proteosometrade mark-trivalent inactivated influenza vaccine, given nasally to healthy adults. *Vaccine* 2006;24(10):1601-1608.
44. Youngner JS, Treanor JJ, Betts RF, Whitaker-Dowling P. Effect of simultaneous administration of cold-adapted and wild-type influenza A viruses on experimental wild-type influenza infection in humans. *J Clin Microbiol* 1994;32(3):750-4.
45. Haber P, DeStefano F, Angulo FJ, et al. Guillain-Barre syndrome following influenza vaccination. *JAMA* 2004; 292: 2478-81.
46. Belshe RB. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005;353:2209-11.
47. Musana KA, Yale SH, Mazza JJ, Reed KD. Practical considerations to influenza vaccination. *Clin Med Res* 2004;2:256-9.
48. WHO 2005. WHO intercountry-consultation. Influenza A/H5N1 in humans in Asia. Manila, Philippines, 6-7 May 2005. December 2005. http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_7_04.pdf
49. WHO 2005. Influenza vaccine. December 2005 at <http://www.who.int/vaccines/en/influenza.shtml>.
50. Centers for Disease Control (CDC) USA 2005. Interim Guideline: Planning for a Possible U.S. Influenza Vaccine Shortage, 2005-06. November 2005.
51. Fleming D. Influenza pandemics and avian flu. *BMJ* 2005; 331:1066-9.
52. MedImmune Vaccines, Inc. FluMist 2005-2006 Formula. 2005. [http://www.fda.gov/cber/label/inflmed080505 LB.\(pdf\)](http://www.fda.gov/cber/label/inflmed080505 LB.(pdf)) .
53. Fedson DS. Preparing for pandemic vaccination: an international policy agenda for vaccine development. *J Public Health Policy* 2005;26:4-29.
54. Mitchell JA, Green TD, Brigh RA, Ross TM. Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins. *Vaccine*. 2003;21(9-10):902-14.
55. Haan L, Verweij WR, Holtrop M, Brands R, van Scharrenburg GJ, Palache AM, Agsteribbe E, Wilschut J. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of Escherichia coli heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine* 2001; 19(20-22):2898-907.
56. Van Slooten ML, Hayon I, Babai I, Zakai-Rones Z, Wagner E, Storm G, Kedar E. Immunoadjuvant activity of interferon-gamma-liposomes co-administered with influenza vaccines. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1531(1-2):99-110.
57. Voeten JT, Rimmelzwaan GF, Nieuwkoop NJ, Lovgren-Bengtsson K, Osterhaus AD. Introduction of the haemagglutinin transmembrane region in the influenza virus matrix protein facilitates its incorporation into ISCOM and activation of specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *Vaccine*. 2000; 19(4-5):514-22.
58. Jones T, Cyr S, Allard S, Bellerose N, Lowell GH, Burt DS. Protollin: a novel adjuvant for intranasal vaccines. *Vaccine* 2004; 22(27-28):3691-7.
59. Galarza JM, Latham T, Cupo A. Virus-like particle vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunol*. 2005;18(2):365-72.
60. La Montagne JR, Fauci AS. Intradermal influenza vaccination--can less be more? *N Engl J Med*. 2004;351(22):2330-2.
61. Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. *N Engl J Med*. 2005 May 5;352(18):1839-42.
62. <http://www.in-pharmatechnologist.com/news/ng.asp?n=63498&m=1IPEO31&c>
63. Palese P, Zavala F, Muster T, Nussenzweig RS, Garcia-Sastre A. Development of novel influenza virus vaccines and vectors. *J Infect Dis* 1997; 176: Suppl 1.
64. Palese P, Garcia-Sastre A. New directions in vaccine research. *J Clin Invest* 2002; 109:1517-8.
65. Nicholson C, Major D, Wood JM, Robertson JS. Generation of influenza vaccine virus on Vero cells by reverse genetic: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* 2005; 23 (22): 2943-52.
66. Newman G, Fujii K, Kino Y, An improved reverse genetic system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16825-9.
67. Tang M, Harp JA, Wesley RD. Recombinant adenovirus encoding the HA gene from swine H3N2 influenza virus partially protects mice from

- challenge with heterologous virus: A/HK/1/68 (H3N2). *Arch Virol.* 2002; 147(11):2125-41.
68. Jeon SH, Ben-Yedidia T, Arnon R. Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus. *Vaccine* 2002; 20(21-22):2772-80.
69. Kilbourne ED, Pokorny BA, Johansson B, Brett I, Milev Y, Matthews JT. Protection of mice with recombinant influenza virus neuraminidase. *J Infect Dis* 2004; 189(3):459-61.
70. de Filette M, Min Jou W, Birkett A, Lyons K, Schultz B, Tonkiro A, Resch S, Fiers W. Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs. *Virology.* 2005; 337: 149-161.
71. de Wit E, Munster VJ, Spronken MI, Bestebroer TM, Baas C, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Protection of mice against lethal infection with highly pathogenic H7N7 influenza A virus by using a recombinant low-pathogenicity vaccine strain. *J Virol.* 2005; 79(19):12401-7.
72. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259(5102):1745-9.
73. Ulmer JB, Fu TM, Deck RR, Friedman A, Guan L, DeWitt C, Liu X, Wang S, Liu MA, Donnelly JJ, Caulfield MJ. Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol.* 1998 ;72(7):5648-53.
74. Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, Lo CY, Cooper LA, Subbarao K, Renshaw M, Sambhara S, Katz JM. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(8):796-801.
75. Heinen PP, Rijsewijk FA, de Boer-Luijtz EA, Bianchi AT. Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 8):1851-9.
76. Ljungberg K, Wahren B, Almqvist J, Hinkula J, Linde A, Winberg G. Effective construction of DNA vaccines against variable influenza genes by homologous recombination. *Virology* 2000;268(2):244-50.

Influenza. Classic and novel vaccines on the verge of another pandemic

Abstract

Influenza A viruses infect humans and other mammalian and bird species. Since 1997, it has been known that some avian strains were able to infect humans, generally causing a mild disease. The present H5N1 avian influenza outbreak has led to a heightened level of awareness of the scientific and public health officials, not only because of its high mortality, but also because of its potential to trigger a new pandemic. In response to this emerging threat, the international sanitary authorities are developing a wide preparation program, which involving different measures such as the accurate diagnosis of animal and human outbreaks; systematic characterization of circulating strains; elimination of infected birds; mass production of antiviral drugs, and research, development and large scale production of efficacious vaccines. In the last aspect, great effort is being carried out for the improvement of classic vaccines and in the search for alternatives based on new technologies.

Keywords: Influenza, vaccines