

Mesa redonda: Vacunas frente a virosis emergentes

Moderadores: **Ismael Huerta González**

Papel actual de antivirales y nuevas vacunas frente a gripe A/H5

Agustín Portela. *División de Productos Biológicos y Biotecnología. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Majadahonda, 28220 Madrid.*
E-mail: aportela@agemed.es

Resumen

Dos medicamentos clave para luchar contra una pandemia causada por un virus de la gripe serán los antivirales y las vacunas. Se revisará su situación actual de registro, y se hará especial énfasis en los desarrollos y guías que la Agencia Europea del Medicamento ha realizado recientemente en el contexto del brote de virus aviar H5N1.

Palabras clave: Gripe aviaria. Vacunas pandémicas. Fármacos antivirales.

Summary

Two key medicinal products to fight against a pandemic caused by an influenza virus will be the antivirals and vaccines. Their current regulatory situation will be reviewed, and emphasis will be put on the developments and guidance documents prepared by the European Medicines Evaluation Agency in the context of the outbreak of avian H5N1 influenza virus.

Key words: Avian influenza. Pandemic vaccins. Antivirals drugs.

En Mayo de 1997, se detectó un virus de la gripe del subtipo H5, altamente patógeno para pollos, que causó una alta mortalidad en los mercados de aves de Hong Kong. El virus se transmitía con dificultad a humanos pues sólo se documentaron 18 casos de infección pero tenía una alta tasa de letalidad (murieron 8 de las personas infectadas). El brote se pudo contener gracias al

sacrificio masivo de más de 1,5 millones de aves de corral presentes en la ciudad. Sin embargo, de nuevo a finales del año 2003 se detectan brotes muy virulentos en aves de corral causados también por un virus de la gripe H5. Los brotes aparecieron de forma casi simultánea en muchos países asiáticos, y a primeros del año 2004 empiezan a documentarse casos de infección por este virus en humanos. Al igual que en el caso del brote de 1997, aunque el número de personas afectadas era reducido la letalidad era muy alta. Saltan las alarmas ante la posibilidad de que este virus pueda adaptarse a humanos, transmitirse eficientemente entre ellos, y ser el causante de una pandemia similar a las que ya ocurrieron en el siglo pasado y que cursaron con enorme mortalidad y morbilidad. Ante esta amenaza todos los organismos nacionales e internacionales con competencias en materia sanitaria reaccionaron preparando diferentes medidas de contingencia.

Además de otras medidas sanitarias para hacer frente a una pandemia de gripe, hay dos elementos que contribuiría enormemente a minimizar y controlar el impacto causado un virus pandémico. Por un lado estarían los antivirales y por otro las vacunas. En la actualidad hay únicamente cuatro agentes antivirales autorizados como medicamentos. Dos de ellos, la amantadina y la rimantadina, actúan interfiriendo con la función de la proteína M2; y los otros dos compuestos (oseltamivir y zanamivir) son inhibidores de la Neuraminidasa viral. Desde hace más de 50 años se viene utilizando vacunas para controlar y minimizar la repercusión clínica de los brotes de gripe estacional que ocurren anualmente preferentemente durante el invierno. Con la experiencia acumulada en el uso de antivirales y de vacunas en la lucha contra la gripe estacional, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha actualizado la información disponible sobre estos medicamentos por si hubiera que usarlos en el contexto de una pandemia. Además ha preparado guías para desarrollar vacunas pandémicas y ha establecido procedimientos para autorizar dichas vacunas. Estos serán los aspectos que se revisarán durante la charla.

Problemas asociados a la vacunación frente a la fiebre amarilla

Joaquim Gascon. *Centro de Salud Internacional. IDIBAPS. Hospital Clinic Barcelona. E-mail: jgascon@clinic.ub.es*

Resumen

La vacuna de la fiebre amarilla, es una vacuna viva atenuada, utilizada para prevenir la fiebre amarilla, una enfermedad endémica en África y América Latina. Desde su introducción, se han descrito algunos efectos adversos graves a la vacuna, poco frecuentes. Sin embargo, desde 1996 se ha descrito un nuevo efecto adverso denominado "enfermedad viscerotrópica asociada a la vacuna de la fiebre amarilla". Los profesionales sanitarios deben administrar la vacuna sólo a aquellos viajeros con verdadero riesgo de adquirir la infección, sobretodo si es una primo vacunación.

Palabras clave: Vacuna fiebre amarilla. Efectos adversos. Viajeros.

Summary

Yellow fever vaccine is a live, attenuated viral preparation, against yellow fever, an arbovirolosis endemic in Africa and Latinamerica. Over the past years, severe adverse reactions have been reported and since 1996, a new adverse event called "yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease" (YEL-AVD) have been described. Physicians should take care to prescribe yellow fever vaccine only to patients truly at risk for exposure to yellow fever, especially in those who receive the vaccine for the first time.

Key words: Yellow fever vaccine. Adverse events. Travellers.

Introducción

La Fiebre Amarilla es endémica en África y Sudamérica. El espectro clínico de la fiebre amarilla abarca desde casos subclínicos a una afectación general con presencia de hemorragias. La OMS estima unos 200.000 casos de fiebre amarilla anuales¹ con una mortalidad aproximada del 20%. Es de las pocas enfermedades producidas por arbovirus para la cuál se dispone de una vacuna eficaz.

La vacuna frente a la fiebre amarilla: efectos adversos

La vacuna contra la fiebre amarilla, es una vacuna de virus vivos atenuados, preparada a partir de la cepa 17D, de la que existen dos linajes: la 17DD y la 17D-204 con una homología del 99,9%². Con el incremento de los viajes internacionales, miles de personas se vacunan cada año contra la fiebre amarilla. Oficialmente, todas las personas de más de 9 meses de edad que viven o viajan a zonas endémicas de África y Sudamérica deben recibir la vacuna (OMS/CDC). En general son vacunas muy bien toleradas, con sólo un 2-5% de personas con reacciones leves; aunque una de las contrain-

dicaciones de la vacuna incluye a niños menores de 9 meses, debido al riesgo de encefalitis. Desde 1945, se han declarado 23 casos de encefalitis después de la administración de la vacuna contra la fiebre amarilla, 16 de los cuáles eran niños menores de 9 meses. El riesgo de la padecer la enfermedad neurotrópica asociada a la vacuna se ha estimado en <1/8.000.000 de personas³.

Recientemente se ha descrito un nuevo efecto adverso de la vacuna contra la fiebre amarilla, la enfermedad viscerotrópica asociada a la vacuna (YEL-ADV). Detectado por primera vez en 2001⁴, desde entonces se han declarado 32 casos^{5,6}. Son las personas que reciben por primera vez la vacuna contra la fiebre amarilla las que tienen las que tienen más riesgo de padecer una YEL-ADV, y la edad avanzada se ha señalado cómo otro de los factores de riesgo.

Las estimaciones de incidencia de este efecto adverso varían desde 0.09/1.000.000 de dosis en Brasil hasta 1/400.000 o de 1.8/100.000 dosis en EUA^{7,8} con una mortalidad del 61%. La YEL-ADV se comporta de forma muy parecida a la enfermedad producida por el virus salvaje, aunque entre los pocos casos declarados se han descrito grandes diferencias desde el punto de vista clínico y analítico.

Enfermedad neurotrópica asociada a la vacuna contra la fiebre amarilla (YEL-AND)

La definición de caso incluye uno o más de los siguientes síntomas: la presencia de fiebre y cefalea de más de 24 horas de duración; presencia de convulsiones; disfunción neurológica focal (afasia, ataxia, parestias); alteraciones mentales (confusión, letargia, cambios de personalidad...); pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo; proteinorraquia. El inicio de los síntomas ocurre entre los días 1-30 de la vacunación de la fiebre amarilla.

Alteraciones en las pruebas de imagen y en el electroencefalograma, son esenciales para definir un caso potencialmente relacionado con YEL-AND como caso sospechoso. Se exige descartar otras patologías. Los casos probables y definitivos se definen como aquellos en los que además se aísla el virus de la vacuna en sangre dentro de los 7 días después de la vacunación (caso probable) o se aísla el virus del líquido cefalorraquídeo (lcr), o se hallan IgM específicas en el lcr (caso definitivo).

Se ha descrito también enfermedad neurológica autoinmune asociada a la vacuna contra la fiebre amarilla y que puede afectar al Sistema Nervioso Central o al Periférico.

Enfermedad viscerotrópica asociada a la vacuna contra la fiebre amarilla (YEL-AVD)

El inicio de los síntomas ocurre a los 1-10 días después de la administración de la vacuna contra la fiebre amarilla. La definición de

caso (nivel 1) incluye la presencia de fiebre de más de 24 horas de duración y uno o más de los siguientes síntomas: náuseas, vómitos, fatiga (> 72 horas de duración), mialgias (> 24 h. de duración), artralgias (> 24 h. de duración) y disnea.

Un segundo nivel de evidencia lo constituye la presencia de los síntomas antes citados (nivel 1), junto a uno o más de los siguientes síntomas: ictericia, aumento de las transaminasas; insuficiencia renal; taquicardia o bradicardia; rhabdomiolisis, trombocitopenia, distrés respiratorio, hipotensión, miocarditis, coagulación vascular diseminada, hemorragia. Se exige además, descartar otras enfermedades.

Para el diagnóstico de caso probable o caso definitivo se necesitan además pruebas histopatológicas de la presencia del virus en los tejidos y el aislamiento del virus en sangre.

Precauciones y contraindicaciones de la vacuna contra la fiebre amarilla

La edad es una variable a tener en cuenta. La vacuna está contraindicada en los menores de 9 meses de edad. Los datos de que se dispone indican que las personas de más de 65 años, tienen más riesgo de padecer efectos adversos después de la vacunación, comparado con personas más jóvenes⁹. No existe una contraindicación formal para la administración de la vacuna en los mayores de 65 años, pero hay que sopesar bien los riesgos y beneficios, en aquellos viajeros de esta edad que por primera vez deben recibir la vacuna contra la fiebre amarilla.

El embarazo y la lactancia son contraindicaciones relativas para la vacuna contra la fiebre amarilla. No se han objetivado anomalías congénitas en los pocos casos de niños nacidos de mujeres que han recibido la vacuna durante su embarazo^{10,11}. No existen datos en mujeres lactantes, pero hay un riesgo teórico de transmisión a través de la leche materna. En ambos casos, en principio se debe aconsejar el retraso del viaje, aunque si esto no es posible y el riesgo de adquirir la enfermedad es importante, puede vacunarse.

Alteraciones de la inmunidad. Viajeros con alteración de su inmunidad no deben vacunarse (Tabla 1). Las personas infectadas por el

Tabla 1. Contraindicaciones de la vacuna frente a la fiebre amarilla

Alergia al huevo.
Inmunodeficiencia celular natural o adquirida.
Infección sintomática por el VIH.
Niños menores de 9 meses.
Linfomas, leucemias, neoplasias en general.
El embarazo y la lactancia son contraindicaciones relativas (ver texto).

VIH, pero que no tienen SIDA, y deben viajar a zonas endémicas de fiebre amarilla pueden recibir la vacuna bajo estricta supervisión. Se exige un nivel de CD4+ superior a 200/mm³.¹² Hay datos que indican que el porcentaje de personas VIH+ que desarrollan anticuerpos neutralizantes es menor que en la población general¹³. Otras contraindicaciones se indican en la Tabla 1.

Conclusiones

Debido a los potenciales, aunque muy poco frecuentes efectos adversos de la vacuna contra la fiebre amarilla, en los centros de vacunación internacional deben existir protocolos estrictos que aseguren una aplicación racional de esta vacuna. Se necesitan estudios que avancen en el conocimiento de los factores de riesgo asociados a las complicaciones graves de la vacuna. Finalmente, subrayar la importancia de la vigilancia epidemiológica en esta materia.

Bibliografía

1. WHO. *District guidelines for yellow fever surveillance*. Geneva, Switzerland: WHO, 1998. Publicación n° (WHO/EPI/GEN) 98.09. Disponible en: http://www.who.int/emc-document/yellow_fever/whoepigen9809c.html
2. Pugachev KV, Ocran SW, Guirakhoo F, Burby D, Monath TP. Heterogeneous nature of the genome of the ARILVAX yellow fever 17D vaccine revealed by consensus sequencing. *Vaccine* 2002;20:996-9.
3. Monath TP. 1999. Yellow fever. En: Plotkin SA, Orenstein WA (eds). *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders 1999:815-79.
4. Martín M, Tsai TF, Cropp B, et al. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *Lancet* 2001;358:98-104.
5. Velozzi C, Mitchell T, Miller E, et al. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease (YEL-AVD) and corticosteroid therapy: eleven United States cases, 1996-2004. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:333-6.
6. Doblas A, Domingo C, Bae HG, Bohórquez CL, de Ory F, Niedrig M, Mora D, Carrasco FJ, Tenorio A. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease and death in Spain. *J Clin Virol* 2006;36:156-8.
7. Cetron MS, Marfin AA, Julian KG, et al. Centres for Disease Control and Prevention. Yellow fever vaccine. Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP), 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51(RR-17):1-11.
8. Khromava AY, Barwick R, Weld LH, et al. Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine* 2005;23:3256-63.
9. Martín M, Weld LH, Tsai TF, et al. Advance age a risk factor for adverse events temporally associated with yellow fever vaccination. *Emerg Infect Dis* 2001;6:945-51.
10. Monath TP. Yellow fever. En: Plotkin SA, Orenstein WA (eds). *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders 1999:815-79.

11. Tsai TF, Paul R, Lynberg MC, Lestón GW. Congenital yellow fever virus infection after immunization in pregnancy. *J Infect Dis* 1993;168:1520-3.
12. Castelli F, Patroni A. The human immunodeficiency virus-infected traveller. *Clin Infect Dis* 2000;31:1403-8.
13. Goujon C, Tohr M, Feuille V, Coulaud JP, Dupont B, Sansonetti P. Good tolerance and efficacy of yellow fever vaccine among subjects carriers of human immunodeficiency virus. (Abstract 32). 4th International Conference on Travel Medicine, Acapulco, México: 1995.

Nuevos desarrollos de vacunas frente a arbovirus

Cristina Domingo Carrasco. Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. E-mail: domingoc@isciii.es

Resumen

Aunque los arbovirus suponen un gran problema de salud pública global, a día de hoy sólo se dispone de vacunas comerciales frente a la fiebre amarilla, la encefalitis transmitida por garrapatas, y la encefalitis japonesa. El desarrollo de nuevas vacunas, especialmente frente a los virus de mayor impacto como son dengue y West Nile, y la mejora en términos de eficacia, seguridad y costes de producción de las ya existentes es esencial para el control de estas infecciones. En este momento el desarrollo de nuevos candidatos vacunales se apoya tanto en métodos tradicionales de atenuación empírica de virus salvajes, como en nuevas estrategias de diseño de vacunas tales como la obtención de virus quiméricos, la mutación específica de determinantes de virulencia, o las vacunas de ácidos nucleicos. Sin embargo, para lograr con éxito el desarrollo de nuevas y mejores vacunas frente a los principales arbovirus es necesario un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la inducción de la respuesta inmune y en la aparición de inmunidad protectora en el hospedador.

Palabras clave: Arbovirus. Vacunas vivas atenuadas. Virus quiméricos. Inmunización con DNA.

Summary

Although arboviruses suppose a great public health problem, today the only commercially available vaccines are those against yellow fever, tick-borne encephalitis and Japanese encephalitis. The development of new vaccines, especially those against the viruses of greater impact such as dengue and West Nile, and further improvement of the existing vaccines in terms of efficacy, safety, and manufacturing cost, is essential for the control of these infections. At the moment, the development of new vaccine candidates rely both on traditional methods such as empirical attenuation of wild type viruses, as in new strategies for vaccine design such as chimerisation of viruses, specific mutagenesis of viral determinants of virulence, or nucleic acid vaccination. Nevertheless, to achieve a successful development of new and better vaccines against the major arboviruses, better knowledge of the mechanisms implied in the immune response elicited and the appearance of the protective immunity in the host is needed.

Key words: Arboviruses. Attenuated live vaccines. Chimeric viruses. DNA immunization.

Introducción

Las enfermedades causadas por arbovirus se encuentran entre las enfermedades emergentes y re-emergentes con más importancia en salud pública a día de hoy. Los arbovirus pertenecen a grupos taxonómicos muy diversos que representan a 8 familias virales diferentes y a 14 géneros. Los arbovirus más importantes como patógenos humanos pertenecen a las familias virales *Togaviridae*, *Flaviviridae* y *Bunyaviridae*¹. Actualmente se conocen 134 arbovirus capaces de causar enfermedad en el hombre y aproximadamente 40 que lo hacen en el ganado. El espectro clínico de las enfermedades que causan es muy amplio: infección subclínica, síndrome febril indiferenciado, encefalomielitis, fiebres hemorrágicas... Entre los arbovirus es común que el mismo virus pueda producir síndromes diferentes en distintos individuos en función de ciertos factores como la edad o el estatus inmunológico.

De momento la única medida de control frente a las infecciones causadas por arbovirus radica en el control de los vectores (mosquitos y garrapatas) que los transmiten. Este es un objetivo difícil de alcanzar, por lo que la posibilidad de vacunación se convierte en la medida preventiva más eficaz². Actualmente tan sólo existen vacunas comerciales disponibles frente a la fiebre amarilla (FA)³, la encefalitis japonesa (EJ)⁴, y la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG)^{5,6}. Estas vacunas en general son caras y precisan de mejoras en términos de seguridad, eficacia, y costes de producción⁷.

En los últimos años se han desarrollado propuestas vacunales frente a los arbovirus más importantes, y la OMS ha establecido como objetivo prioritario el desarrollo de vacunas frente a aquellos flavivirus que causan una mayor carga de enfermedad a nivel mundial: dengue y West Nile. Asimismo, y debido a ciertas consideraciones de seguridad y eficacia se recomienda el desarrollo de nuevas propuestas vacunales frente a los virus de los que ya se dispone de vacunas. Los avances más novedosos y prometedores en el desarrollo de vacunas frente a los cuatro serotipos de virus dengue (DEN1, DEN2, DEN3, DEN4), el virus West Nile, y la encefalitis japonesa, incluyen el desarrollo de vacunas vivas atenuadas, vacunas quiméricas y por último las vacunas de ácidos nucleicos o DNA.

Vacunas de virus vivos atenuados

Tradicionalmente las vacunas de virus atenuados se obtienen mediante el pase sucesivo del virus en cultivos celulares de huéspedes "atípicos" hasta alcanzar un grado aceptable de atenuación en equilibrio con su inmunogenicidad.

Estas vacunas presentan como ventaja frente a las vacunas de virus inactivados su menor coste de producción y la posibilidad de ser administradas en una única dosis, algo importante en el desarrollo de vacunas que han de ser aplicadas en países en vías de desarrollo. Las vacunas vivas atenuadas mimetizan perfectamente la infección natural y son capaces de inducir una respuesta inmune de base celular gracias a la replicación intracelular del virus, por lo que son capaces de generar una respuesta inmune robusta y duradera.

En el caso de los virus dengue, el desarrollo de este tipo de vacunas se ha visto frenado por la carencia de un modelo animal adecuado para su estudio, ya que la atenuación de las vacunas sólo puede ser evaluada mediante la determinación del grado de viremia que se produce en primates no humanos inmunizados, o en parámetros mucho más indirectos como son el tamaño y morfología de las placas de lisis, la tasa de crecimiento o la sensibilidad a la temperatura en cultivos celulares de los virus atenuados. Las vacunas vivas atenuadas obtenidas frente a dengue han sido desarrolladas en paralelo por iniciativa del Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)-Glaxo SmithKline, y por la Universidad de Mahidol (Tailandia)-Aventis Pasteur, y han sido evaluadas tanto como vacunas monovalentes como tetravalentes. Mientras que los virus atenuados obtenidos por el WRAIR han demostrado ser demasiado reactogénicos o insuficientemente inmunogénicos⁸, en Tailandia se han obtenido cuatro candidatas vacunales que representan en este momento la vacuna tetravalente más prometedora, en términos de seguridad e inmunogenicidad⁹. Se han obtenido virus atenuados de los cuatro serotipos de dengue (DEN1-PDK13; DEN2-PDK53; DEN3-PGMK-30/FRhL3; DEN4-PDK48), mediante pases sucesivos en células de riñón de perro, de riñón de mono verde africano, o de pulmón de mono rhesus fetal. En diferentes ensayos clínicos se ha demostrado como la vacuna tetravalente precisa un correcto ajuste de la cantidad relativa de cada virus en la formulación puesto que se han observado diferencias significativas en la respuesta inmune específica generada frente a cada serotipo. Así, DEN4 es el serotipo frente al que se genera una respuesta inmune más débil, mientras que los mayores títulos de anticuerpos se generan frente a DEN3, siendo este el serotipo que más frecuentemente produce viremia detectable en individuos vacunados lo que parece indicar un menor grado de atenuación de esta cepa¹⁰. Adicionalmente, esta vacuna tetravalente presenta una reactogenicidad inaceptable en niños, la población diana de la vacunación, lo que hace que por el momento sea necesario un mayor esfuerzo en la estandarización de este desarrollo vacunal.

El avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido el desarrollo de nuevos virus atenuados en los que se han introducido mutaciones que implican una pérdida de virulencia mientras que se mantiene un alto grado de inmunogenicidad. Entre los inconvenientes de este tipo de vacunas, encontramos la posibilidad de reversión de las mutaciones puntuales introducidas. La obtención de virus atenuados mediante mutaciones dirigidas a determinados locus del genoma viral, ha llevado a la obtención de un DEN4 atenuado que contiene una delección de 30 nucleótidos en su región 3' no codificante (rDEN4delta30)¹¹. Este virus se ve limitado en su capacidad de replicación y debido a la extensión de la delección no es probable que sea susceptible de sufrir un proceso de reversión a virulencia, por lo que podría convertirse en un buen candidato vacunal para DEN4. En los primeros ensayos realizados en humanos esta vacuna ha demostrado un buen perfil de seguridad, inmunogenicidad y estabilidad genética, a la vez que requiere sólo una única dosis para generar inmunidad. Se han obtenido candidatas vacunales frente a los otros serotipos mediante la introducción de la misma delección (rDEN1delta30; rDEN2delta30; rDEN3delta30)¹¹ que están en proceso de evaluación.

Por ahora sólo existe disponible internacionalmente una vacuna comercial de virus inactivados frente a la encefalitis japonesa (cepa Nakayama). Sin embargo en China se producen y comercializan dos cepas atenuadas del virus de la encefalitis japonesa, un virus derivado de la cepa P3 y la cepa atenuada SA14-14-2, obtenida mediante pases sucesivos en células primarias de riñón de hámster. Esta última fue autorizada para uso humano en China en 1988, donde se han administrado más de 30 millones de dosis con un buen perfil de eficacia y seguridad¹². Debido a que la cepa SA14-14-2 se produce en una línea celular aún no certificada para la producción de vacunas, su uso no está autorizado en otros países, y su acreditación depende exclusivamente de la obtención de esta certificación.

Vacunas quiméricas

El desarrollo de vacunas quiméricas frente a flavivirus se basa en la observación de que genes estructurales de un flavivirus pueden ser remplazados por los genes homólogos de otro flavivirus en el genoma viral. La quimerización por sí misma conlleva un cierto grado de atenuación del virus parental y una reducción de la patogenicidad del virus donante de los genes estructurales. La viabilidad de este abordaje se demostró por primera vez en construcciones intertípicas de quimeras de dengue, en las que toda la región estructural (preM/M-C-E) o los genes de las proteínas de la envuelta (prM-E), o el gen NS1 de un virus DEN4 salvaje fueron remplazados por los correspondientes genes de virus salvajes o mutantes de laboratorio de los virus DEN1, DEN2, y DEN3. Estas quimeras tienen las características antigénicas esperadas y han demostrado capacidad para inducir una respuesta inmune neutralizante en monos¹³.

Un desarrollo similar utiliza como esqueleto del virus quimérico una variante atenuada de DENV2, la cepa PDK-53, en la que la atenuación se debe principalmente a cambios de nucleótidos en el extremo 5' no codificante del genoma, así como a cambios aminoacídicos en las proteínas NS3 y NS1¹⁴. Del mismo modo se ha utilizado la cepa (rDEN4delta30) de DEN4, que contiene una delección de 30 nucleótidos en su extremo 3' no codificante, para la generación de quimeras con marcadores fenotípicos de atenuación localizados fuera de la región codificante de las proteínas estructurales^{15,16}. Todas estas quimeras han demostrado mejor perfil de seguridad que los virus salvajes donadores de las proteínas estructurales homólogas.

El diseño más prometedor de virus quiméricos en el desarrollo de vacunas frente a flavivirus es el llamado sistema ChimeriVax™ desarrollado por los laboratorios Acambis Inc. En este sistema, los genes codificantes de las proteínas de la envuelta del flavivirus frente al que se pretende dirigir la respuesta inmune rempazan a sus genes homólogos en la cepa vacunal 17D de la fiebre amarilla (YF17D). El virión resultante contiene por tanto estructuras implicadas en la adhesión y entrada del virus en la célula pertenecientes al flavivirus diana, así como sus determinantes antigénicos y epítomos de respuesta celular frente al virus, mientras que la nucleocápside, las proteínas no estructurales, y los extremos no codificantes del genoma

viral pertenecen a la cepa YF17D. En cuanto a la respuesta inmune generada, se ha demostrado como la replicación de las quimeras en el hospedador induce la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes muy duraderos, al mismo tiempo que la expresión intracelular de las proteínas de la envuelta en las células infectadas, sirve como diana para la inducción de la respuesta inmune citotóxica.

El sistema ChimeriVax™ posee además otras características adicionales que suponen una ventaja frente a otros desarrollos, como el hecho de que el virus quimérico no contiene el antígeno más importante del virus de la fiebre amarilla (glicoproteína E), lo que supone que la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a esta proteína debido a inmunizaciones previas no interfiere con la infectividad de los virus quiméricos, al contrario de lo que ocurre cuando ciertos adenovirus o el virus vaccinia son utilizados como virus recombinantes de uso vacunal¹⁷. Asimismo, la existencia de una respuesta inmune de memoria frente a la FA puede amplificar la producción de anticuerpos heterólogos haciendo que la respuesta a la vacunación sea más rápida¹⁸. Sin embargo, hay que considerar que una respuesta inmune específica frente al virus de la fiebre amarilla podría incrementar la replicación del virus vacunal debido a un fenómeno de amplificación de la infección mediada por anticuerpos descrito para algunos flavivirus¹⁹.

En cuanto a la seguridad de estas vacunas, hay que tener en cuenta que el virus del que se parte es un virus atenuado (YF17D) de probada seguridad, aunque la descripción reciente de la existencia de efectos adversos tras vacunación frente a fiebre amarilla puede generar cierta preocupación ante su utilización como virus recombinante. Esta virus tiene un viscerotropismo marcadamente inferior a la cepa original de la que procede (Asibi), aunque mantiene cierto grado de neurotropismo. La sustitución de los genes preM-E que codifican proteínas implicadas en la adhesión a determinados receptores celulares podría alterar el tropismo del virus y por tanto aumentar su potencial neurotrópico, especialmente cuando el virus donador de estos genes es un virus causante de enfermedad neurológica como el virus West Nile o la encefalitis japonesa¹⁹.

El primer modelo desarrollado usando la cepa YF17D como vector para inducir una respuesta inmune efectiva frente a otro flavivirus fue dirigido frente al virus de la encefalitis japonesa (ChimeriVax™-JE) utilizando los genes estructurales de la cepa salvaje Nakayama o de la cepa atenuada SA14-14-2. Este desarrollo entró en ensayos clínicos en el año 2.000, al mismo tiempo que se inició el desarrollo de virus quiméricos de los cuatro serotipos de dengue (ChimeriVax™-DEN) y el virus West Nile (ChimeriVax™-WNV).

En los ensayos clínicos llevados a cabo hasta el momento, ChimeriVax™-JE ha demostrado ser un candidato vacunal altamente inmunogénico con un alto grado de tolerancia⁷. A su vez, se han desarrollado candidatos vacunales frente a los cuatro serotipos de virus dengue; ChimeriVax™-DEN2 construido mediante la inserción de los genes estructurales de la cepa salvaje PUO-218 de DEN2, ChimeriVax™-DEN1 (cepa salvaje DEN1-PUO 359); ChimeriVax™-DEN3 (cepa salvaje DEN3-PaH881/88) y ChimeriVax™-DEN4 (cepa salvaje DEN4-1228). Estas quimeras han sido utilizadas como vacuna tetravalente y se ha demostrado que se producen tasas de

replicación diferentes para cada virus, lo que provoca títulos de anticuerpos neutralizantes heterogéneos entre los distintos serotipos, al igual que ocurre con otros tipos de vacunas, siendo este uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en el desarrollo de vacunas frente al dengue²⁰.

En el caso de WN, el virus quimérico desarrollado, ChimeriVax™-WNV, contiene los genes que codifican la prM-E de la cepa NY99 tras atenuación de la misma mediante mutaciones en la proteína E. Este virus está siendo actualmente evaluado en ensayos preclínicos en primates no humanos, y se está valorando su aplicación como vacuna de uso veterinario en caballos²¹.

Vacunas de ácidos nucleicos o DNA

La inmunización con plásmidos de DNA que contienen genes de flavivirus, se basa en que la inoculación intramuscular o intradérmica de estos plásmidos, que contienen promotores de expresión eucarióticos, genera la producción intracelular de las proteínas del virus codificadas, y por tanto facilita la inducción de una respuesta inmune específica tanto de tipo humoral como de tipo celular²².

Entre las ventajas asociadas a estas vacunas encontramos su facilidad de producción, su estabilidad, y la posibilidad de diseñar específicamente los antígenos frente a los que se quiere dirigir la respuesta inmune. Asimismo, y en contra de los que ocurre en las vacunas quiméricas o virales multivalentes, en las vacunas DNA se produce una menor competencia antigénica, y no se ven afectadas por diferencias replicativas, lo que las hace especialmente útiles en el desarrollo de vacunas que deban conferir protección frente a diversos virus al mismo tiempo. El mayor inconveniente de este tipo de vacunación es que se necesita inocular grandes cantidades de DNA, a lo que se une el riesgo de integración cromosómica del mismo. El hecho de que la expresión en los plásmidos de uso vacunal esté dirigida mediante potentes promotores eucarióticos podría teóricamente influir en la regulación de la expresión de determinados oncogenes celulares. Asimismo, existen ciertas reservas hacia el potencial de las vacunas de DNA para generar fenómenos de autoinmunidad relacionados con la presencia de anticuerpos frente al DNA de doble cadena.

Entre las proteínas de flavivirus más utilizadas en vacunas de DNA, la proteína E es el inmunógeno más importante. Estudios recientes sobre la eficacia de esta proteína en vacunas frente al dengue han demostrado que para asegurar una correcta respuesta frente a este antígeno es necesaria la presencia de la proteína prM, mientras que el 20% del extremo carboxiterminal de la proteína E puede ser eliminado facilitando la liberación de la proteína expresada intracelularmente y mejorando así su presentación antigénica^{23,24}.

Se ha ensayado en caballos una vacuna de DNA que expresa los genes prM-E del virus West Nile. Una de las mayores ventajas de este tipo de vacuna frente a las vacunas atenuadas o quiméricas radica en que la respuesta inmune generada se dirige exclusivamente frente a las proteínas codificadas en el plásmido vacunal, lo que

permite la diferenciación entre animales vacunados de aquellos infectados por el virus salvaje, lo que es interesante en términos de vigilancia epidemiológica²⁵.

La inmunización con un plásmido de DNA que expresa la proteína E de la EJ ha demostrado en ratones que, a pesar de no generar una buena respuesta humoral, si es capaz de conferir protección frente a la infección mediante una potente respuesta de tipo celular²⁶.

Conclusiones

En conclusión, a pesar de haberse realizado un gran avance en el desarrollo de vacunas frente a aquellos flavivirus que causan la mayor carga de enfermedad a nivel global (DENV, WNV y JEV) hoy en día no existe un claro modelo vacunal que asegure el control de estas infecciones a corto plazo. En la actualidad existen candidatos vacunales para los tres virus muy prometedores, pero quedan por resolver ciertas dudas acerca de su eficacia y seguridad. Por el momento son necesarias mejoras en las vacunas desarrolladas y sus formulaciones que permitan un aumento en la inmunogenicidad de las vacunas sin que esto suponga un aumento de la reactogenicidad en aquellos grupos de individuos sobre los que la vacunación estaría más indicada (niños y personas mayores), a la vez que es necesario evaluar su seguridad en individuos inmunocomprometidos. Por último, existen muy pocos estudios dirigidos a conocer la interacción que la presencia de inmunidad previa frente a otros flavivirus pueda tener en el desarrollo de la inmunidad específica frente al virus vacunal, y su posible implicación en la sensibilización de los individuos a la aparición de efectos adversos severos tras la vacunación, o a formas más graves de enfermedad en la infección natural.

Por todo ello en los años venideros no sólo ha de avanzarse en el diseño de antígenos vacunales, sino que todo ello deberá ir acompañado de un mejor conocimiento de los mecanismos de inducción de la respuesta inmune y de los procesos de inmunopatología que acompañan a las infecciones por arbovirus.

Bibliografía

- Gubler DJ, Roehrig JT. Arboviruses. En: Mahy BWJ, et al. (eds). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Oxford: Oxford University Press 1998:579-600.
- Barrett AD. Current status of flavivirus vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 2001;951:262-71.
- Monath TP. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:553-74.
- Guirakhoo F, et al. Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology* 1999;257:363-72.
- Gritsun TS, et al. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* 2003;57:129-46.
- Harabacz I, et al. A randomized phase II study of a new tick-borne encephalitis vaccine using three different doses and two immunization regimens. *Vaccine* 1992;10:145-50.
- Pugachev KV, et al. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int J Parasitol* 2003;33:567-82.
- Kinney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology* 2001;44:176-97.
- Kanesa-athan N, et al. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine* 2001;19:3179-88.
- Saluzzo JF. Empirically derived live-attenuated vaccines against dengue and Japanese encephalitis. *Adv Virus Res* 2003;61:419-43.
- Durbin AP, et al. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:405-13.
- Chambers TJ, et al. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting. *Vaccine* 1997;15:1494-502.
- Lai CJ, et al. Evaluation of molecular strategies to develop a live dengue vaccine. *Clin Diagn Virol* 1998;10:173-9.
- Huang CY, et al. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol* 2003;77:11436-47.
- Durbin AP, et al. The live attenuated dengue serotype 1 vaccine rDEN1Delta30 is safe and highly immunogenic in healthy adult volunteers. *Hum Vaccin* 2006;2:167-73.
- Durbin AP, et al. rDEN2/4Delta30(ME), a live attenuated chimeric dengue serotype 2 vaccine is safe and highly immunogenic in healthy dengue-naive adults. *Hum Vaccin* 2006;2:255-60.
- Kanesa-athan N, et al. Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus-poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* 2000;19:483-91.
- Guirakhoo F, et al. Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin* 2006;2:60-7.
- Broom AK, et al. Immunisation with gamma globulin to Murray Valley encephalitis virus and with inactivated Japanese encephalitis virus vaccine as prophylaxis against Australian encephalitis: evaluation in a mouse model. *J Med Virol* 2000;61:259-65.
- Guirakhoo F, et al. Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology* 2002;298:146-59.
- Arroyo J, et al. Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. *Trends Mol Med* 2001;7:350-4.
- Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 2005;54:3-20.
- Raviprakash K, et al. Immunogenicity of dengue virus type 1 DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein. *Vaccine* 2000;18:2426-34.
- Raviprakash K, et al. A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. *Virology* 2006;353:166-73.

25. Davis BS, *et al.* West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol* 2001;75:4040-7.
26. Ashok MS, Rangarajan PN. Immunization with plasmid DNA encoding the envelope glycoprotein of Japanese Encephalitis virus confers significant protection against intracerebral viral challenge without inducing detectable antiviral antibodies. *Vaccine* 1999;18:68-75.