

*Rev Biomed 2005; 16:45-53.*

## ***Influenza y vacunación.***

**Revisión**

Alexander Piñón- Ramos\*, Suset Oropesa-Fernández, Carlos Aragonés-López, Belkis Galindo, Belsy Acosta-Herrera, Bárbara Hernández-Espinosa.

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. La Habana, Cuba.

### **RESUMEN.**

El virus Influenza fue el responsable de la mayor pandemia registrada en la humanidad hasta la emergencia del virus causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Una medida histórica del potencial letal de los virus Influenza, es que murieron más personas en la pandemia de 1918-19 que en la Primera Guerra Mundial. La Influenza es una infección respiratoria aguda causada por los virus Influenza A o B. El periodo de incubación varía de uno a cuatro días. El pico de excreción viral ocurre aproximadamente entre 1 y 3 días después del inicio de los síntomas. El cuadro típico de Influenza incluye aparición abrupta de fiebre y síntomas respiratorios como tos (frecuentemente no productiva), dolor de garganta, y coriza, así como también síntomas sistémicos, tales como dolor de cabeza, dolores musculares, y fatiga. La severidad clínica de la infección puede ir desde una enfermedad asintomática, hasta neumonía viral primaria y la muerte. Los síntomas agudos duran alrededor de 2 a 4 días aunque el malestar y la tos pueden continuar por alrededor de dos semanas. Las complicaciones por Influenza incluyen neumonía secundaria bacteriana y exacerbación de marcadas condiciones

crónicas de salud.

La mejor vía en la prevención de la infección por los virus Influenza es la vacunación, la cual funciona por la exposición del sistema inmune a cepas inactivadas del virus que no pueden provocar enfermedad. Se ha recomendado la vacunación anual contra Influenza en personas de alto riesgo de sufrir complicaciones relacionadas a la enfermedad y también en sus contactos más cercanos. Cada año la vacunación anti-Influenza salva miles de vidas. La Organización Mundial de la Salud recomienda fuertemente la vacunación contra Influenza para aquellas personas que están en riesgo de contraer la infección por el virus Influenza. Esta es la medida más efectiva de reducir el impacto de la Influenza en la comunidad.

En Cuba, la influenza es la quinta causa de muerte, junto a la neumonía. En nuestro país se lleva a cabo la vacunación de grupos de riesgo. Con el objetivo de conocer aspectos relacionados a las vacunas anti-Influenza se realizó el presente trabajo.

*(Rev Biomed 2005; 16:45-53)*

**Palabras clave:** influenza, vacunación, Cuba.

\* Solicitud de sobretiros: Alexander Piñón- Ramos, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Carretera Novia del Mediodía, Km 6 ½, La Lisa. La Habana. Cuba. E-mail: alexpr@ipk.sld.cu  
Recibido el 28/Julio/2004. Aceptado para publicación el 7/Enero/2005.

Este artículo está disponible en <http://www.uady.mx/sitios/biomedic/revbiomed/pdf/rb051615.pdf>

**SUMMARY.****Influenza and vaccination.**

Until the advent of AIDS, influenza was the last uncontrolled pandemic killer of humans. One historic measure the potential lethality of influenza is that more people died in the 1918-19 pandemic than in World War I.

Influenza type A and B viruses are responsible for widespread illness in people. Influenza is an acute respiratory disease caused by Influenza type A or B viruses. The incubation period ranges from 1-4 days. Peak virus shedding usually occurs from 1 day to 3 days after. Typical features of Influenza include abrupt onset of fever and respiratory symptoms such as cough (usually nonproductive), sore throat, and coryza, as well as systemic symptoms such as headache, muscle aches, and fatigue. The clinical severity of infection can range from asymptomatic illness to primary viral pneumonia and death. Acute symptoms generally last 2-4 days although malaise and cough may continue for up to 2 weeks. Complications of Influenza include secondary bacterial pneumonia and exacerbation of underlying chronic health conditions.

The best way to prevent influenza infection is vaccination. Vaccination works by exposing our immune systems to an inactivated strain of the virus that cannot cause disease. Annual vaccination against Influenza is recommended for people at high risk for Influenza-associated complications and their close contacts. Each year influenza vaccinations save thousands of lives and much suffering. The World Health Organization (WHO) strongly recommends the influenza vaccination for those at risk from influenza infection. This is the most effective means of reducing the impact of Influenza.

In Cuba, Influenza and pneumonia are the fifth cause of death. In our country we vaccinate people in high risk groups. With the objective of determining aspects about Influenza vaccines we carried out the present study. (*Rev Biomed* 2005; 16:45-53)

**Key words:** influenza, vaccination, Cuba.

**Inmunidad.**

Gran parte de lo que se conoce acerca de la inmunología de Influenza está descrito en excelentes publicaciones (1). El marcador principal para la resistencia y la recuperación de la enfermedad por el virus Influenza son los anticuerpos, los cuales son de especificidad complementaria a los antígenos hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) del virus. Los anticuerpos anti-HA restringen al virus por neutralización de la infectividad y los anticuerpos anti-NA restringen la diseminación del virus, interfiriendo el paso de liberación de las nuevas partículas de las células infectadas. La pérdida de anticuerpos complementarios, por consecuencias naturales o por la acumulación de pequeños cambios antigénicos, pueden disminuir la inmunidad humoral.

La inmunidad mediada por células (1, 2) dirigida contra el virus Influenza en el hombre está menos definida que la inmunidad humoral. Está basada en la respuesta de las células T CD8+ (MHC-I), la cual aparece dentro de los primeros 3 a 4 días después de la infección. Las células T CD8+ citotóxicas detectan y lisan las células hospederas infectadas por el virus y su especificidad pudiera estar dirigida contra epítopes de la HA, NP, M y PB2, que son altamente conservados con respecto a aquellos relacionados con la inmunidad humoral. Las células T CD4+ (MHC-II) son de importancia en facilitar ambas respuestas, la humoral y la celular y, además, ellas pueden ejercer los efectos citolíticos, aunque menos efectivos que las células CD8+ citotóxicas.

Hay activación inicial de la inmunidad innata, producto del reconocimiento de la configuración de los componentes virales, los cuales provocan la liberación temprana de interleuquina 6 (IL6) e interferón alfa (INF $\alpha$ ) desde las células epiteliales (3). La estimulación de las células asesinas naturales (AN) es de gran importancia en la respuesta inmune primaria. La habilidad de la proteína viral NS1 de inhibir la actividad antiviral del interferón, atenta contra el papel esencial de esta citoquina, la cual regula, incrementando normalmente, la presentación de fragmentos de antígenos, en el contexto de las moléculas MHC, por parte de las células

presentadoras de antígeno (CPA).

La infección por los virus Influenza, causa una depresión temporal de las células inmunes, por una hipersensibilidad retardada, a través de la reducción de la blastogénesis y probablemente también a través de una infección abortiva de los linfocitos (4, 5). Esta inmunosupresión puede jugar un papel importante en la reducción de la resistencia contra las bacterias oportunistas, como ocurre en el sarampión y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (6).

En resumen, es evidente que ambos tipos de inmunidad, la humoral y la celular, juegan importantes papeles en el control de la infección por los virus Influenza. Los anticuerpos reducen la carga viral y restringen la re-infección. Las células T citotóxicas destruyen a las células infectadas y pueden llevar a la supresión de citoquinas.

### **Prevención y tratamiento de Influenza.**

#### **Quimioprofilaxis.**

Está claro que el medio más efectivo para prevenir una pandemia por los virus Influenza no son las vacunas, debido fundamentalmente al corto período de tiempo que hay entre la detección de la cepa y la selección y la cantidad de producto vacunal necesitado. Para esto serán necesarias vacunas que sean capaces de proteger contra todos los subtipos. Ejemplo de esto, son las prometedoras vacunas de ADN que expresan antígenos conservados del núcleo o las vacunas que dirigen su acción contra el antígeno del canal M2, el cual es altamente conservado desde el punto de vista antigénico, pero hasta que estas vacunas no sean realidad, son necesarias otras medidas (7-9).

Una alternativa hoy en día, es el uso de medicamentos antivirales, los cuales han mostrado ser prometedores por su amplio espectro en el control de la infección por los virus Influenza. En estos momentos existen cuatro sustancias quimioterapéuticas diferentes (4). Dos de ellas bloquean la proteína viral M2 que constituye un canal iónico y son la Amantadina y la Rimantadina. Ambos medicamentos pueden ser muy eficientes en el tratamiento de la infección por los virus Influenza A, pero no dejan de tener efectos secundarios sobre el sistema nervioso central, el

hígado y los riñones y puede emerger la resistencia a los medicamentos. Los otros dos medicamentos más utilizados son el Zanamivir y el Oseltamivir, los cuales bloquean la acción de la neuraminidasa para evitar la liberación de las nuevas partículas virales formadas en las células infectadas y su posterior diseminación dentro del hospedero. Se conoce mucho menos acerca de la eficacia y seguridad de los inhibidores de la neuraminidasa que de las Amantadinas. Estos cuatro medicamentos no son el final de la quimioterapia en Influenza, pero sirven como modelo en la búsqueda de nuevos medicamentos (4, 10, 11).

La Amantadina y la Rimantadina inhiben el crecimiento de los virus Influenza A, no son efectivas contra los virus Influenza B. Su mecanismo consiste en bloquear el canal iónico que está formado por la proteína M2. Durante los pasos iniciales del ciclo replicativo, el virus es introducido en vesículas endocíticas, en las cuales el pH disminuye al penetrar los iones hidrógeno. Dichos iones pasan a través del canal M2 hacia el intersticio de la partícula viral y promueven la disociación de la proteína M1 del complejo ribonucleoproteico, de manera tal que la ribonucleoproteína pueda entrar en el núcleo celular e iniciar su replicación. Ambos medicamentos penetran en el canal iónico y bloquean la entrada de los iones hidrógeno que son necesarios para que se produzca la disociación de M1 y de la ribonucleoproteína (12, 13).

El Zanamivir y el Oseltamivir poseen mecanismos similares para inhibir el crecimiento de los virus Influenza A y B. Ambos son inhibidores de la NA y son análogos del ácido N-acetilneuramínico (receptor para los virus Influenza en la superficie celular). El ácido N-acetilneuramínico es un componente de mucoproteínas en las secreciones respiratorias, el virus se une al moco, pero la elusión causada por la actividad de la NA permite al virus penetrar hasta la superficie celular. La inhibición de la NA previene la infección. La NA también es necesaria en la óptima liberación del virus de las células infectadas, una acción que incrementa la diseminación del mismo y la intensidad de la infección. La inhibición de la NA disminuye la probabilidad de que pueda ocurrir la enfermedad y

*A Piñón- Ramos, S Oropesa-Fernández, C Aragonés-López, B Galindo, B Acosta-Herrera, y col.*

reduce la severidad de la enfermedad que está en desarrollo (4).

La extensión de numerosas herramientas para el control de los virus Influenza, ofrece grandes oportunidades para una reducción sustancial en el impacto de esta infección. La vacunación y el uso óptimo de antivirales pueden contribuir de manera importante a la reducción de las hospitalizaciones y los fallecimientos atribuibles a la infección por los virus Influenza.

### **Vacunas.**

#### **Vacunación y Grupos de riesgo.**

La vacunación de personas en alto riesgo antes del comienzo de cada temporada de influenza, se ha convertido en la medida más efectiva para reducir el impacto de la infección por el virus influenza (14).

La inmunización contra influenza debe realizarse anualmente. Las continuas derivas antigénicas o drift de los virus influenza, hacen que la nueva vacuna sea actualizada anualmente con las cepas que más circulan en ese momento, lo cual se hace necesario para protegerse contra nuevas infecciones.

Las respuestas humoral y celular juegan un papel importante en la inmunidad contra el virus influenza. Dicha inmunidad decae alrededor de un año después de la vacunación. La respuesta de los anticuerpos y su persistencia dependen de numerosos factores, incluyendo la edad, exposición previa y subsiguiente a los antígenos, presencia de estados de inmunodeficiencia y polimorfismo en las moléculas de antígenos leucocitarios humanos clase II (HLA). Los niveles de anticuerpos humorales, los cuales están correlacionados con la protección debido a la vacuna, son producidos generalmente dos semanas después de la administración del preparado vacunal. Sin embargo, los niveles de anticuerpos caen por debajo de los umbrales protectores en menos de cuatro meses para el caso de los ancianos. No hay datos disponibles que avalen la administración de segundas dosis de la vacuna en ancianos persiguiendo levantar la inmunidad (15).

Para reducir la morbilidad y la mortalidad asociada a la infección por el virus influenza y el impacto

de la enfermedad en nuestras comunidades, los programas de inmunización deben dirigirse fundamentalmente hacia aquellas personas en elevado riesgo de complicarse debido a la infección, aquellas personas que pueden transmitir el virus a las personas en alto riesgo y hacia aquellas personas que brindan servicios esenciales a la comunidad. Sin embargo, los costos sociales y la significativa morbilidad, están asociados también con la enfermedad causada por estos virus en las temporadas interpandémicas y las complicaciones que ocurren en adultos y niños sanos (14, 16).

#### **Vacunas antigripales.**

Las primeras vacunas antigripales, que se empezaron a utilizar a finales de los años 40, eran suspensiones poco purificadas de virus, por lo que eran muy reactivas. Desde 1960, con la introducción de la centrifugación zonal con gradiente de sacarosa y otros métodos, como la adsorción-elusión sobre hemáties, se pueden obtener vacunas purificadas (exentas de ovoalbúmina y endotoxinas), menos reactógenas y más eficaces. Las vacunas actuales, fabricadas a partir de cultivos en embrión de pollo, son inmunógenas, bien toleradas y con un buen perfil de seguridad. La potencia inmunógena de las vacunas antigripales se expresa en microgramos de la hemaglutinina presente y se mide por inmunodifusión radial. Las normas internacionales establecen actualmente que la vacuna debe contener una concentración mínima de 15 µg de hemaglutinina de cada una de las cepas incluidas en ella. Están inactivadas con formol o  $\beta$ -propiolactona. Como conservante se utiliza habitualmente el timerosal. Desde 1981, la vacuna es trivalente, con dos cepas (subtipos H3N2 y H1N1) dentro del tipo A y una del tipo B (5).

#### **Historia de las vacunas anti-Influenza.**

El desarrollo significativo de las vacunas anti-Influenza se lleva a cabo entre los años 30 y 40. La evolución de las vacunas vivas y muertas contra los virus Influenza en el hombre se convirtió en una realidad cuando se aisló al virus por primera vez en el año

1933. Esto abrió la posibilidad para la producción de una vacuna contra la enfermedad, demostrando la multiplicación del virus en embrión de pollo y la inducción de anticuerpos neutralizantes, después de una inyección subcutánea en humanos, que desarrollaron un pico máximo de anticuerpos a las dos semanas, persistiendo por 6 meses o más (17, 18).

Posteriormente se demostró la inducción de protección, en niños inoculados por vía intramuscular. Los resultados de experimentos sucesivos, definían la necesidad de buscar una vacuna más potente y una adecuada selección de las cepas. Es por eso que en 1942, se realiza una investigación acerca de la eficacia de la vacuna en cuanto a la respuesta inmune humoral, la misma fue concentrada por centrifugación a alta velocidad, demostrándose un aumento en el título de anticuerpos. En este mismo año comienzan una serie de ensayos clínicos utilizando virus concentrados e inactivados de Influenza A y B (19, 20).

En 1945 quedó registrada la primera vacuna efectiva contra la influenza. Fue una preparación cruda del virus de Influenza multiplicado en embrión de pollo, se reportaron en su aplicación reacciones adversas, tanto locales como sistémicas.

Se inicia ya el obligado proceso de selección anual de las cepas que circulan a nivel mundial, para la confección de la vacuna de cada temporada y al mejoramiento tecnológico de su producción, que trae aparejado una mejor calidad (eliminar la pirogenicidad y reacciones sistémicas de la primera vacuna).

A partir del líquido alantoideo, utilizando diferentes métodos de centrifugación, tratamiento con detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), tritón N10, tritón X 100, y otros solventes como el tri 8 n-butil fosfato, con iguales funciones, se obtuvieron mejores resultados y surgen así las vacunas fraccionadas. Actualmente existen otros sistemas alternativos de multiplicación viral como células Vero, BHK-21 y MDCK, en los que se logran títulos virales altos en periodos de tiempo muy cortos (21, 22).

A partir del criterio de que los principales antígenos para producir una respuesta protectora son las glicoproteínas de superficie viral HA y NA, a

mediado de los 70, surgen las vacunas de antígenos de superficie, lográndose una mejor purificación y como resultado menos reacciones adversas (23-26).

Desde 1977, los virus de Influenza A(H1N1), A(H3N2) y tipo B están circulando en todo el mundo. La constante aparición de nuevas variantes antigénicas debido a los cambios antigénicos menores en estos virus, es la razón por la cual es importante el estudio de cada estación epidémica y la justificación para la incorporación de una o más cepas nuevas en la vacuna de cada año (18, 27, 28).

### **Inmunidad conferida por la vacunación.**

Las proteínas HA y NA son los primeros blancos de la respuesta de anticuerpos protectores. Los anticuerpo anti-HA son capaces de neutralizar la infectividad del virus, mientras que los anticuerpos anti-NA pueden actuar modificando la severidad de la enfermedad. Las vacunas anti-Influenza levantan una respuesta inmune específica de cepa anti-HA. Los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación presentes en el suero es la medición más relacionada con la protección; la susceptibilidad a la infección es inversamente proporcional a esos títulos, y los títulos post-vacunación de alrededor de 1:40 en el suero representan el nivel de anticuerpos con el cual cerca del 50% de la población será protegida (47, 48).

Las vacunas inactivadas son seguras e inmunogénicas e inducen inmunidad en alrededor del 60-90% de los niños y adultos vacunados. Sin embargo, la inmunogenicidad es generalmente baja en los ancianos. Los rangos de la eficacia de la vacuna están entre un 70% y un 90% para la población joven adulta sana, pero puede ser mucho menor para otros grupos poblacionales. Entre las desventajas de las vacunas inactivadas tenemos que hay una pobre inducción de anticuerpos IgA a nivel de la mucosa, limitada respuesta inmune mediada por células y baja inmunogenicidad y eficacia en ancianos (49).

La inmunización anti-Influenza con vacunas inactivadas bien diseñadas en los últimos años, ha inducido la protección contra la enfermedad en la mayoría de los casos cuando las cepas virales causantes de las epidemias y las presentes en las

*A Piñón- Ramos, S Oropesa-Fernández, C Aragonés-López, B Galindo, B Acosta-Herrera, y col.*

vacunas están muy relacionadas antigénicamente. La frecuencia de protección se ha visto que disminuye cuando las cepas pierden esa relación antigénica y entre los niños pequeños y ancianos (30-60%) (50, 51).

Las vacunas vivas atenuadas (adaptadas al frío) de los virus Influenza que son administradas intranasalmente, se replican en el tracto respiratorio superior y son capaces de inducir una respuesta inmune protectora específica. Su eficacia medida como la protección contra el cultivo positivo a Influenza, en los niños que recibieron dos dosis fue del 96% contra el subtipo A(H3N2) y del 91% contra el tipo B. En el caso de los trabajadores adultos sanos, la inmunización con este tipo de vacuna produjo una reducción en las enfermedades febriles del tracto respiratorio superior, en los días de trabajo perdidos por enfermedades respiratorias febriles, en las visitas a las consultas de atención primaria y en el uso de antibióticos. En los ancianos, los estudios clínicos limitados, han sugerido que quizás en este grupo sea buena una combinación de las vacunas inactivadas y vivas atenuadas. Entre las ventajas de estas vacunas está la habilidad de provocar respuesta inmune de la mucosa (además de las respuestas inmunes sistémicas humoral y celular) y que son de fácil administración y aceptabilidad (52).

### **Vacunación y pandemias.**

La historia de las pandemias anteriores y la amenaza actual de que ocurra dicho evento, muestran que los nuevos subtipos de Influenza A no aparecen a intervalos definidos como se creía, y que no todos los episodios de infecciones humanas con un nuevo subtipo de virus influenza A son capaces de desembocar en una pandemia. Cuando los verdaderos virus pandémicos aparecen, se producen varias ondas de brotes con un intervalo de 6 a 9 meses entre ellas, antes de que se pueda experimentar el impacto total del nuevo virus. Esto sugiere que los programas de prevención que involucran vacunas o medicamentos antivirales, pueden ser implementados más extensamente en la primera onda de brotes que con respecto a la segunda. Sin embargo, la planificación

para la pandemia debe tener en cuenta la posibilidad de una diseminación muy rápida del virus pandémico a partir del foco inicial de actividad, debido al aumento de los viajes internacionales con el creciente desarrollo de los medios de transporte (53, 54).

Las pandemias de 1918 y 1957 afectaron a todos los grupos de edades, con los mayores excesos de mortalidad en la población mayor de 65 años de edad y en personas de todos los grupos de edades que padecían de alguna condición crónica (54).

Aunque los tipos de influenza A y B ocasionan epidemias regularmente, solamente los virus del tipo A han mostrado la potencialidad de causar pandemias. Durante los períodos interpandémicos, los virus de influenza A y B evolucionan acumulando mutaciones en las proteínas HA y NA. Estos cambios acumulativos se denominan “derivadas antigénicas” (del inglés “drift”), y una nueva cepa epidémica difiere típicamente por un pequeño número de aminoácidos en la proteína HA. Los virus pandémicos aparecen por los “cambios antigénicos mayores” (del inglés “shift”), el cual se caracteriza por un cambio dramático en el subtipo de HA con o sin cambio de la NA (53).

Hay tres teorías para la emergencia de los virus pandémicos (55,56):

1. Reordenamiento genético, el cual ocurre entre virus humanos o entre virus humanos y animales
2. Transferencia directa de virus entre animales y humanos
3. Re-emergencia de virus de reservorios no conocidos o insospechados

Dado el peligro que representa la aparición de una nueva cepa del virus Influenza por cualquiera de los mecanismos anteriores, cada día cobra más importancia la prevención con el uso de antivirales y vacunas.

Normalmente, las epidemias de influenza tienen pico en su actividad entre los meses de Diciembre y Marzo en el hemisferio Norte y durante los meses de Junio y Septiembre en el hemisferio Sur. Para asegurar la producción de la vacuna y que esté lista para su uso antes de la estación invernal, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realiza una reunión de

expertos para seleccionar las cepas vacunales para el hemisferio Norte en el mes de Febrero y para el hemisferio Sur en el mes de Septiembre de cada año. El tiempo desde la identificación de una nueva cepa del virus hasta comenzar con la producción de la vacuna oscila de 2 a 3 meses, y los primeros lotes de producción están disponibles entre 4 y 5 meses después de la inoculación de los huevos embrionados. Entonces, frente a la amenaza pandémica, tendrán que pasar al menos 8 meses antes de que la nueva vacuna esté disponible para ser distribuida desde sus productores. Sin embargo, en una situación pandémica, es probable que deba prepararse una vacuna monovalente, siendo de gran importancia la reducción del tiempo para desarrollar los virus semilla, ya que las otras actividades deben esperar, por el cumplimiento de esta fase obligatoriamente. En resumen, el proceso total desde la identificación de una nueva cepa hasta la primera posibilidad de disponer de vacuna, toma no menos de ocho meses (55, 57-59).

#### **AGRADECIMIENTOS.**

A los profesores Clara Savón, Angel Goyenechea y Pedro Más por su exhaustiva revisión del documento.

#### **REFERENCIAS.**

- 1.- Karzon DT. Cytotoxic T cells in influenza immunity. *Semin Virol* 1996; 7:265-71.
- 2.- Reed WP, Olds JW, Kisch AI. Decreased skin-test reactivity associated with influenza. *J Infect Dis* 1972; 125:398-402.
- 3.- Wright PF, Webster, RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, ed. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. 1:1533-79.
- 4.- Lamb RA, Krug, RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, ed. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. 1:1487-531.
- 5.- Okuno, Y. Examination and vaccination against influenza. *Rinsho Byori* 2003; 51:268-73.
- 6.- Hilleman MR. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* 2002; 20:652-65.

- 7.- McDonnell WM, Askari FK. DNA vaccines. *N Engl J Med* 1996; 334:42-5.
- 8.- Ulmer JB. Influenza DNA vaccines. *Vaccine* 2002; 20 (Suppl 2):S74-6.
- 9.- 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; 268:244-50.
- 10.- Monto AS. Prospects for pandemic influenza control with currently available vaccines and antivirals. *J Infect Dis* 1997; 176 (Suppl 1):S32-7.
- 11.- Draft WHO guidelines on the use of vaccines and antivirals during influenza pandemics. *Wkly Epidemiol Rec* 2002; 77:394-404.
- 12.- Bui M, Whittaker G, Helenius A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* 1996; 70:8391-401.
- 13.- Hay AJ. The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin Virol* 1992; 3:21-30.
- 14.- Suzuki K, Torii M, Yamamoto T, Mizuno Y. Prevention and care management of influenza infection in institutions for the elderly and high risk groups. *Nippon Rinsho* 2000; 58:2327-32.
- 15.- Brydak LB, Machala M. Humoral immune response to influenza vaccination in patients from high risk groups. *Drugs* 2000; 60:35-53.
- 16.- Costa TX, Rodriguez AA, Perez PN, Begines CM, Cabello ORC, Romero GA. Influenza vaccination in high-risk groups. Role of the nursing staff. *Aten Primaria* 1994; 13:256-8.
- 17.- Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002; 20:3068-87.
- 18.- Sugaya N. Influenza. *Nippon Rinsho* 2003; 61 (Suppl 2):135-40.
- 19.- Fukumi H. History of influenza vaccine. *Uirusu* 1985; 35:107-22.
- 20.- Smorodintsev AA. History of the study of the etiology and vaccinal prevention of influenza (scientific contribution of Tushinskii's clinic). *Klin Med (Mosk)* 1982; 60:108-12.

*A Piñón- Ramos, S Oropesa-Fernández, C Aragonés-López, B Galindo, B Acosta-Herrera, y col.*

- 21.- Merten OW, Hannoun C, Manuguerra JC, Ventre F, Petres, S. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. *Adv Exp Med Biol* 1996; 397: 141-51.
- 22.- Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* 2001; 19(25-26): 3444-50.
- 23.- Schoenbaum SC, Mostow SR, Dowdle WR, Coleman MT, Kaye HS. Studies with inactivated influenza vaccines purified by zonal centrifugation. 2. Efficacy. *Bull WHO* 1969; 41:531-5.
- 24.- Kanarek AD, Tribe GW. The preparation of viral vaccines containing purified extracted antigens. *Prog Immunobiol Stand* 1969; 3:165-9.
- 25.- Eckert EA. Envelope protein of influenza virus. II. Antigenicity. *Arch Environ Health* 1970; 21:316-20.
- 26.- Johansson BE, Pokorny BA, Tiso VA. Supplementation of conventional trivalent influenza vaccine with purified viral N1 and N2 neuraminidases induces a balanced immune response without antigenic competition. *Vaccine* 2002; 20:1670-4.
- 27.- Three new flu vaccines. *Drug Ther Bull* 1977; 15:103-4.
- 28.- Stohr K. Preventing and treating influenza. *Br Med J* 2003; 326:1223-4.
- 29.- Minutello M, Senatore F, Cecchinelli G. 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.
- 30.- Ben-Yehuda A, Joseph A, Barenholz Y. Immunogenicity and safety of a novel IL-2-supplemented liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) in nursing-home residents. *Vaccine* 2003; 21:3169-78.
- 31.- Fridman EA, Peradze TV. Effectiveness of inactivated vaccines against influenza. *Tr Inst Im Pastera* 1982; 58:84-94.
- 32.- Avratinskii IM, Stepankovskaia LD, Katuntsevskaja GP. The evaluation of the efficacy of repeated inoculations against influenza using inactivated vaccines. *Lik Sprava* 1992:79-81.
- 33.- Baldo V, Menegon T, Buoro S. Vaccination against influenza in the elderly. Experience with adjuvant vaccines. *Ann Ig* 1999; 11:369-74.
- 34.- Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* 2001; 19:2673-80.
- 35.- Belshe RB, Couch RB, Glezen WP, Treanor JT. Live attenuated intranasal influenza vaccine. *Vaccine* 2002; 20:3429-30.
- 36.- Bernstein DI, Yan L, Treanor J, Mendelman PM, Belshe R. Effect of yearly vaccinations with live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza vaccines on antibody responses in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:28-34.
- 37.- Zangwill KM. Cold-adapted, live attenuated intranasal influenza virus vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:273-4.
- 38.- Wareing MD, Tannock GA. Live attenuated vaccines against influenza; an historical review. *Vaccine* 2001; 19:3320-30.
- 39.- Ulmer JB, Deck RR, Yawman A. DNA vaccines for bacteria and viruses. *Adv Exp Med Biol* 1996; 397:49-53.
- 40.- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chang W, Acsadi G, Jani A, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle, *in vivo*. *Science* 1990; 247:1465-8.
- 41.- Liu MA, McClements W, Ulmer JB, Shiver J, Donnelly J. Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 1997; 15:909-12.
- 42.- Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamasima K, *et al.* Protective immunity against influenza A viruses induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine* 2001; 19:3681-91.
- 43.- Zebedee FL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* 1988; 62:2762-72.
- 44.- Treanor JJ, Tierney EL, Zebedee SL, Lamb RL, Murphy BR. Passively Transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol* 1990; 64:1375-7.
- 45.- Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 1999; 5:1157-63.



- 46.- Anke H, Laura B, Wouter TV, Marijke H, Toos D, Abraham M, *et al.* Influenza virosomes: combining optimal presentation of hemagglutinin with immunopotentiating activity. *Vaccine* 2003; 21:925-31.
- 47.- Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999; 354:1277-82.
- 48.- Potter CW, Oxford JS. Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br Med Bull* 1979; 35:69-75.
- 49.- Nichol KL, Margolis KL, Wuorenma J, Von Sternberg T. The efficacy and cost effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community. *N Engl J Med* 1994; 331:778-84.
- 50.- Drinka PJ, Gravenstein S, Krause P, Schilling M, Miller BA, Shult P. Outbreaks of influenza A and B in a highly immunized nursing home population. *J Fam Pract* 1997; 45:509-14.
- 51.- Ohmit SE, Arden NH, Monto AS. Effectiveness of inactivated influenza vaccine among nursing home residents during an influenza type A (H3N2) epidemic. *J Am Geriatr Soc* 1999; 47:165-71.
- 52.- Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children. *N Engl J Med* 1998; 338:1405-12.
- 53.- Mayor S. Flu experts warn of need for pandemic plans. *Bmj* 2000; 321:852.
- 54.- WHO tags 1999-2000 vaccine, prepares flu pandemic plan. *Public Health Rep* 1999; 114:211.
- 55.- Cox NJ, Brammer TL, Regnery HL. Influenza: global surveillance for epidemic and pandemic variants. *Eur J Epidemiol* 1994; 10:467-70.
- 56.- De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD. Influenza pandemics: past and future. *Ned Tijdschr Geneesk* 1999; 143:1988-91.
- 57.- Das P. Flu experts fear countries are unprepared for a future pandemic. *Lancet* 2001; 357:1419.
- 58.- Fedson DS. Pandemic influenza and the global vaccine supply. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1552-61.
- 59.- Fukuda K. Are we ready for emerging strains of pandemic influenza? *Int J Clin Pract Suppl* 2000:37-43.