

# Investigación en nuevas vacunas antigripales, nuevas vías de administración y nuevas indicaciones

R. Ortiz de Lejarazu<sup>a</sup>, J.M. Eiros<sup>b</sup>, M.A. Villanueva<sup>c</sup>, A. Delgado<sup>d</sup> y J. Castrodeza<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Profesor Titular de Microbiología. Facultad de Medicina de Valladolid. Jefe de Sección de Virología. Hospital Clínico Universitario. Valladolid.  
<sup>b</sup>Profesor Titular de Microbiología. Facultad de Medicina de Valladolid. <sup>c</sup>Centro de Salud Bustarviejo de Madrid. <sup>d</sup>Servicio de Microbiología. Fundación Hospital Alarcón. Madrid. España. <sup>e</sup>Profesor Titular de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina de Valladolid. Facultativo Especialista de Área del Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. España.

## Introducción

La vacuna de la gripe tiene más de 50 años de existencia<sup>1,2</sup>. Durante este período tan amplio se han producido muchos descubrimientos y cambios en el conocimiento sobre la epidemiología y los virus de la gripe. La concepción de la vacuna y la vacunación gripal no han sido ajenas a estos hechos y en la última década han aparecido distintas formulaciones y composiciones de estos preparados de modo que en el lenguaje sanitario se emplea con frecuencia el término vacunas de gripe en vez referirse a la vacuna de gripe<sup>2-5</sup>.

Los tres pilares que constituyen el talón de Aquiles de las vacunas actuales de gripe son los cambios anuales en la composición viral de la vacuna en función de la deriva antigénica del virus; la exclusiva administración mediante inyección intramuscular o subcutánea profunda, y la necesidad de vacunación anual para estar protegido de forma adecuada<sup>3</sup>.

Si cualquiera de las vacunas al uso que conocemos hoy día frente a diversos microorganismos tuviese semejantes condicionantes y complejidad en su fabricación y en la aplicabilidad, es probable que no tendrían la difusión y distribución de la que disfrutaban actualmente las vacunas contra la gripe. Sin embargo, la enorme morbilidad de la gripe, el potencial tremendo de alteración social que suponen las epidemias anuales de gripe y su impacto sobre la mortalidad general justifican por sí solos la existencia de una vacuna con las limitaciones anteriormente expuestas<sup>6,7</sup>.

A este panorama es necesario añadir el potencial desarrollo de pandemias por aparición de virus gripales a partir de mecanismos de recombinación genética entre virus humanos y animales (avianos generalmente), por reemergencia desde reservorios desconocidos o por salto de especie directamente al ser humano<sup>2,8,9</sup>.

Las circunstancias mencionadas hacen que las vacunas de la gripe y la vacunación gripal sean un campo en continua evolución desde la aparición de la primera vacuna autorizada para uso humano en los EE.UU. y que su difusión suponga un enorme esfuerzo de aplicación y administración<sup>2,5</sup> que en España alcanza una cifra cercana a los siete millones de dosis anuales.

La obtención y producción de las vacunas inactivadas actuales se consigue a partir del cultivo de las cepas gripales vacunales en huevos embrionados de gallina, un método antiguo que requiere modificaciones sustanciales para conseguir agilizar y adaptar su producción a otros mecanismos modernos de fabricación actualmente en desarrollo<sup>10</sup>. La gran necesidad de dosis vacunales cada año en meses puntuales, unido a los necesarios cambios de cepas virales anuales como consecuencia de la variación antigénica del virus gripal, hace necesario encontrar y estandarizar nuevos métodos de producción y fabricación de vacunas contra la gripe que permitan dotarnos a la civilización actual de una mayor flexibilidad y capacidad de respuesta ante situaciones de gran demanda de vacuna<sup>9,10</sup>.

Aunque la eficacia y efectividad de la vacunación gripal con virus inactivados han sido comprobadas en numerosos estudios<sup>11-25</sup>, estamos aún lejos de disponer de una vacuna de gripe similar a otras vacunas clásicas virales en cuanto a fabricación y aplicabilidad. Por otra parte, los conocimientos adquiridos respecto a la epidemiología y difusión comunitaria de los brotes anuales de gripe epidémica plantean nuevos interrogantes sobre la necesidad de ampliar la cobertura vacunal a otras poblaciones diana más allá de los considerados clásicamente como grupos de riesgo<sup>25-30</sup>.

En este artículo revisaremos las tendencias en investigación de nuevos diseños, composición y fabricación de vacuna de gripe, así como los posibles cambios y propuestas de indicaciones y administración de las vacunas gripales.

## Nuevas vacunas antigripales

En la tabla 1 se exponen los principales objetivos a mejorar o conseguir con las nuevas vacunas antigripales. Contemplados de forma conjunta pretenden reducir la frecuencia de vacunación, ampliando el tipo de respuesta inmunitaria a expensas de mejorar la respuesta celular de las vacunas actuales. También se pretende potenciar la intensidad de dicha respuesta, consiguiendo así prolongar

Correspondencia: Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu. Centro Nacional de Gripe de Valladolid. Área de Microbiología. Facultad de Medicina. Ramón y Cajal, 7. 47005 Valladolid. España.

TABLA 1  
Cuestiones pendientes en las vacunas gripales

Mejorar la eficacia y efectividad en todos los grupos poblacionales
Potenciar el nivel de Acs IH, respuesta CTL y secretoria
Alargar la duración del efecto protector
Impedir la infección por el virus
Simplificar su administración
Facilitar la elaboración, producción y distribución
Aumentar nuestra capacidad de respuesta frente a una pandemia

la duración y la efectividad de la vacuna. Finalmente se pretende utilizar nuevas tecnologías para mejorar la eficacia y flexibilidad en la producción de vacuna gripal ante el riesgo de aparición de una pandemia.

Los nuevos diseños de vacunas gripales inactivadas se hacen desde distintas aproximaciones, entre ellas cabe señalar el uso de inmunomoduladores, la forma de presentación de los antígenos gripales y la formulación y composición de las vacunas (tabla 2). De manera paralela la industria farmacéutica pretende objetivos que permitan ampliar fácilmente la vacunación sin problemas en la producción ante aumentos de la demanda (tabla 3).

### Vacunas con adyuvantes

La utilización de adyuvantes en los nuevos diseños de vacunas de gripe es antigua y ha tenido altibajos científicos a lo largo del tiempo<sup>32,33</sup>. Uno de los problemas a resolver ha sido la posibilidad de toxicidad asociada a algunas de las sustancias empleadas con poder adyuvante. Con el tiempo se han ido eliminando de los adyuvantes la fracción que ocasionaba la toxicidad conservando y purificando la fracción o fracciones responsables del efecto potenciador inmunógeno.

Entre los adyuvantes más empleados y ensayados en los últimos años destaca el MF59<sup>34-38</sup>, una emulsión acuosa de aceite con escualeno, metabolito derivado del colesterol, que contiene polisorbato 80 que actúa como surfactante acuoso y trioleato de sorbitol como surfactante oleoso. La combinación de estas sustancias forma unas partículas de 150 nm de diámetro que al combinarse con los antígenos de las vacunas gripales inactivadas producen una respuesta mayor y más prolongada<sup>10,33,35-38</sup>.

TABLA 2  
Aproximaciones en los nuevos diseños de vacunas gripales

Presentación de los ags gripales
Uso de inmunomoduladores
Formulación y composición de las vacunas

TABLA 3  
Objetivos de los nuevos diseños de vacunas gripales

Simplificar su administración
Mejorar los métodos de producción
Acortar el plazo de disponibilidad
Mayor capacidad de respuesta ante una pandemia

Este efecto potenciador de la respuesta ha sido comprobado en personas mayores y otros grupos poblacionales en numerosos estudios<sup>33-39</sup>.

Más de 10.000 personas han sido incluidas en ensayos con adyuvante MF59<sup>36</sup>, observándose de forma constante una persistencia del efecto inmunógeno incluso en las vacunaciones posteriores, aspecto importante ya que un descenso del efecto potenciador inmunógeno en dichas circunstancias podría disminuir el efecto protector de la vacunación anual cuando ésta se realizase con cepas iguales a las del año anterior<sup>15,16</sup>, teniendo en cuenta que algunos años la vacunación gripal se lleva a cabo con vacuna que contiene la misma composición de virus gripales que la temporada precedente.

La vía de potenciar el efecto de la vacuna gripal mediante los adyuvantes es un campo en continua expansión, recientemente se han ensayado en modelos animales los adyuvantes LT-K63 y LT-R72, fracciones derivadas de la enterotoxina termoestable de *E. coli*, con resultados prometedores<sup>40</sup>. Algunas de estas experiencias en modelos animales han utilizado además la combinación de liposomas para vehicular interferón gamma en vacunas inactivadas compuestas de subunidades antigénicas de hemaglutinina y neuraminidasa y conseguir un efecto inmunógeno mayor<sup>41,42</sup>.

El efecto inmunógeno de las vacunas con adyuvantes es de especial interés en la vacunación de ancianos<sup>4,11-14,24,43</sup>. Este grupo de población, que es protagonista y diana de las campañas e indicaciones de vacunación gripal, responde peor frente a la vacuna gripal que la población más joven<sup>4,12,14</sup>. Mientras que la eficacia inmunógena de respuesta (medida en términos de alcanzar un título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación > 1/40) tras la vacunación se sitúa en torno al 90% en < 50 años, por encima de 75 años puede llegar a ser sólo de un 50%<sup>44</sup>. La vacunación utilizando adyuvantes logra aumentar la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en este especial e importante grupo de población anciana, aunque se ha descrito mayor incidencia de reacciones locales secundarias en el lugar de la inyección<sup>13,14</sup>, en algunos casos pueden producirse reacciones sistémicas leves como escalofríos o fiebre, mialgia, artralgias, náuseas y cefalea. Estos eventos clínicos pueden ocurrir entre las 48 h y una semana tras la vacunación<sup>33</sup>. Recientemente se ha desarrollado una vacuna (Fluad<sup>®</sup>) que contiene MF59 por la compañía Chiron Vaccines<sup>36,38</sup>. En términos generales este tipo de vacunas tiende a producir respuestas protectoras más evidentes y mejores cuanto más bajo es el valor de anticuerpos previo a la vacunación<sup>35,38</sup>, circunstancia que no siempre coincide en las personas mayores que cuentan con numerosas exposiciones anteriores a infecciones gripales.

Las vacunas inactivadas de administración intramuscular, tanto completas como de subunidades o purificadas, activan muy poco y esporádicamente la respuesta linfocitaria T CD8 citotóxica y producen escasa respuesta de IgA secretoria. Por estas razones, las preparaciones vacunales virosomales y proteosómicas se han utilizado también para potenciar el efecto inmunizante de las vacunas gripales inactivadas cuando se administran por vía intranasal, aspecto que será comentado más adelante.

### Presentación de los antígenos gripales

Las vacunas de gripe inactivadas, dependiendo del tipo de elaboración, contienen distintos antígenos del virus gripal, pero fundamentalmente hemaglutinina, sola o en combinación con otros com-

ponentes estructurales del virus, como la neuraminidasa gripal, la nucleoproteína (proteína interna del nucleocápside del virus gripal) y la proteína M. Dichos antígenos se presentan en las preparaciones vacunales en una solución acuosa o salina sin otros componentes<sup>1,3,30</sup>.

Las nuevas presentaciones de los antígenos gripales se basan en el uso combinado con adyuvantes, en forma de complejos inmunoestimulantes (ISCOMS) o imitando partículas virales (vacunas virosomales, liposomales y proteosómicas) de reciente experimentación que consiguen una liberación más prolongada y un procesamiento distinto de los antígenos protectores gripales por el sistema inmunitario<sup>9,41,45-47</sup>.

La vehiculización de los antígenos mediante compuestos proteicos o de naturaleza fosfolipídica más o menos estructurados<sup>42,45,46</sup> hace que se potencie el efecto de persistencia de los antígenos gripales y que se estimule una respuesta T citotóxica celular similar a la que ocurre en la infección natural de la gripe. La activación de los linfocitos T citotóxicos ocurre en etapas posteriores al procesamiento del antígeno cuando éste es degradado a péptidos sencillos en el citoplasma de la célula. Estos péptidos de origen viral forman complejos con las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) que son transportados hasta la membrana citoplásmica a través del retículo endoplásmico y presentados allí para su reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos CD8. Se ha postulado una falta de respuesta a la vacunación que podría estar ligada a determinados polimorfismos en las moléculas de los antígenos HLA de clase II como moduladores de la respuesta de anticuerpos<sup>48</sup>.

El proceso descrito no ocurre con las vacunas inactivadas tradicionales de gripe, ya que los antígenos no alcanzan ni son procesados en el citoplasma. Al modificar la presentación de los antígenos en forma de ISCOM se facilita el transporte y procesamiento antigénico por la *ruta endógena* citoplasmática<sup>49</sup>.

En la actualidad se ha desarrollado una vacuna de estas características para uso veterinario en caballos por Schering-Plough. Las vacunas de gripe basadas en ISCOM se han probado en ensayos sobre animales (gallinas con cepas H5N1 y monos con H3N2) comprobándose una buena respuesta celular T además de una mejora de la respuesta humoral favorecida por la estimulación de linfocitos T *helper*. Estos modelos de vacunas gripales inducen altos títulos de anticuerpos neutralizantes durante períodos más largos que los inducidos por las vacunas clásicas inactivadas<sup>50</sup>.

Las vacunas virosomales incorporan los antígenos glucoproteicos que componen la vacuna gripal en vesículas de 150 nm de diámetro aproximadamente, formadas por una membrana bilaminar lipídica compuesta generalmente de fosfatidiletanolamina que imita de forma artificial las partículas virales y potencia el efecto inmunógeno productor de anticuerpos protectores<sup>42,45,46</sup>. La tolerancia de este tipo de vacunas es sensiblemente mejor que las que tienen adyuvantes y pueden además potenciar la respuesta celular de forma más eficaz que las vacunas inactivadas clásicas, aspectos pendientes de ser evaluados con exactitud en series amplias. Se han registrado dos tipos de formulaciones de vacunas virosomales, una de administración intramuscular y otra para ser aplicada por vía nasal (vacuna inactivada virosómica nasal), lo que añade nuevas posibilidades en el futuro para la ampliación de la cobertura gripal a grupos renuentes a la administración mediante inyección<sup>45</sup>.

## Nuevos métodos de producción

Uno de los retos pendientes en la fabricación de vacunas de gripe reside en la capacidad de la sociedad y la industria para disponer de forma ágil y rápida de grandes dosis de vacuna; por ello la flexibilidad necesaria para atender las necesidades del mercado sanitario respecto a una vacuna con las peculiaridades de la gripe es un aspecto pendiente de solución<sup>2,9,30</sup>.

Un hecho a tener en cuenta sobre los métodos de producción de estas vacunas es la posibilidad de aparición de virus con potencial pandémico. En estas circunstancias puede ser muy difícil o imposible cubrir a tiempo las necesidades de dosis de vacuna que pueden llegar a multiplicarse tres o cuatro veces las de una temporada habitual. El problema puede resultar más acuciante si se tiene en cuenta que los 15 µg por dosis habituales en la vacuna ordinaria pueden ser insuficientes en individuos *naïve* para la infección gripal, siendo necesarias dosis mayores o dos dosis separadas por un intervalo en dicho supuesto<sup>2,30,51</sup>.

En períodos no pandémicos las necesidades de dosis pueden aumentar cuando se amplían las indicaciones de vacunación a otros grupos de edad (> 50 años, niños, etc.) que anteriormente no estaban previstos<sup>52,53</sup>. En estos supuestos los laboratorios productores de vacuna no podrán fabricar una cantidad suficiente de dosis teniendo en cuenta que transcurren habitualmente 7 u 8 meses desde el diseño de su composición hasta la distribución en el mercado. Por otra parte, la vacuna de gripe se produce *de novo* cada año debido a las previsiones anuales (en febrero) de circulación del virus que hacen los 110 laboratorios que componen la red de vigilancia de gripe de la OMS<sup>9,50</sup>. Este hecho explica la necesidad de disponer de gran número de huevos de gallina embrionados meses antes de la comercialización a partir de septiembre de cada año. Esa antelación necesaria para la producción requiere una programación anticipada en relación con las previsiones sanitarias y las peculiaridades biológicas de las cepas vacunales, teniendo en cuenta la dificultad de aumentar la disponibilidad de huevos embrionados de gallina con 3 meses o menos de antelación.

Otro hecho a tener en cuenta es que las vacunas de gripe una vez producidas y envasadas no sirven para años sucesivos, dada la capacidad de mutación antigénica de los virus gripales<sup>8</sup>; por dicho motivo la industria farmacéutica produce cantidades de vacuna anual en función de las expectativas de mercado. Este escenario es difícilmente modificable en el caso de aparición de virus con potencial pandémico<sup>50</sup>, ya que de confirmarse lo sucedido en anteriores pandemias los nuevos virus podrían iniciar su circulación en épocas diferentes del otoño o invierno (estaciones típicas de la gripe) en el hemisferio norte. Esa temporalidad en la aparición obligaría a trasladar las previsiones anteriores de disponibilidad de huevos embrionados a momentos en los que su producción se encuentra en valores bajos.

Para obviar el crecimiento de las cepas de virus vacunales en huevos embrionados se han desarrollado otros sistemas más flexibles que permitan reemplazar el uso de huevos para la producción a gran escala de antígenos gripales. Los cultivos celulares en líneas continuas como las MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) suponen una alternativa que ofrece varias ventajas sobre la producción en huevos<sup>54,55</sup>. Los cultivos celulares modifican en menor medida la expresión fenotípica antigénica viral de modo que los virus gripales cultivados en células de mamíferos son más parecidos a sus antecede-

sores salvajes. Esto se debe a que las variantes que aparecen espontáneamente durante el cultivo y replicación masiva del virus experimentan una presión selectiva menor en las células que en el embrión de pollo<sup>56,57</sup>.

La tecnología que existe actualmente facilita disponer rápidamente de grandes cantidades de células; algo difícilmente alcanzable con los huevos embrionados. El desarrollo de líneas celulares como la MDCK-SF1 que no precisan suero bovino fetal facilita la replicación del virus, ya que el suero bovino fetal inhibe la acción proteasa de la tripsina necesaria para una eficiente replicación del virus de la gripe. Los resultados de vacunas gripales producidas en cultivos celulares como los mencionados han demostrado que la seguridad y eficacia de estas vacunas son comparables a las producidas en huevo y sin la limitación de la alergia a las proteínas aviarias<sup>58,59</sup>.

El futuro diseño de las vacunas de gripe pasa necesariamente por las técnicas de manipulación genética y construcción de vectores virales (tabla 4). La tecnología genética inversa aplicada a los virus gripales ha facilitado la aproximación a esta moderna metodología. El ARN de los virus gripales no es directamente infeccioso y la manipulación genética de estos virus es mucho más compleja que la de otros virus. El carácter segmentado de su ARN, la polaridad negativa y el complicado mecanismo molecular de replicación de los ortomyxovirus hacen que los avances en este campo deban estar supeditados a un desarrollo de la posibilidad de trasfectar plásmidos del complejo de replicación del ARN del virus de la gripe formado por PB1, PB2 y PA y la transcripción de ARN viral y mensajero a partir de promotores del complejo polimerasa pol I y pol II. La construcción de viriones o partículas víricas sin capacidad de replicación a partir de ADN complementario defectivas de genes NS que codifican las proteínas no estructurales NS1 y NS2 han permitido elaborar prototipos de vacunas que confieren resistencia a la infección por el virus homólogo<sup>60-62</sup>.

TABLA 4

**Aproximaciones moleculares para la elaboración de vacunas gripales. Evitar el cultivo en huevos embrionados**

Modificación genética de los virus
Tecnología genética inversa
Clonación de ADNc
Uso del complejo polimerasa PB1, PB2, PA y NP
Transfección de ribonucleoproteína
Vacunas con el gen PB2

(Tomada de Hoffman et al. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:6108.)

La expresión de hemaglutinina y neuraminidasa en células eucariotas ha posibilitado la obtención de formas solubles de dichos antígenos con poder inmunizante en modelos murinos; el empleo de baculovirus como vectores para la expresión de los antígenos mencionados ha supuesto un paso más del diseño de vacunas mediante una metodología elegante<sup>4,10</sup>; de esta forma se ha podido obtener proteína M2 en cantidad suficiente para poder ensayarse como componente de la vacuna. La M2 es una glucoproteína tetramérica anclada en la membrana lipídica del virus que funciona como un canal iónico imprescindible para las etapas precoces de la replicación del virus (fig. 1). Esta proteína tiene una parte externa, M2e cuya secuencia está muy conservada en todos los virus gripales A desde 1933, fecha del primer aislamiento de virus gripal. La fusión de la secuencia de M2e a la de la proteína del core del virus de la hepatitis B ha permitido obtener partículas muy inmunógenas que han conferido protección a ratones frente a dosis letales de diversas cepas de virus gripales. Aunque los ensayos son alentadores, se necesitan más pruebas con esta potencial vacuna<sup>63,64</sup>.

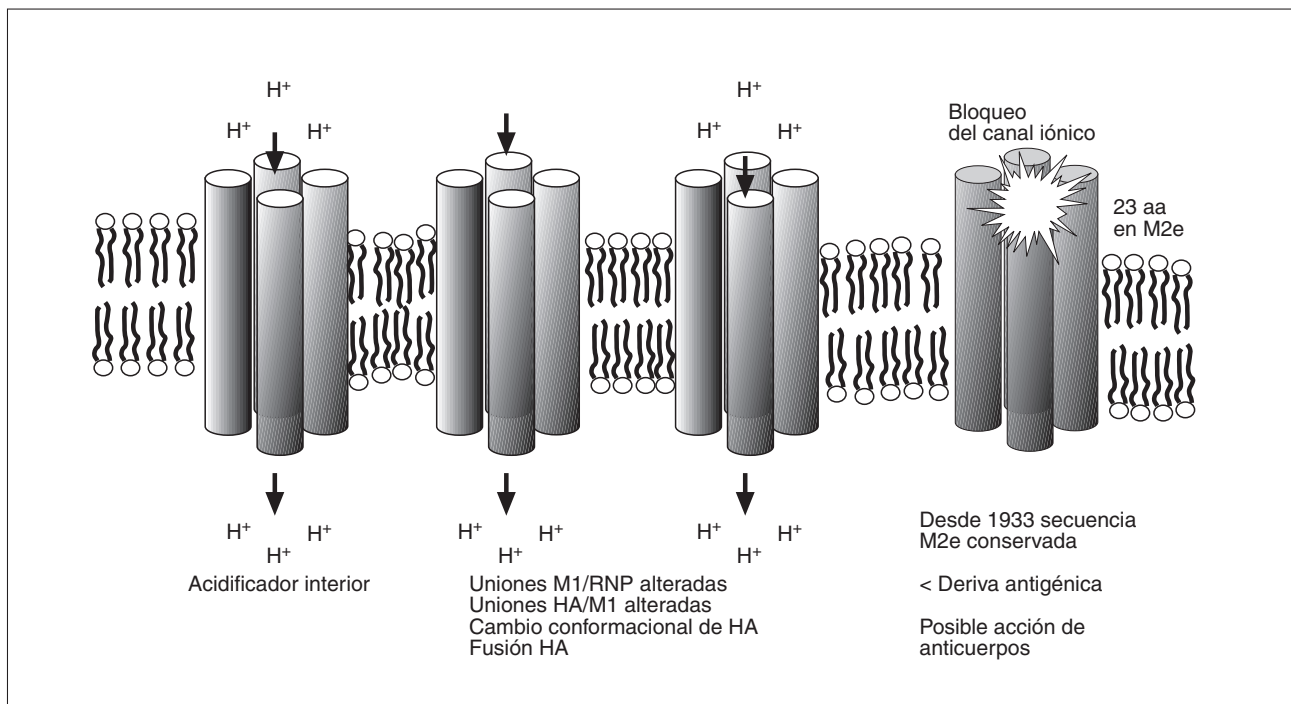


Figura 1. Canal iónico de la M2 del virus gripal.

## Nuevas vías de administración

Las vacunas antigripales que se usan comúnmente se administran mediante inyección intramuscular o subcutánea profunda en una o dos dosis dependiendo de la edad (niños) y si se trata de una primovacuna o ha habido vacunaciones anteriores<sup>9,29,30,52,53,65</sup>. Esta vía favorece la inmunización del individuo y un rápido contacto del antígeno con el sistema inmunitario, pero como se ha señalado anteriormente produce una baja respuesta celular de linfocitos T CD8 y una escasa o nula respuesta de anticuerpos IgA de naturaleza secretoria, fundamentales para evitar la infección y la difusión del virus. Por otra parte, el hecho de disponer de una vacuna inyectable hace que puedan producirse fenómenos de reacción local en el lugar de la inyección, la mayoría de las veces ligados a la pericia del sanitario, lo que puede inducir a un rechazo de la vacunación gripal en determinados grupos poblacionales (niños pequeños, personas con tratamientos anticoagulantes) por las consecuencias del pinchazo o a un rechazo genérico ante las inyecciones como modalidad de aplicación terapéutica.

En los países en vías de desarrollo el uso de agujas ha dado lugar a distintos episodios de transmisión iatrogénica de diversos microorganismos<sup>66,67</sup>. Para obviar ese grave problema, sin menoscabo de la vacunación, se han desarrollado los sistemas de inyección sin aguja o inyectores de presión<sup>10,68</sup>. Estos sistemas permiten mediante compresión del fluido, a través de un pequeñísimo orificio, producir un chorro de presión capaz de penetrar a través de la piel y el tejido subcutáneo. De forma reciente se ha desarrollado una nueva generación de inyectores con dispositivos no reutilizables, eliminando así la posibilidad de transmisión de microorganismos entre pacientes. El uso de estos inyectores mejora, en algunos casos, la inmunogenicidad debido a una dispersión y a un procesamiento distinto del antígeno cuando son administrados mediante inyección; se han descrito resultados mejores con cepas H1N1 que con cepas H3N2 o B, y aunque los resultados parecen ser prometedores este tipo de administración tiende a producir mayor reacción y dolor local en el lugar de la inyección<sup>68</sup>.

Una de las dianas que se pretende alcanzar en la vacunación gripal es disponer de una vía de administración sencilla y fácilmente aplicable fuera de un entorno estrictamente sanitario que permita su distribución a amplios y diversos grupos de población. A este respecto las vías de administración intranasal y oral son las candidatas más próximas y adecuadas<sup>5,7,10,69-78</sup>. La sencillez de la administración intranasal es de gran valor para el problema de la aceptación de la vacuna descrito anteriormente, y en segundo lugar, esta vía mimetiza más una infección natural al depositarse en el tracto respiratorio, estimulando la producción de IgA secretoria además de la inmunidad celular y humoral<sup>69-76</sup>. Esas vías de administración funcionan bien y son óptimas para vacunas vivas atenuadas con mutantes termosensibles o adaptadas al frío<sup>75,77-84</sup> y puede producir un nivel mayor de protección incluso ante cepas con variaciones antigénicas respecto a las incluidas en la vacuna<sup>77,78</sup>. Diversos estudios han demostrado la eficacia, la seguridad y la inmunogenicidad en niños y adultos, así como un descenso en la tasa de complicaciones<sup>85,86</sup>. Sin embargo, con la aplicación oral o intranasal de vacunas inactivadas la eficacia inmunizante es peor, en particular con las fabricadas con subunidades virales.

El uso de sistemas bioadhesivos de liberación intranasal de antígenos gripales pretende, mediante la ayuda de compuestos que se

pegan a las mucosas, prolongar el tiempo de contacto del antígeno en una mucosa facilitando su interacción y producir una estimulación antigénica mayor, que se ha ensayado también mediante la utilización conjunta de adyuvantes (LTK63 o LTR72) para potenciar el efecto inmune y microesferas de ácido hialurónico esterificado que forman polímeros biodegradables con propiedades mucoadherentes. Los ensayos realizados con ratones, conejos y cerdos han dado, en algunos animales, resultados que evidencian una mayor respuesta de IgA secretoria sin merma de la producción de anticuerpos circulantes neutralizantes<sup>74</sup>.

Otra forma de administración de las nuevas vacunas ADN se está ensayando mediante el sistema *gene gun* o balas genéticas, término acuñado en el mundo anglosajón para denominar un dispositivo de presión que «dispara» a través de la epidermis las formulaciones de nuevas vacunas basadas en la transferencia de plásmidos que contienen la información para la producción de antígenos gripales. Los plásmidos de ADN vehiculizados en partículas también pueden ser inyectados y sometidos a electroporación muscular<sup>64</sup>. Estos ensayos permitirán conocer mejor cómo influyen las dosis, vías de administración, sistemas de inyección en el tipo y duración de la respuesta inmunitaria y la eficacia de las nuevas vacunas basadas en la tecnología de plásmidos y ADN recombinante<sup>60-63</sup>.

## Nuevas indicaciones

La vacunación sistemática en grupos seleccionados de población es la principal medida para el control de la enfermedad gripal y para prevenir sus complicaciones<sup>1,3,5,6,9,87</sup>. La mayoría de los países del entorno europeo disponen de líneas maestras o grupos clásicos para la indicación anual de la vacuna gripal<sup>29-31,52,53,87</sup>. Estas prioridades están basadas en dos grandes enfoques: uno de ellos es el que va dirigido a partir de los 6 meses de edad a grupos de riesgo que padezcan una enfermedad subyacente que les haga correr un riesgo aumentado de complicaciones u hospitalización en caso de gripe (tabla 5). Se acepta en la mayoría de los casos la inclusión de pacientes con enfermedades crónicas, especialmente cardiovasculares y pulmonares, entre las que se incluye el asma, pero también metabólicas, renales y hemoglobinopatías<sup>30,31,52,53,87,89-93</sup>.

El otro gran bloque poblacional tributario de vacunación gripal está basado en la edad de la persona, de modo que en casi todos los países europeos se acepta la recomendación de vacunar a todas las personas mayores de 65 años<sup>87</sup>.

TABLA 5  
Indicaciones de la vacunación antigripal (I)

Adultos y niños con enfermedad crónica cardiovascular incluida asma
Adultos y niños que hayan precisado seguimiento médico u hospitalización en el año precedente por:
Enfermedades metabólicas crónicas
Disfunción renal
Hemoglobinopatías
Inmunosupresión
Residentes en instituciones cerradas con enfermos crónicos
Niños y jóvenes (< 18 años) con tratamiento prolongado de aspirina (riesgo de síndrome de Reye)

Advisory Committee on Immunization Practices 2001-2002.

Las otras líneas de indicación vacunal se dirigen a las personas ingresadas en instituciones cerradas y a todo el personal de instituciones con enfermos crónicos incluyendo también al personal en contacto cercano con estos grupos de riesgo como el personal sanitario<sup>9,50,51,52,53,88</sup>. Esta última indicación es de especial interés para unidades con enfermos críticos e inmunodeprimidos incluyendo la infección VIH<sup>94-96</sup>, en las que la estrategia de vacunación va dirigida a proteger al paciente de especial riesgo y a la formación de un entorno/barrera de personal médico y sanitario protegido (*herd immunity* o inmunidad de grupo).

Conviene llamar la atención sobre la posibilidad de extender la vacunación gripal a más grupos de población. Desde el año 2000 las indicaciones del Advisory Committee on Immunisation Practices (ACIP) americano<sup>51</sup> han recomendado la vacunación de un grupo etario adicional constituido por sujetos de más de 50-65 años, ampliando de esta manera no sólo el segmento de edad sino de forma importante y significativa el número absoluto de candidatos a vacunar (tabla 6).

Esta nueva indicación está sin duda influida por el particular sistema de asistencia sanitaria norteamericano y la doctrina de la medicina basada en la evidencia, pues en este período de la vida (50-65 años) existe una proporción considerable de personas que presentan una o más circunstancias clínicas de riesgo para el padecimiento de gripe con complicaciones<sup>52</sup>. Este grupo poblacional genera una gran demanda de asistencia sanitaria en las epidemias de gripe y se encuentra mayoritariamente en edad productiva. En nuestra experiencia, dentro del programa de vigilancia de la gripe en Castilla y León (Internet) en la temporada 1999-2000, con 96 personas con factores de riesgo o condiciones médicas candidatas de vacunación gripal, la mayor proporción de vacunados se encontraba entre los mayores de 65 años, mayor que la de los que sólo tenían un factor de riesgo clínico (el 83,3 y el 40,5%, respectivamente). Estos hechos corroboran las políticas sanitarias americanas tenidas en cuenta al adoptar la decisión sanitaria de ampliar la edad de vacunación, ya que las políticas de vacunación gripal basadas en criterios de umbral de edad tienen más éxito que las basadas en la presencia o evidencia de enfermedades crónicas que pueden no haber sido diagnosticadas previamente. En general los médicos tienden a recomendar la vacunación más en razón de la proximidad del invierno y la edad que como parte de un protocolo rutinario y de aplicación sistemática en todas las consultas de especialistas relacionados con las poblaciones de riesgo aludidas, con independencia de otras consideraciones.

Las nuevas indicaciones también incluyen a menores de 15 años con tratamientos con aspirina, para prevenir el síndrome de Reye, y gestantes que vayan a estar en el segundo o tercer trimestre de su gestación en el período epidémico para la gripe<sup>51,52,53</sup>. Esta última indicación se cimenta en los antecedentes de gravedad de la gripe exhibidos en las embarazadas durante algunas pandemias de

gripe. Se debe tener en cuenta que durante la gestación, y de forma particular en el segundo y tercer trimestre del embarazo, se produce de manera natural un aumento de la frecuencia cardíaca y del volumen sistólico junto con un aumento del gasto de oxígeno. Estos hechos, añadidos a la disminución de la capacidad pulmonar como consecuencia del volumen del feto y a los cambios experimentados en la función inmunitaria, hacen que se incremente el riesgo de complicaciones durante el embarazo, de forma que el riesgo de hospitalización asociado a gripe en estas embarazadas (estimado en 250/100.000) es comparable al de mujeres con factores de riesgo de complicaciones por gripe.

Las indicaciones de vacunación deben acompañarse de estrategias para aumentar las tasas de vacunación, pues es un problema bien conocido la baja aceptación de la vacuna en poblaciones que no se sienten concernidas por este tema; entre ellas merece un especial comentario por los factores que influyen en su aceptación el personal sanitario<sup>97</sup>.

En la actualidad, el debate de las nuevas indicaciones se dirige principalmente hacia la población sana, y es posible que las nuevas vacunas y vías de administración cambien el panorama en un futuro cercano. No debemos olvidar que cualquier individuo sano que lo desee puede vacunarse y que en determinados supuestos si los empresarios conocieran estudios de coste-efectividad referidos al absentismo laboral, facilitarían la vacunación de sus empleados<sup>20</sup>. En otro orden de cosas es conveniente la vacunación de viajeros que acudan a zonas en período epidémico<sup>98</sup>, aspecto de especial interés cuando sean personas mayores<sup>99</sup>, ya que en esa etapa de la vida se dan condiciones más proclives al turismo y viajes. Hay que considerar que el efecto protector de la vacunación gripal no se extiende indefinidamente y en algunos viajes a países de clima tropical o subtropical puede ser difícil de precisar la estación con mayor incidencia de gripe debido a la ausencia de picos anuales evidentes en países de estacionalidad acusada. Distintos trabajos han evaluado la eficacia de la vacunación gripal en estas personas con distintos regímenes posológicos<sup>81,98</sup>.

Un intenso debate en los últimos años se ha centrado en la conveniencia, la posibilidad y la estrategia de vacunación de la gripe en niños<sup>22,23,26,27,75,83</sup>, que constituyen uno de los principales grupos de riesgo si atendemos a la morbilidad<sup>28</sup>. A pesar de la creencia generalizada de que la gripe es una enfermedad que afecta a los ancianos, lo que es realmente alto en los ancianos es el exceso de mortalidad por complicaciones de gripe. Sin embargo, la infancia desempeña un papel fundamental en la diseminación del virus en la comunidad y en el entorno familiar por presentar una alta tasa de ataque con períodos prolongados de excreción del virus y títulos altos de viriones gripales en sus secreciones. Hace tiempo se demostró la elevada tasa de ataque en los estadios iniciales de la epidemia en el grupo de edad de 5 a 19 años, aumentando progresivamente el número de casos de adultos en el pico epidémico y fases tardías<sup>100</sup>. En el grupo poblacional pediátrico, aunque la mortalidad sea baja, la gripe es causa de un gran número de hospitalizaciones, especialmente en los niños más pequeños, produce una alta frecuencia de complicaciones y, por consiguiente, sobrecarga la demanda de asistencia médica y de tratamientos antimicrobianos, hechos demostrados recientemente en el seguimiento de un elevado número de pacientes<sup>26,27</sup>. El grupo en el que se postula un mayor beneficio es el de los niños menores de un año, en el que se produce un exceso de hospitalizaciones similar al de los grupos de

TABLA 6  
Indicaciones de la vacunación antigripal (II)

Personas mayores de 65 años
Personas de 50 a 65 años
Mujeres que vayan a estar en el segundo o tercer trimestre de la gestación durante la estación gripal

Advisory Committee on Immunization Practices 2001-2002.

TABLA 7  
Otras indicaciones de la vacunación antigripal

Personal sanitario, unidades críticas
Personas con infección por VIH
Candidatos a trasplante y trasplantados
Otros inmunocomprometidos
Viajeros frecuentes internacionales
Personal de servicios públicos
Deportistas, personal de instituciones deportivas
¿Niños? Gran debate

riesgo en los que se recomienda la vacunación<sup>27</sup>. Por todo ello resulta interesante valorar la posible introducción de la gripe en el calendario de vacunación, indicación que han considerado ya el ACIP, la Academia Americana de Pediatría (AAP) y la Academia Americana de Medicina de Familia (AAFP). La vacunación con vacunas vivas atenuadas de aplicación intranasal podría facilitar esta indicación, aunque se precisan más estudios a gran escala sobre su seguridad, efectos secundarios, relación coste-beneficio e impacto en la comunidad<sup>25,101,102</sup> y posibles recombinaciones de la cepa vacunal, que hasta el momento no han sido demostradas. Además, se añade la dificultad logística de implantar una nueva vacuna de administración anual en el ya complejo calendario de vacunación infantil. A pesar de todo es probable que en un futuro cercano asistamos a cambios en las indicaciones de vacunación.

Existen otras indicaciones que podrían entrar entre las indicaciones sociales. En el caso de brotes epidémicos intensos o riesgo de pandemia se hace necesario proteger a la sociedad del riesgo de colapso de las actividades y el normal funcionamiento que produce la llegada de la gripe. En este sentido parece adecuado ofertar la posibilidad de vacunación al personal de servicios públicos sensibles ante una epidemia de gripe (tabla 7).

La vacunación en países del tercer mundo y en muchas áreas tropicales no se ha planteado como un objetivo prioritario a pesar de que la gripe afecta a todo el mundo, no se conoce el impacto real de la enfermedad en esas zonas geográficas y se debe recordar que los virus gripales tienen su reservorio natural en las aves salvajes de costumbres migratorias. En el hipotético caso de conseguir con medidas profilácticas el impacto de la gripe anual no podríamos eliminar la posible emergencia de nuevos virus gripales desde su reservorio animal<sup>2,5,8,10</sup>.

## Conclusiones

La formulación y los nuevos diseños de vacunas gripales deben permitir en un futuro no lejano aumentar la eficacia y efectividad de la vacunación gripal con independencia de las características de persona o peculiaridades clínicas individuales. La investigación actual sobre vacunas de gripe permitirá disponer de una gama variada de presentaciones y formulaciones vacunales. En este contexto será necesario con la información científica disponible elaborar estrategias e indicaciones de vacunas en razón a las características individuales de cada persona o grupo de población. Es casi seguro que al tender hacia una vacunación mucho más amplia a otros grupos de población se pueda pensar en la administración combinada

de distintas formulaciones o tipos de vacuna para producir una respuesta más amplia y duradera<sup>105</sup>, así como incidir en vacunaciones complementarias como la neumocócica, de crucial interés en los ancianos<sup>104,105</sup>. Debemos contar en un futuro próximo con mecanismos de selección, elaboración, diseño y producción de vacuna gripal mucho más acordes con los sistemas modernos utilizados en vacunas de reciente aparición que permitan una gran flexibilidad ante cambios de la demanda de vacuna<sup>2,7,10,106</sup>.

Finalmente, la ampliación de nuevos grupos de población y su extensión a la población sana es un tema que mueve a la polémica con múltiples interrogantes sobre los grupos diana, el momento y el modo de realizarla, y las vacunas a utilizar que en dicho supuesto deberán satisfacer criterios estrictos de máxima seguridad y simplicidad de administración, al tener que ser empleadas en una proporción de población significativamente mayor. Las vacunas atenuadas adaptadas al frío y las inactivadas intranasales han generado grandes expectativas al respecto, pero estamos seguros de que el debate y la experimentación continuarán. Estos supuestos unidos a una mayor y más amplia respuesta frente a distintas cepas gripales del mismo subtipo de hemaglutinina persiguen un objetivo más ambicioso como puede ser la posibilidad de modificar la evolución de los brotes epidémicos anuales de gripe, algo considerado como la piedra filosofal de la vacunación gripal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999;354:1277-82.
2. Wood JM. Developing vaccines against pandemic influenza. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:1953-60.
3. Couch RB. Prevention and treatment of influenza. *N Engl J Med* 2000;343:1778-87.
4. Betts RF, Treanor JJ. Approaches to improved influenza vaccination. *Vaccine* 2000;18:1690-5.
5. Snacken R. Influenza: prevention and treatment. *Rev Med Brux* 2001;22:A258-361.
6. Couch RB. Influenza: prospects for control. *Ann Intern Med* 2000;135:992-8.
7. Subbarao K. Influenza vaccines: present and future. *Adv Virus Res* 1999;54:349-73.
8. Hay AJ, Gregory A, Douglas AR, Lin YP. The evolution of human influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:1861-70.
9. Anónimo. Influenza: basic epidemiological aspects for the development of vaccines. *Epidemiol Bull/PAHO* 2001;22:11-3.
10. Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Influenza vaccines: new developments. *Current Opinion in Pharmacology* 2001;1:491-6.
11. Glathe H, Bigl S, Grosche A. Comparison of humoral immune responses to trivalent influenza split vaccine in young, middle-aged and elderly people. *Vaccine* 1993;11:702-5.
12. Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Levandosky RA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. A meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1995;123:518-27.
13. Van Hoecke Ch, Prikazsky V, Utö I, Menschikowski C. Immunogenicity of an inactivated split influenza vaccine in institutionalized elderly patients. *Gerontology* 1996;42:190-8.
14. Glück R, Wegmann A. Influenza vaccination in the elderly. *Develop Comp Immunol* 1997;21:501-7.
15. Smith DJ, Forrest S, Ackely DH, Perelson AS. Variable efficacy of repeated annual influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14001-6.
16. Beyer WE, De Buijn IA, Palache AM, Westendorp RG, Osterhaus AD. The plea against annual influenza vaccination? «The Hoskins' Paradox» revisited. *Vaccine* 1998;16:1929-32.
17. Nicholson KG, Nguyen-Van-Tam JS, Ahmed AH, Wiselka MJ, Leese J, Ayres J, et al. Randomised placebo-controlled crossover trial on effect of inactivated influenza vaccine on pulmonary function in asthma. *Lancet* 1998;351:326-31.
18. Gomolin IH, Kathpalia RK. Influenza. How to prevent and control nursing home outbreaks. *Geriatrics* 2002;57:28-30.
19. Poehling KA, Edwards KM. Prevention, diagnosis, and treatment of influenza: current and future options. *Curr Opin Pediatr* 2001;13:60-4.

20. Kramarz P, DeStefano F, Gargiullo PM, Davis RL, Chen RT, Mullooly JP, et al. Influenza vaccination in children with asthma in Health Maintenance Organizations. *Vaccine* 2000;18:2288-94.
21. Treanor JJ, Kotloff K, Betts RF, Belshe R, Newman F, Iacuzio D, et al. Evaluation of trivalent, live, cold-adapted (CAIV-T) and inactivated (TIV) influenza vaccines in prevention of virus infection and illness following challenge of adults with wild-type influenza A (H1N1), A (H3N2), and B viruses. *Vaccine* 2000;18:99-104.
22. Glezen P. Influenza vaccination for healthy children. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:283-7.
23. Neuzil KM, Dupont WD, Wright PF, Edwards KM. Efficacy of inactivated and cold-adapted vaccines against influenza A infection, 1985 to 1990: the pediatric experience. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:733-40.
24. Bernstein E, Kaye D, Abrutyn E, Gross P, Dorfman M, Murasko DM. Immune response to influenza vaccination in large healthy elderly population. *Vaccine* 1999;17:82-94.
25. Reichert TA, Sugaya N, Fedson N, Glezen WP, Simonsen L, Tashiro M. The Japanese experience with vaccinating schoolchildren against influenza. *N Engl J Med* 2001;344:889-96.
26. Izurieta HS, Thompson WW, Kramarz P, Shay DK, Davis, RL, DeStefano F, et al. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *N Engl J Med* 2000;342:252-9.
27. Neuzil KM, Mellen BG, Wright PF, Mitchel EF, Griffin MR. The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *N Engl J Med* 2000;342:225-31.
28. Monto AS, Sullivan KM. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect* 1993;110:145-60.
29. Monto AS. The clinical efficacy of influenza vaccination. *Pharmacoeconomics* 1996;9(Suppl 3):16-22.
30. Anónimo. Influenza vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;75:281-8.
31. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2000;49:1-38.
32. Bouveret Le Cann NN, Ronco J, Francon A, Blondeau C, Fanget B. Adjuvants for influenza vaccine. *Res Immunol* 1998;149:19-23.
33. Dooley M, Goa KL. Adjuvanted influenza vaccine. *Biodrugs* 2000;14:61-9.
34. Nicholson KG, Colegate AE, Podda A, Stephenson I, Wood J, Ypma, et al. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet* 2001;357:1937-43.
35. Minutello M, Senatore F, Cecchinelli G, Bianchi M, Andreani T, Podda A, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated subunit influenza virus vaccine combined with MF59 adjuvant emulsion in elderly subjects, immunized for three consecutive influenza seasons. *Vaccine* 1999;17:99-104.
36. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* 2001;19:2673-80.
37. Menegon T, Baldo V, Bonello C, Dalla Costa D, Di Tommaso A, Trivello R. Influenza vaccines: antibody responses to split virus and MF59-adjuvanted subunit virus in an adult population. *Eur J Epidemiol* 1999;15:573-6.
38. De Donato S, Granoff D, Minutello M, Lecchi G, Faccini M, Agnello M, et al. Safety and immunogenicity of MF59-adjuvanted influenza vaccine in the elderly. *Vaccine* 1999;17:3094-101.
39. Baldo V, Menegon T, Bonello C, Florean A, Trivello R, and the «Mariutto» Collaborative Group. Comparison of three different influenza vaccines in institutionalized elderly. *Vaccine* 2001;19:3472-5.
40. Barackman JD, Ott G, Pine S, O'Hagan DT. Oral administration of influenza vaccine in combination with the adjuvants LT-K65 and LT-R72 induces potent immune responses comparable to or stronger than traditional intramuscular immunization. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:652-7.
41. Muszkat M, Ben Yehuda A, Schein MH, Friedlander Y, Naveh P, Greenbaum E, et al. Local and systemic immune response in community-dwelling elderly after intranasal or intramuscular immunization with inactivated influenza vaccine. *J Med Virol* 2000;61:100-6.
42. Van Slooten ML, Hayon I, Babai I, Zakay-Rones Z, Wagner E, Storm G, et al. Immunoadjuvant activity of interferon- $\gamma$  liposomes co-administered with influenza vaccines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1531:99-110.
43. Babai I, Barenholz Y, Zakay-Rones Z, Greenbaum E, Samira S, Hayon I, et al. A novel liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) containing hemagglutinin-neuraminidase and IL-2 or GM-CSF induces protective anti-neuraminidase antibodies cross-reacting with a wide spectrum of influenza A viral strains. *Vaccine* 2000;20:505-15.
44. Ortiz de Lejarazu R, Pérez T, Castrodeza J, Bratos MA, Rodríguez Torres A. Haemagglutination-inhibiting antibody responses after trivalent influenza vaccination in old people. 7th International Congress of Virology. Edmonton, Canada, 1987; p. 95.
45. Glück R. Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza viroosomes (IRIVs). *Vaccine* 1999;17:1782-7.
46. Guy B, Pascal N, Francon A, Bonnin A, Giménez S, Lafay-Vialon E, et al. Design, characterization and preclinical efficacy of a cationic lipid adjuvant for influenza split vaccine. *Vaccine* 2001;19:1794-805.
47. Plante M, Jones T, Allard F, Torossian K, Gauthier J, St-Félix N, et al. Nasal immunization with proteosome influenza vaccines induces serum HAI, mucosal IgA and protection against influenza challenge. *Vaccine* 2002;20:218-25.
48. Gelder CM, Lambkin R, Hart KW, Fleming D, Williams OM, Bunce M, et al. Associations between human leukocyte antigens and nonresponsiveness to influenza vaccine. *J Infect Dis* 2002;185:114-7.
49. Voeten JTM, Rimmelzwaan GF, Nieuwkoop NJ, Lövgren-Bengtsson K, Osterhaus ADME. Introduction of the haemagglutinin transmembrane region in the influenza matrix protein facilitates its incorporation into ISCOM and allows the activation of specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocytes. *Vaccine* 2000;19:514-22.
50. Rimmelzwaan GF, Nieuwkoop NJ, Branderburg A, Sutter G, Bayer WEP, Mahler D, et al. A randomised, double blind study to compare the cell mediated and humoral immunogenicity of two influenza ISCOM vaccines with a conventional inactivated split virion vaccine in young healthy adults. *Vaccine* 2000;19:1180-7.
51. Neuzil KM, Griffin MR, Schaffner W. Influenza vaccine: issues and opportunities. *Infect Dis Clin North Am* 2001;15:123-41.
52. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2001;50:1-46.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2002;51:1-31.
54. Brands R, Visser J, Medema J, Palache AM, Scharrenburg GJM. Influvac<sup>®</sup>: a safe Madin Darby canine kidney (MDCK) cell culture-based influenza vaccine. En: Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM, editors. Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture. *Dev Biol Stand* 98, Basel: Karger, 1999; p. 93-100.
55. Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Eder G, et al. Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. En: Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM, et al, editors. Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture. *Dev Biol Stand* 98, Basel: Karger, 1999; p. 101-10.
56. Schild GC, Oxford JS, De Joong JC, Webster RG. Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature* 1983;303:706-9.
57. Wood JM, Dunleavy U, Newman RW, Riley AM, Robertson JS, Minor PD. The influence of the host cell on standardisation of influenza vaccine potency. En: Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM, editors. Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture. *Dev Biol Stand* 98, Basel: Karger, 1999; p. 183-8.
58. Halperin SA, Nestruck AC, Eastwood BJ. Safety and immunogenicity of a new influenza vaccine grown in mammalian cell culture. *Vaccine* 1998;16:1351-5.
59. Palache AM, Scheepers HSJ, De Regat V, Van Ewijk P, Baljet M, Brands R, et al. Safety, reactivity and immunogenicity of Madin Darby canine kidney cell-derived inactivated influenza subunit vaccine. A meta-analysis of clinical studies. En: Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM, editors. Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture. *Dev Biol Stand* 98, Basel: Karger, 1999; p. 115-25.
60. Watanabe T, Watanabe S, Neumann G, Kida H, Kawaoka Y. Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J Virol* 2002;76:767-73.
61. Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 1993;11:957-60.
62. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application and optimisation. *Annu Rev Immunol* 2000;18:927-74.
63. Fiers W, Neiryck S, Deroo T, Saelens X, Jou WM. Soluble recombinant influenza vaccines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:1961-3.
64. Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Sata T, Kurata T, et al. Protection against influenza B virus infection by immunization with DNA vaccines. *Vaccine* 2001;19:1446-55.
65. Palache AM. Influenza vaccine: a reappraisal of their use. *Drugs* 1997;54:841-56.
66. CDC. Injection Safety Campaigns. Disponible en: <http://www.cdc.gov/nip/dev/jetinjetc.htm#?injectionsafety>
67. Simonsen L, Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Kane M. Unsafe injections in the developing world and transmission of blood borne pathogens: a review. *Bull World Health Organ* 1999;77:789-800.
68. Jackson LA, Austin G, Chen RT, Stout R, DeStefano F, Gorse GJ, et al. Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors. *Vaccine* 2001;19:4703-9.

69. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 1987;7:265-76.
70. Lowell GH. Proteosomes for improved nasal, oral or injectable vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, editors. *New generation vaccines*. 2.ª ed. New York: Marcel Dekker, 1997; p. 193-206.
71. Potter CW, Jennings R. Intranasal immunization with inactivated influenza vaccine. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 1999;2:402-8.
72. Kiderman A, Furst A, Stewart B, Greenbaum E, Morag A, Zakay-Rones Z. A double-blind trial of a new inactivated, trivalent, intranasal anti-influenza vaccine in general practice: relationship between immunogenicity and respiratory morbidity over the winter of 1997-1998. *J Clin Virol* 2001;20:155-61.
73. Boyce TG, Hsu HH, Sanella EC, Coleman-Dockery SD, Baylis E, Zhu Y, et al. Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults. *Vaccine* 2001;19:217-26.
74. Singh M, Briones M, O'Hagan DT. A novel bioadhesive intranasal delivery system for inactivated influenza vaccines. *J Controlled Release* 2001;70:267-76.
75. Zangwill KM, Droge J, Mendelman P, Marcy SM, Partridge S, Chiu CY, et al. Prospective, randomised, placebo-controlled evaluation of the safety and immunogenicity of three lots of intranasal trivalent influenza vaccine among young children. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:731-2.
76. Lu X, Clements JD, Katz JM. Mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT [R192G]) enhances protective humoral and cellular immune responses to orally administered inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 2002;20:1019-29.
77. Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, King J, Gruner WC, Piedra P, et al. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. *N Engl J Med* 1998;338:1405-12.
78. Belshe RB, Gruber WC, Mendelman PM, Cho I, Resinger K, Block SL, et al. Efficacy of vaccination with live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine against a variant (A/Sydney) not contained in the vaccine. *J Pediatr* 2000;136:168-75.
79. Boyce TG, Poland GA. Promises and challenges of live-attenuated intranasal influenza vaccines across the age spectrum: a review. *Biomed Pharmacother* 2000;54:210-8.
80. Kino Y. Influenza live attenuated vaccine. *Nippon Rinsho* 2000;58:2507-12.
81. Keitel WA, Cate TR, Nino D, Huggins LL, Six HR, Quarles JM, et al. Immunization against influenza: Comparison of various topical and parenteral regimens containing inactivated and/or live attenuated vaccines in healthy adults. *J Infect Dis* 2001;183:329-32.
82. King JC, Fast PE, Zangwill KM, Weinberg GA, Wolff M, Yan L, et al. Safety, vaccine virus shedding and immunogenicity of trivalent, cold-adapted, live attenuated influenza vaccine administered to human immunodeficiency virus-infected and noninfected children. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1124-31.
83. Nichol KL. Live attenuated influenza virus vaccines: new options for the prevention of influenza. *Vaccine* 2001;19:4373-7.
84. Longini IM Jr, Halloran ME, Nizam A, Wolff M, Mendelman PM, Fast PE, et al. Estimation of the efficacy of live, attenuated influenza vaccine from a two-year, multi-center vaccine trial: implications for influenza epidemic control. *Vaccine* 2000;18:1902-9.
85. Edwards KM, Dupont WD, Westrich MK, Plummer WD Jr, Palmer PS, Wright PF. A randomized controlled trial of cold-adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease. *J Infect Dis* 1994;169:68-76.
86. Nichol KL, Mendelman PM, Mallon KP, Jackson LA, Gorse GJ, Belshe RB, et al. Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999;282:137-44.
87. Rodríguez Torres A, Castrodeza J, Ortiz de Lejarazu R. Vacuna antigripal. En: Salleras San Martí LI, editors. *Vacunaciones preventivas. Principios y aplicaciones*. Barcelona: Masson, 1998; p. 229-57.
88. Potter J, Stott DJ, Roberts MA, Elder AG, O'Donnell B, Knigh PV, et al. Influenza in long-term-care hospitals reduces the mortality of elderly patients. *J Infect Dis* 1997;175:1-6.
89. American Diabetes Association. Immunization and the prevention of influenza and pneumococcal disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 2001;24(Suppl 1):S99-100.
90. El-Madhun AS, Cox RJ, Seime A, Søvik O, Haaheim LR. Systemic and local immune responses after parenteral influenza vaccination in juvenile diabetic patients and healthy controls: results from a pilot study. *Vaccine* 1998;16:156-60.
91. Nicholson KG, Nguyen-van-Tam JS, Ahmed AH, Wiselka MJ, Leese J, Ayres J, et al. Randomised placebo-controlled crossover trial on effect of inactivated influenza vaccine on pulmonary function in asthma. *Lancet* 1998;351:326-31.
92. Burbach G, Bienle U, Stark K, Rayes N, Neuhaus R, Serke S, et al. Influenza vaccination in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999;67:753-70.
93. Brydak LB, Calbecka M. Immunogenicity of influenza vaccine in patients with hemato-oncological disorders. *Leuk Lymph* 1999;32:369-74.
94. Kroon FP, Rimmelzwaan F, Roos MTL, Osterhaus ADME, Hamman D, Miedema F, et al. Restored humoral immune response to influenza vaccination in HIV-infected adults Treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1998;12:F217-25.
95. Lin JC, Nichol KL. Excess mortality due to pneumonia or influenza during influenza seasons among persons with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 2001;161:441-6.
96. Gutiérrez F, Maestre A, Ramos JM, Masià M, Escolano C, Hidalgo AM. Vacuna antigripal en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana con inmunodepresión grave. Efecto sobre los linfocitos CD4 y sobre la carga viral plasmática. *Med Clin (Barc)* 2001;117:410-2.
97. Doebbeling BN, Edmond MB, Davis CS, Woodin JR, Zeitler RR. Influenza vaccination of health care workers: evaluation of factors that are important in acceptance. *Prev Med* 1997;26:68-77.
98. Jong EC. Travel immunizations. *Med Clin North Am* 1999;83:903-22.
99. Buxton JA, Skowronsky DM, Helen NG, Marion SA, Li Y, King A, et al. Influenza revaccination of elderly travelers: antibody response to single influenza vaccination and revaccination at 12 weeks. *J Infect Dis* 2001;184:188-91.
100. Glezen WP, Couch RB. Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-76. *N Engl J Med* 1978;298:587-92.
101. Pfliegerer M, Löwer J, Kurth R. Cold-attenuated live influenza vaccines, a risk-benefit assessment. *Vaccine* 2002;20:886-94.
102. Muennig PA, Khan K. Cost-effectiveness of vaccination versus treatment of influenza in healthy adolescents and adults. *Clin Infect Dis* 2001;33:1879-85.
103. Stepanova L, Naykhin A, Kolmskog C, Jonson G, Barantceva I, Bichurina M, et al. The humoral response to live and inactivated influenza vaccines administered alone and in combination to young adults and elderly. *J Clin Virol* 2002;24:193-201.
104. Nikolaus T, Baethe M. Influenza, pneumococci, tetanus: the most important vaccinations in old age. *MMW Fortschr Med* 2001;143:39-41.
105. Christenson B, Lundbergh P, Hedlund J, Orqvist A. Effects of a large-scale intervention with influenza and 23-valent pneumococcal vaccines in adults aged 65 years or older: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1008-11.
106. Hossain MJ, Mori I, Dong L, Kimura Y. Egg-adapted replication-restricted virus protects mice against lethal influenza. *Vaccine* 2002;18:3082-90.