
El reto de las vacunas "pandémicas"

José Antonio Navarro-Alonso,

Pedro José Bernal-González y Jaime Jesús Pérez-Martín

Servicio de Prevención. Consejería de Sanidad. Región de Murcia.

Introducción y antecedentes

A diferencia de otras situaciones históricas, la comunidad científica dispone actualmente de una serie de herramientas que pueden mitigar drásticamente el impacto de una pandemia gripal en el ámbito médico, social y económico. La mejora de las medidas de salud pública basadas en experiencias previas, tanto de otras pandemias como de la gripe estacional, la mejora de los modelos matemáticos, los antivíricos y las vacunas forman parte de esas herramientas.

Respecto de estas últimas, la anticipación y la capacidad de producción son vitales para poder disponer de la medida más eficaz de las anteriormente mencionadas, ya que puede evitar la diseminación de la cepa pandémica y puede reducir la gravedad de la enfermedad¹. La vacunación,

por tanto, es la piedra angular de la prevención².

Desde que en 1997 se identificó por vez primera en seres humanos el virus gripal aviar A/H5N1 en el Sudeste Asiático hasta ahora, cuando se ha diseminado a población aviar de Europa, África y Asia, y se ha convertido en endémico en patos y aves domésticas en algunos países, y cuando los casos en seres humanos desde 2003 hasta el primer trimestre de 2009 contabilizan 256 en 15 países³, la carrera en pro de una vacuna no se ha interrumpido, a pesar de que los investigadores tienen que hacer frente a una serie de obstáculos que dificultan la consecución de una que sea exitosa frente a virus aviares con potencial pandémico. Entre estos se podrían citar el conocimiento científico, la escasa ayuda económica de las instituciones gubernamentales, la débil capacidad de producción, las restrictivas

estructuras regulatorias y las propias características inmunológicas del virus A/H5N1.

Quizás el más importante de estos obstáculos es el desconocer qué subtipo de virus será el responsable de la próxima pandemia; por ello, uno de los requisitos de la vacuna ideal sería el que provocara una respuesta inmune que protegiera al huésped de la infección frente a un amplio abanico de virus gripales del mismo o de distinto subtipo. Hasta ahora la mayoría de los esfuerzos se han concentrado en diseñar vacunas frente al subtipo A/H5N1, pero no conviene olvidar que este subtipo se encuentra en continua evolución, clades y subclades⁴, que los virus H7 y H9 han causado grandes brotes epidémicos en aves y algunos casos en seres humanos, que el virus H2 continúa circulando en patos salvajes, o que incluso este mismo virus, responsable de la pandemia de 1957, podría ser el causante de la próxima⁵.

Otro importante obstáculo es el de la tecnología en la producción de las vacunas, ya que los virus aviares altamente patógenos pueden ser letales o crecer pobremente en huevos fértiles, por lo que hay que recurrir a sofisticadas técnicas como la gené-

tica inversa (*reverse genetics*)⁶⁻⁸. Al ser esta una técnica relativamente novedosa, genera una serie de preguntas relativas a la inmunogenicidad, seguridad, dosis y régimen óptimo de vacunación⁹. Dado que, por otra parte, la tecnología actual de las vacunas estacionales se basa en el crecimiento del virus en huevos fértiles de gallina, y que la recuperación de antígeno obtenido por genética inversa es un 30-40% inferior al que se obtiene con la técnica convencional¹⁰, la disponibilidad de los mismos a gran escala es crucial, y más aún si el virus pandémico causa importante morbimortalidad en aves. Una interesante opción sería la de utilizar sustratos alternativos del tipo de cultivos celulares, como los que utilizan células Vero, PerC-6 o MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Cells*)².

A los obstáculos mencionados se suma la menor inmunogenicidad de la hemaglutinina vacunal de las cepas H5 y H9, en comparación con las cepas H1N1 y H3N2¹¹, y que no es bien conocida la respuesta humana a las vacunas de virus aviares. Es por ello que la investigación en curso se basa en la extrapolación de las experiencias con vacunas frente a virus gripales humanos, donde los correla-

tos inmunes de protección se dilucidaron tras ensayos de exposición. Por tanto, la evaluación de vacunas frente a cepas con potencial pandémico supone un reto extraordinario, ya que sólo puede conocerse su inmunogenicidad y seguridad, no su protección clínica. Por otra parte, la interpretación de los datos de inmunogenicidad de las vacunas candidatas puede resultar complicada, ya que carecemos de información específica de la naturaleza y magnitud de las respuestas séricas que se correlacionan con la protección clínica^{1,2}, más aún en una situación en la que el sistema inmune de la población no habrá tenido contacto previo (*naive*) para la cepa pandémica¹². Los modelos animales, especialmente el hurón, con todas sus limitaciones, podrían ayudar a interpretar los datos de inmunogenicidad en seres humanos^{13,14}.

Como ya se adelantó previamente, una vacuna ideal sería aquella que cumpliera los 4 requisitos siguientes: a) segura e inmunógena con bajo contenido antigénico y administrada en dosis única; b) protección de larga duración; c) protección frente a distintos subtipos y c) estable en el tiempo sin o con escasa pérdida de potencia¹⁵.

Son varios los laboratorios farmacéuticos que han publicado resultados de ensayos clínicos en seres humanos con vacunas que incluyen cepas aviares con potencial pandémico. Las autoridades regulatorias de los Estados Unidos, Australia, Canadá y de la Unión Europea, entre otras, han autorizado algunas en función de la eficacia clínica en hurones y en monos, y basándose en datos de inmunogenicidad y seguridad en seres humanos. A este respecto, y debido a que una vacuna acorde a la cepa que origine una pandemia no estaría disponible hasta los 4-6 meses de la declaración de la misma, se han pronunciado destacados expertos a favor de que los países dispongan de una reserva (*stockpile*) de vacunas "prepandémicas" que incluyan como candidata la cepa A/H5N1, ya que es esta la que en el momento actual está causando infecciones en aves en más de 50 países y casos muy graves en seres humanos¹⁶.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha sugerido que, en los casos en los que los países hayan adquirido vacunas prepandémicas, estas podrían utilizarse según la fase pandémica¹⁷. En la actual fase 3 los grupos diana serían aquellos con riesgo alto de contraer una zoono-

sis por H5NI y grupos seleccionados de población, bien con una vacunación parcial, *priming*, o completa. Si fuera inminente una pandemia por la cepa A/H5NI se podría utilizar la vacuna para la contención inicial en el foco o para vacunar a grupos seleccionados de población una vez que se haya documentado una transmisión interhumana mantenida. Se da la circunstancia que Japón, en esta fase 3, ha vacunado en 2008 a 5.561 sanitarios como parte de un plan de utilización del *stockpile* de vacuna A/H5NI de virus enteros inactivados y adyuvada con aluminio¹⁸.

Para despejar interrogantes el *Scientific Advisory Group of Experts* (SAGE) de la OMS constituyó un grupo *ad hoc* para el estudio del uso potencial de la vacuna A/H5NI en periodos interpandémicos¹⁹. Su misión fundamental es la de dar respuestas a las siguientes preguntas: ¿cuál es la evidencia, y si ésta es suficiente para ofrecer o recomendar el uso de vacunas autorizadas frente a la cepa A/H5NI en la fase 3 interpandémica para proteger a población seleccionada o a población general?, ¿cuál es la evidencia, y si ésta es suficiente para ofrecer o recomendar en esa misma fase una vacunación

parcial (*priming*) o completa con vacunas autorizadas frente a la cepa A/H5NI a población seleccionada o a población general?

En función de una recomendación positiva a las dos preguntas anteriores, el Grupo se plantearía otras cuestiones: ¿qué se debe de hacer con las vacunas almacenadas por los países o por la OMS una vez que se aproxime la fecha de caducidad?, ¿sería pertinente una modificación del volumen de vacunas almacenadas por la OMS?

En el mes de abril de 2009, y teniendo presente una serie de consideraciones, el Grupo ha recomendado la inmunización con vacuna A/H5NI en fase 3 interpandémica a personal de laboratorio que trabaje con este virus y para trabajadores de primera línea, según la naturaleza de la exposición y del riesgo local. No aconseja, por otra parte, la vacunación de la población general, basándose en su bajo riesgo de exposición actual y a la posibilidad, muy remota, de efectos adversos graves postvacunales²⁰.

Al objeto de complementar las operaciones de contención y de ayudar a mantener los servicios esenciales, la OMS, merced a los donati-

vos de la Industria Farmacéutica, ha recibido alrededor de 150 millones de dosis de vacunas "prepandémicas", cuyo destino básico será el de ponerlas a disposición de aquellos países de baja renta en el caso de una inminente pandemia¹⁷. Al carecer de evidencias suficientes no recomendamos modificar el volumen de las dosis disponibles en sus almacenes²⁰.

El *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), por su parte, en un documento de 2007, reconocía que las vacunas "prepandémicas" pueden ofrecer protección, pero que aún existen incertidumbres, básicamente del tipo de la estandarización de ensayos que midan la inmunogenicidad, de la duración de la protección, de la necesidad de abordar estudios en niños menores de dos años y del intercambio de distintas vacunas²¹.

Situación actual de las vacunas "prepandémicas"

Los grandes esfuerzos en la disponibilidad de una vacuna antigripal frente a una cepa con potencial pandémico (vacuna "prepandémica") se concentraron inicialmente en las vacunas inactivadas. Más adelante, y de-

bido a la pobre inmunogenicidad de la hemaglutinina de la cepa A/H5N1, se diseñaron estrategias basadas en "ahorro antigénico" (*antigen sparing*) con el objetivo de que al utilizar menor cantidad de hemaglutinina se pudiera vacunar un volumen mayor de población.

Se han ensayado vacunas de viriones completos, de virus fraccionados, de subunidades, de vacunas adyuvadas, recombinantes, de ADN, de vacunas basadas en cultivo celular y de vacunas vivas atenuadas, conteniendo todas ellas las cepas A/H5N1, A/H5N3 o A/H9N2²². Todas las preparaciones evaluadas por la OMS han mostrado ser seguras y bien toleradas en adultos sanos y en ancianos y niños cuando se han llevado a cabo ensayos clínicos *ad hoc*²³. Se dispone de una excelente revisión del estado actual y de los progresos en el desarrollo de vacunas antigripales prepandémicas^{24,25}, así como de su situación regulatoria y de las estrategias del suministro de vacunas en algunos países²⁶.

Al margen de la gran cantidad de ensayos publicados con vacunas candidatas, existe un importante número de variables entre ellos que dificultan su interpretación: contenido

antigénico, crecimiento en huevo o en cultivos celulares, sexo y edad de los inmunizados, vacunación o exposición previa a la gripe estacional, tipo de reclutamiento y tipo de determinación de la respuesta inmune¹³.

Hasta la fecha y tras los resultados publicados en los ensayos clínicos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. El estado inmune de la población frente a una pandemia difiere del correspondiente a la gripe estacional, por lo que se precisan dos dosis de vacuna para inducir respuestas inmunes teóricamente protectoras²⁷. De hecho, en la mayoría de los ensayos clínicos con las vacunas A/H5N1 se precisaron dos dosis para cumplir con los tres criterios exigidos para la gripe estacional por la *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products' Committee for Proprietary Medicinal Products*²⁰.

2. Las vacunas de virus completo pueden resultar más inmunógenas, al menos en sujetos *naive*, que las fraccionadas y las de subunidades, incluso estando adyuvadas con sales de aluminio²⁸. Un importante inconveniente a la hora de utilizar ese tipo de vacunas vendría dado por los cambios que tendría que acometer la

industria para transformar las plantas de producción de vacunas, al pasar de una estrategia de vacunas fraccionadas o de antígenos de superficie a una de virus enteros^{5,10,28-30}. Otro inconveniente sería, quizás, una mayor reactogenicidad, aunque en los ensayos publicados ese fenómeno no se ha constatado²⁹⁻³². Sin embargo, una teórica ventaja es que aumentaría la capacidad de producción de vacunas, ya que no se perdería el 20-30% de antígeno durante el proceso de disrupción del virus²⁹.

3. Se ha demostrado inmunogenicidad cruzada entre distintas clades de la hemaglutinina H5^{31,33-40}, lo que podría permitir en caso de una pandemia por virus A/H5N1 una estrategia de *priming* prepandémico, con dos dosis de vacuna y una administración de un *booster* homólogo a la cepa pandémica una vez comenzada la misma (*prime-boost strategy*)^{16,38}. La respuesta podría mantenerse hasta varios años tras la primera vacunación⁴¹, al generar ésta memoria inmunológica^{33,41}.

4. Para las vacunas de cultivo tradicional que incluyen las cepas A/H5N1 la inmunogenicidad mejora ostensiblemente si la vacuna incluye adyuvantes no aluminicos⁴² del tipo de emul-

siones de aceite en agua (MF59, AS03 o AF03) que permiten ahorro antigénico (*antigen dose-sparing*)⁴¹⁻⁴⁵.

5. Las vacunas de cultivo celular obviarían las restricciones que impone el cultivo en huevos fértiles de gallina, lo que podría acortar los procesos de producción en 4-6 semanas. Además, esta técnica aumenta la consistencia en la fabricación, reduce los riesgos de contaminación, mejora la flexibilidad, la capacidad de la producción y la concordancia con la cepa original y elimina, por último, la presencia de ovoalbúmina^{26,46}. Un asunto clave con esta tecnología es el mantenimiento de los estándares de la bioseguridad⁴⁷.

6. Las vacunas atenuadas H5N1 adaptadas al frío se han mostrado muy poco inmunógenas hasta la fecha, probablemente porque la hemaglutinina y la neuraminidasa aviar atenuan la inmunogenicidad de la cepa donante, o porque la inmunidad previa a la neuraminidasa puede reducir la replicación nasal del virus²⁵.

7. Los datos preliminares obtenidos tras su uso en seres humanos sugieren que son vacunas seguras, aunque al ser escaso el número de vacunados sólo se han podido evaluar los efectos adversos frecuen-

tes, y no los infrecuentes o los que ocurran a largo plazo²⁰.

A pesar de los grandes avances expuestos aún quedarían interrogantes, algunos de gran importancia, pendientes de contestar antes de proceder a una vacunación de amplios segmentos de población. ¿Podría existir una inmunopotenciación de la enfermedad tras la vacunación (efecto Dengue)?^{41,48} ¿Cuáles podrían ser las consecuencias del "pecado original antigénico" tras la vacunación con una cepa frente a la que no se ha enfrentado nunca la población?^{41,49} ¿Cómo aceptaría la población diana la vacunación, especialmente a la vista del incidente de la gripe porcina, *swine flu*, de 1976 en Fort Dix (New Jersey)?⁵⁰ Si la vacuna no concuerda o lo hace parcialmente con la cepa pandémica futura, ¿se podría producir un estado de protección parcial frente a la pandemia que dificultaría la identificación de nuevos casos o que incluso aumentara la diseminación vírica al provocar un cuadro clínico leve-moderado que no impidiera las actividades habituales?⁵¹.

También quedarían abiertas áreas de investigación preferentes⁴¹ que incluirían, entre otras, el ensayo de

otras vías de administración distinta a la intramuscular o de otros adyuvantes, la mejora de la estabilidad y de la potencia, el incremento de la protección cruzada frente a cepas homólogas o heterólogas, la investigación de una vacuna basada en epítopes universales —el "Santo Grial" de las vacunas antigripales—, especialmente los basados en proteínas internas conservadas^{26,52}, la realización de ensayos comparativos entre distintas vacunas (*head to head*) y que abarquen amplios segmentos poblacionales como niños, ancianos y personas con trastornos crónicos. Por otra parte sería prioritaria la investigación de tratamientos con anticuerpos humanos policlonales para aquellos que genéticamente fueran no respondedores a la vacuna, y la valoración de la posibilidad de incluir una cepa con potencial pandémico en las vacunas gripales estacionales convencionales^{16,41,53,54}. Esta última estrategia ha ido ganando aceptación en los últimos años, especialmente si se tiene en cuenta que las vacunas "prepandémicas" que han almacenado algunos países se encuentran próximas a expirar. No obstante, presentaría algunas dificultades del tipo de la combinación de vacunas adyu-

vadas H5 con vacunas estacionales no adyuvadas, del *priming* con vacunas "prepandémicas" que habitualmente se lleva a cabo con dos dosis de vacuna, y del aumento teórico de la reactividad en una situación no pandémica, en la que la tolerancia de la población a los efectos adversos es muy baja.

Perspectivas futuras

En la opinión de los autores nos encontramos en una situación en la que aún persisten incertidumbres, algunas muy consistentes, en cuanto a la conveniencia de disponer de un *stock* de vacunas frente a cepas gripales potencialmente pandémicas. Estas serían, entre otras, las siguientes:

— Aunque la cepa A/H5N1 es en estos momentos la candidata más probable para causar la pandemia, también son posibles otros subtipos, H2, H7 y H9, variantes porcinas A/H1N1 e incluso, y más remotamente, cepas de reagrupaciones entre estas últimas y H5 (virus *Armageddon*)⁵⁵. La pregunta obvia es: ¿protegería una vacuna A/H5N1 frente a otros subtipos?, si es así ¿en qué cuantía?

— Transcurridos 12 años desde su aparición en seres humanos y 6 desde su profusa circulación en aves, el virus A/H5N1 no ha llegado a adquirir la capacidad de transmitirse eficientemente entre seres humanos. La cuestión a dilucidar sería: si no ha adquirido dicha capacidad en ese tiempo, ¿la adquirirá en un futuro?

— Siendo posible, al menos teóricamente, el control de la pandemia en su origen, ¿qué ocurriría si se concentraran esfuerzos en eliminar la epizootia en los países actualmente endémicos?

— En el caso de proceder a la adquisición de vacunas, ¿qué criterios técnicos se seguirían para escoger entre uno u otro preparado?

— Al hilo del punto anterior, si se escoge la opción de adquisición de derechos de compra de una vacuna pandémica, ¿quién garantiza que los países fabricantes, 9 en total, no nacionalizarán la producción cuando se declare la pandemia? A este respecto, una opción inicialmente muy interesante, y que ya se barajó en su día, fue la de disponer de una planta de fabricación de vacuna antigripal en España.

— En el caso de que se adopte la decisión de vacunar a población

seleccionada, ¿cuál sería esa población?; si desconocemos el momento de la declaración de una pandemia, ¿cuándo se procedería a vacunar?; ¿cómo se comunicaría el riesgo de pandemia frente a los beneficios teóricos de la vacunación?; en el caso de aparición de efectos adversos causales o casuales tras la vacunación, ¿cómo afectaría ese hecho a las coberturas de la vacuna estacional?; si la vida media de las actuales vacunas "prepandémicas" es corta, ¿qué pasaría cuando llegue su fecha de caducidad?

En definitiva, en tanto en cuanto no se despejen ciertas incertidumbres, la opción desde Salud Pública sería la de estimular el consumo de vacuna antigripal estacional, especialmente entre la población de riesgo y entre los sanitarios, para seguir con la tendencia observada en los últimos años, en los que se ha pasado de una producción anual global de 300 a 600 millones aproximadamente en 2008¹⁶ y a 780 millones de dosis para el hemisferio Norte para la temporada 2009-2010⁵⁶. Con esta medida se conseguiría ampliar la capacidad de producción de la industria farmacéutica para que, en última instancia, pasaran a fabricar

vacuna pandémica. En este sentido, además, la vacunación estacional podría proporcionar cierto grado de inmunidad cruzada frente a cepas A/H5NI⁵⁷.

Por otra parte, la decisión del almacenamiento y su potencial uso en población seleccionada de vacuna "prepandémica" debiera llevarse a cabo por consenso de las Comunidades Autónomas en el seno del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, una vez valorados los argumentos a favor y en contra de tal medida.

Por tanto, y respecto a la decisión relativa a la vacuna, correspondería a las autoridades sanitarias, convenientemente asesoradas, valorar las ventajas e inconvenientes, y adoptar, en su caso, una de las tres opciones disponibles que siguen manteniéndose vigentes desde 2007⁵⁸:

1. Esperar a disponer de una mayor certidumbre (*sit back and wait*).
2. Vacunar ahora, con todas las incertidumbres presentadas.
3. Almacenar una vacuna "candidata" a la pandemia, desconociendo la cepa que la causaría.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haque A, Hober D, Kasper LI. Confronting potential influenza A (H5NI) pandemic with better vaccines. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1512-8.
2. Subbarao K, Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:267-78.
3. World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5NI) reported to WHO. 23 de marzo de 2009. Disponible en: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_03_23^a/en/index.html (consultado el 25 de marzo de 2009)
4. World Health Organization. Antigenic and genetic characteristics of H5NI viruses and candidate H5NI vaccine viruses developed for potential use as human vaccines. Febrero de 2009. Disponible en: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/200902_H5VaccineVirusUpdate.pdf (consultado el 25 de marzo de 2009).
5. Stephenson I, Nicholson K, Wood J, Zambon M, Katz J. Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:499-509.
6. Fodor E, Devenish L, Engelhardt O, Palese P, Brownlee G, García-Sastre A. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol.* 1999;73:9679-82.
7. Webby R, Pérez D, Coleman J, Guan Y, Knight J, Govorkova E, et al. Responsiveness to use reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet.* 2004;363:1009-13.
8. Nicholson C, Major D, Wood J, Robertson J. Generation of influenza vaccine viruses of Vero cells by reverse genetics: an H5NI candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine.* 2005;23:2943-52.
9. Govorkova E, Webby R, Humberd J, Seiler J, Webster R. Immunization with reverse-genetic-produced H5NI influenza vaccine protects against homologous and heterologous challenge. *J Infect Dis.* 2006;194:159-67.
10. Stephenson I, Gust I, Pervikov Y, Kieny M. Development of vaccines against influenza H5. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:458-60.
11. Luke C, Subbarao K. Vaccines for pandemic influenza. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:66-72.

12. Poland G. Vaccines against avian influenza – a race against time. *N Eng J Med.* 2006;354:1411-3.
13. Booy R, Brown L, Grohmann G, MacIntyre C. Pandemic vaccines: promises and pitfalls. *Med J Australia.* 2006;185:S62-S5.
14. Subbarao K, Luke C. H5N1 viruses and vaccines. *PLoS Pathogens.* 2007;3:e40.
15. Sambhara S, Bridges C, Poland G. H5N1 vaccine hits the target, but not the bull's eye. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:503-5.
16. Jennings L, Monto A, Chan P, Szucs T, Nicholson. Stockpiling prepandemic influenza vaccines: a new cornerstone of pandemic preparedness plan. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:650-8.
17. World Health Organization. Options for the use of human H5N1 influenza vaccines and the WHO H5N1 vaccine stockpile. WHO scientific consultation. Geneva, Switzerland. 1-3 octubre de 2007. Disponible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_HSE_EPR_GIP_2008_Id.pdf
18. Masuda M, Sugita S, Kuroda K, Nishimura H. H5N1 influenza vaccination policy in Japan. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:266-7.
19. World Health Organization. Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, November 2008 – conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009;84:1-16.
20. World Health Organization. Strategic Advisory Group of Experts: recommendations on the use of licensed H5N1 influenza vaccines in the interpandemic period. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009;84:244-8.
21. European Centre for Disease Prevention and Control. Expert Advisory Group on Human H5N1 Vaccines. Public Health and Operational Questions. Stockholm. Agosto de 2007. Disponible en: <http://www.ecdc.europa.eu/documents/pdf/PH%20Questions%20final.pdf>
22. World Health Organization. Tables on the clinical trials of pandemic influenza prototype vaccines. Julio de 2008. Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/flu_trials_tables/en/index.html
23. World Health Organization. 4th Meeting on evaluation of pandemic influenza prototype vaccines in clinical trials, 14-15 febrero 2008, WHO HQ, Geneva. Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_140208/en/print.html

24. Leroux-Roels I, Leroux-Roels G. Current status and progress of pre-pandemic and pandemic vaccine development. *Exp Rev Vaccines*. 2009; 8:401-23.
25. Conference Report. Report of the 5th meeting on the evaluation of pandemic influenza prototype vaccines in clinical trials World Health Organization, Geneva, Switzerland, 12-13 February 2009. *Vaccine*. 2009;27:4079-89.
26. Palache B, Krause R. Progress with human H5N1 vaccines: a perspective from industry. *Exp Rev Vaccines*. 2009;8:391-400.
27. Sambhara S, Stephenson I. Moving influenza vaccines forward. *Exp Rev Vaccines*. 2009;8:375-7.
28. Nicholson K. Influenza and vaccine development: a continued battle. *Exp Rev Vaccines*. 2009;8:373-4.
29. Lin J, Zhang J, Dong X, Fang H, Chen J, Su N, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;368:991-7.
30. Vajo Z, Kosa L, Visontay I, Jankovics M, Jankovics I. Inactivated whole virus influenza A (H5N1) vaccine. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:807-8.
31. Wu J, Fang H, Chen J, Zhou J, Li Ch, Qiu Y, et al. Immunogenicity, safety, and cross-reactivity of an inactivated, adjuvanted, prototype pandemic influenza (H5N1) vaccine: a phase II, double-blind, randomized trial. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1087-96.
32. Vajo Z, Kosa L, Szilvasy I, Paulini S, Bartha K, Visontay I, et al. Safety and immunogenicity of a pre-pandemic influenza A (H5N1) vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:1052-6.
33. Stephenson I, Nicholson K, Hoschler K, Zambon M, Hancock K, DeVos J, et al. Antigenically distinct MF-59 adjuvanted vaccine to boost immunity to H5N1. *N Eng J Med*. 2008;359:1631-2.
34. Stephenson I, Bugarini R, Nicholson K, Podda A, Wood J, Zambon M, et al. Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with non-adjuvanted and MF-59 adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *J Infect Dis*. 2005;191:1210-5.
35. Kistner O, Howard K, Spruth M, Wodal W, Brühl P, Gerencer M, et al. Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses. *Vaccine*. 2007;25:6028-36.

36. Ehrlich H, Müller M, Oh H, Tambyah P, Joukhadar Ch, Montomoli E, et al. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N Eng J Med.* 2008;358:2573-84.
37. Leroux-Roel I, Borkowski A, Vanwolleghem T, Dramé M, Clement F, Devaster J, et al. Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;370:580-9.
38. Goji N, Nolan C, Hill H, Wolff M, Noah D, Williams T, et al. Immune responses of healthy subjects to a single dose of intramuscular inactivated influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) vaccine after priming with an antigenic variant. *J Infect Dis.* 2008;198:635-41.
39. Levie K, Leroux-Roel I, Hoppenbrouwers K, Kervyn A, Vandermeulen C, Forgas S, et al. An adjuvanted, low dose, pandemic influenza A (H5N1) vaccine candidate is safe, immunogenic, and induces cross-reactive immune responses in healthy adults. *J Infect Dis.* 2008;198:642-9.
40. Fazekas G, Martosne-Mendi R, Jankovics I, Szilvasy I, Vajo Z. Cross-reactive immunity to clade 2 strains of influenza virus A subtype H5N1 induced in adults and elderly patients by Fluval, a prototype pandemic influenza vaccine derived by reverse genetics, formulated with a phosphate adjuvant, and directed to clade I strains. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:437-43.
41. Poland G, Sambhara S. Vaccines against influenza A (H5N1): evidence of progress. *J Infect Dis.* 2008;198:629-31.
42. Keitel W, Campbell J, Treanor J, Walter E, Patel S, He F, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated influenza A/H5N1 given with or without aluminium hydroxide to healthy adults: results of a phase I-II randomized clinical trial. *J Infect Dis.* 2008;198:1309-16.
43. Sambhara S, Poland G. Breaking the immunogenicity barrier of bird flu vaccines. *Lancet.* 2007;370:544-5.
44. Galli G, Medini G, Borgogni E, Zedda L, Bardelli M, Malzone C, et al. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:3877-82.
45. Galli G, Hancock K, Hoschler K, DeVos J, Praus M, Bardelli M, et al. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:7962-7.

46. Minor P, Engelhardt OG, Wood JM, Robertson JS, Blayer S, Colegate T, et al. Current challenges in implementing cell-derived influenza vaccines: Implications for production and regulation, July 2007, NIBSC, Potters Bar, UK. *Vaccine*. 2009;27: 2907-13.
47. Wright P. Vaccine preparedness – are we ready for the next influenza pandemic? *N Eng J Med*. 2008;358:2540-3.
48. European Centre for Disease Prevention and Control. Expert Advisory Group on Human H5N1 Vaccines: Scientific issues. Stockholm. August 2007. Disponible en: <http://www.ecdc.europa.eu/documents/pdf/Sci%20Questions%20final.pdf>
49. Francis T. On the doctrine of original antigenic sin. *Prod Am Phil Soc*. 1960;104:572-8.
50. El Sahly H, Keitel W. Pandemic H5N1 influenza vaccine development: an update. *Exp Rev Vaccines*. 2008;7:241-7.
51. Bermejo-Martín J, Tenorio-Abreu A, Vega T, Eiros J, Castrodeza J, Ortiz de Lejarazu R. Prepandemic influenza vaccines. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:206-7.
52. Center for Infectious Disease Research and Policy. The pandemic vaccine puzzle. Disponible en: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/panflu/news/nov0107panvax6.html>
53. Center for Infectious Disease Research and Policy. Experts weigh new H5N1 vaccine strategies. *CIDRAP News*. Febrero de 2009. Disponible en: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/panflu/news/feb0309antigen-jw.html>
54. Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Influenza A (H1N1) Vaccines. Recommendations of the Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Influenza A (H1N1) Vaccines. 19 de mayo de 2009. Disponible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/SAGE_H1N1_vaccinerecommendation_2009_05_19.pdf
55. Shetty P. Preparation for a pandemic. Influenza A/H1N1. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:339-40.
56. Centre for Infectious Disease Research and Policy. Path to swine flu vaccines has major hurdles. *CIDRAP Pandemic Influenza latest news*. Disponible en: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/panflu/index.html>
57. Gioia C, Castilletti M, Tempestili P, Piacentini L, Bordi R, Chiapini C, et al. Cross-subtype immunity against avian influenza in persons recently vaccinated for influenza. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:121-8.
58. Osterhaus A. Pre- or post-pandemic influenza vaccine. *Editorial. Vaccine*. 2007;25:4983-4.