



**CAPÍTULO 8**

# **PRODUCCIÓN DE VACUNAS PARA LA PREVENCIÓN DE LAS IRA: PANORAMA REGIONAL**

*Dr. Akira Homma, Dr. José Luis DiFabio, Dr. Ciro A. de Quadros*

## **I. INTRODUCCIÓN**

**L**a victoria espectacular alcanzada por la salud pública con la erradicación de la viruela de forma global y la del poliovirus salvaje en el hemisferio occidental (1), ha causado un impacto enorme en la medicina preventiva. Ello ha demostrado que las vacunas son instrumentos fundamentales para la prevención de enfermedades inmunoprevenibles y también que la vacunación constituye una de las intervenciones en salud con la relación costo-efectividad más alta (2).

En los últimos años, con el fortalecimiento de los programas de inmunización en los países de América Latina y Caribe, se han presentado resultados igualmente espectaculares como es el caso de la eliminación del sarampión lograda por el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (3). Se han llevado a cabo, a la vez, campañas de vacunación no selectivas en niños desde 9 meses hasta jóvenes de 14 años de edad, permitiendo cubrir la mayor parte de la población susceptible. Esta estrategia se inició en Cuba, continuó en el Caribe de habla inglesa y después se extendió a todos los países de América Latina.

Datos recientes muestran una brusca disminución del número de casos de sarampión; en algunos países no se ha notificado de casos en el transcurso de un período largo, lo que indicaría la posible interrupción de la cadena de transmisión del virus. Para mantener esta situación y alcanzar la eliminación del sarampión del hemisferio occidental, se propone el fortalecimiento de dos actividades básicas: la primera es la vigilancia epidemiológica mediante la red de laboratorios, utilizando tecnologías avanzadas para las pruebas serológicas y viroló-

gicas, y la segunda es la vacunación masiva y periódica de grupos de niños, cuya edad (generalmente menores de 5 años) se ha establecido de acuerdo a los datos de la situación epidemiológica del sarampión en cada país (4).

En los últimos 15 años se ha observado en la Región de las Américas un aumento notable de la cobertura de vacunación contra todas las enfermedades incluidas en el PAI, con un descenso importante en las tasas de morbilidad y mortalidad de las enfermedades correspondientes.

Las tasas de morbilidad de otras enfermedades inmunoprevenibles determinantes de las infecciones respiratorias agudas (IRA), por ejemplo, fueron en 1980 y 1994, de 20,68 y 2,58 por 100,000 habitantes para tos ferina; de 0,98 y 0,11 para difteria, y de 66,61 y 3,12 para sarampión (5). Los datos de la Región obtenidos a través del Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI) de la OPS, se presentan en las figuras 1, 2 y 3 para una visualización mejor del impacto determinado por la vacunación.

En la figura 1 se presenta el número anual de casos notificados de sarampión y la cobertura de vacunación en el período de 1960 a 1994; en las figuras 2 y 3, el número de casos anuales notificados de tos ferina y difteria con la cobertura de vacunación en los niños menores de 1 año, durante los períodos de 1978 a 1994, respectivamente.

Por otro lado, el BCG que se utiliza en los recién nacidos de la Región también alcanzó altos niveles de cobertura; su importancia en la prevención de la meningitis tuberculosa es conocida ampliamente (6).

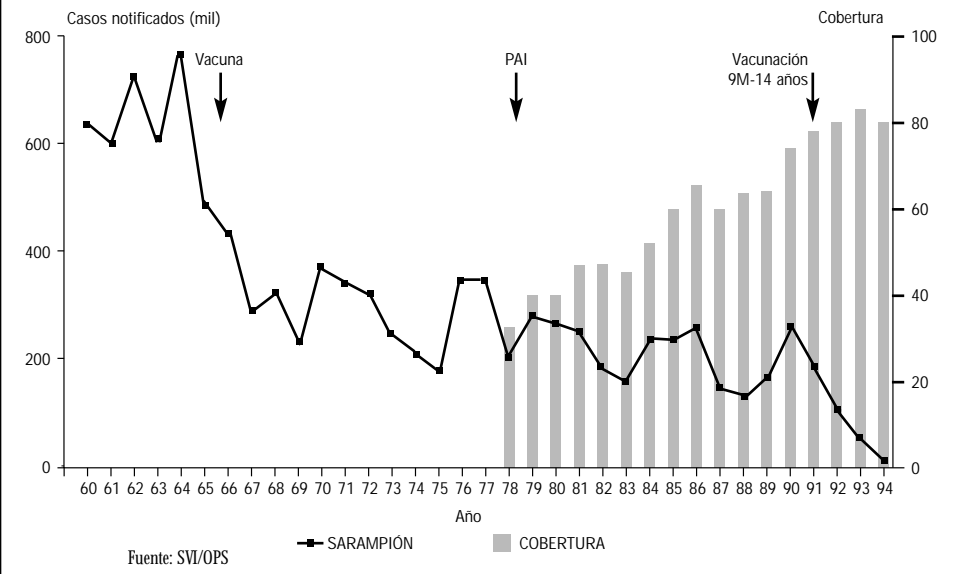
Además de las vacunas usadas en la rutina de los programas de inmunización, existen otras vacunas importantes que confieren protección contra los agentes etiológicos de las enfermedades que determinan las IRA. Entre ellas pueden mencionarse principalmente la vacuna contra el *Streptococcus pneumoniae* con 23 serotipos, la cual se recomienda para ancianos y personas inmunosuprimidas (7); la vacuna contra el *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) conjugada (8), que se incorporó recientemente al programa rutinario de vacunación en Estados Unidos; la vacuna contra el virus de la influenza, preparada con virus inactivado o sus componentes (9), que se emplea especialmente en los países de clima templado y frío; la vacuna contra la rubéola, que se emplea en forma combinada con la del sarampión y la parotiditis; la vacuna de polisacáridos contra la *Neisseria meningitidis* serogrupos A, C, W135 y Y, que se recomienda para viajeros a áreas epidémicas o hiperendémicas, o bien en casos de brotes y epidemias (10).

El Instituto Finlay de Cuba ha desarrollado una vacuna contra la meningitis meningocócica, serogrupo BC, con una eficacia de 75 a 85% para niños mayores de 4 años, pero de eficacia reducida en niños menores de 4 años (11, 12).

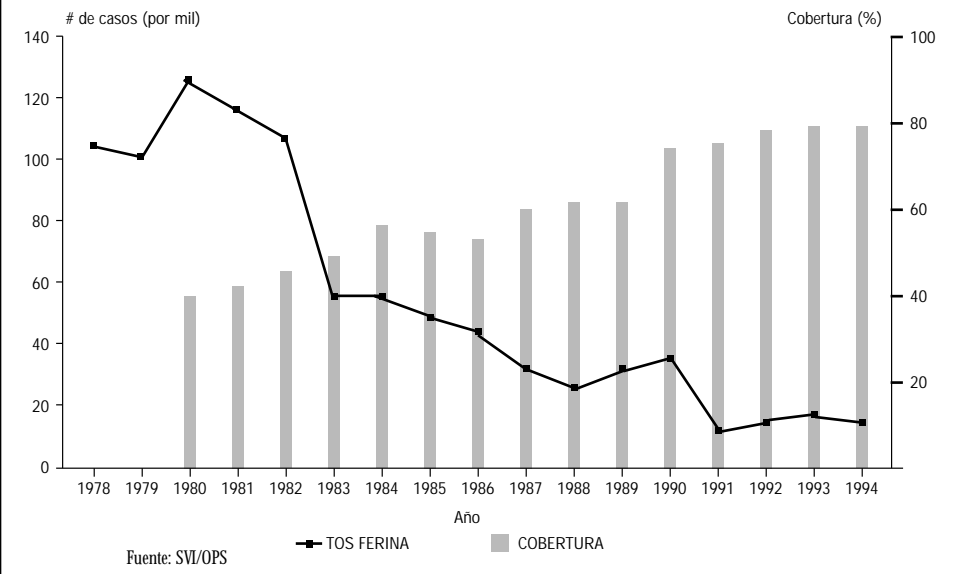
La vacuna pertussis acelular se utiliza rutinariamente desde 1981 en niños mayores de 18 meses en Japón (13). Esta vacuna ha sido autorizada también en Estados Unidos, pero solamente para utilización como dosis de refuerzo. Los resultados de los estudios clínicos que se llevan a cabo decidirían el futuro de estas vacunas.

Es importante también la tendencia a desarrollar nuevas vacunas combinadas, como en el caso de la vacuna DTP combinada con Hib conjugada, ya autorizada en Estados Unidos (14). La com-

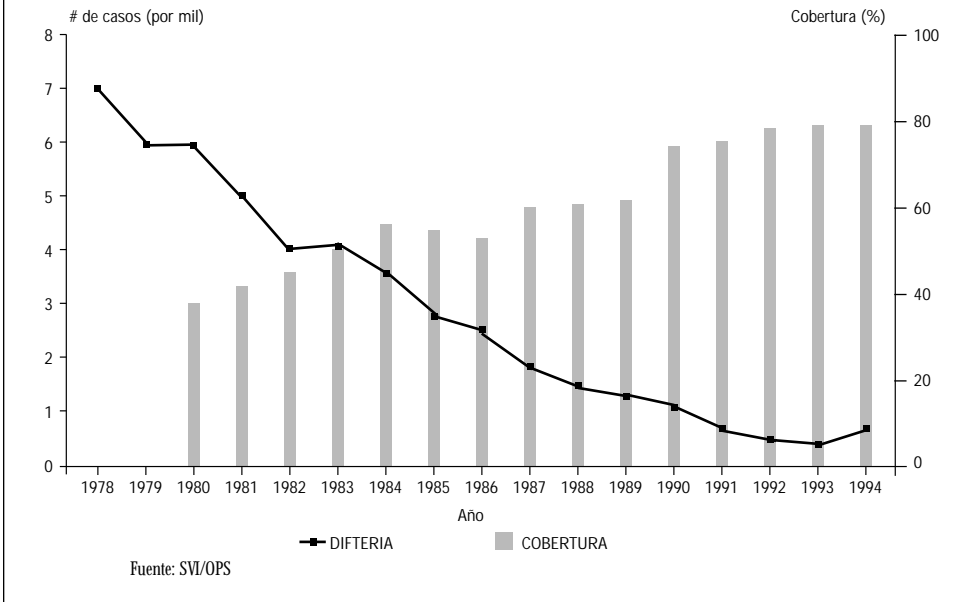
**Figura 1: Número de casos notificados de sarampión y cobertura de los menores de un año con antisarampionosa Américas, 1978-1994**



**Figura 2: Número de casos notificados de tos ferina y cobertura de los menores de un año con tres dosis de DPT Américas, 1978-1994**



**Figura 3: Número de casos notificados de difteria y cobertura de los menores de un año con tres dosis de DPT  
Américas, 1978-1994**



binación de varios antígenos en una sola vacuna facilita la operación de inmunización ya que disminuye el número de inyecciones de vacunas y por lo tanto el costo operativo de la vacunación.

## II. INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO DE VACUNAS

En este campo, los trabajos se han concentrado tanto en el perfeccionamiento de las vacunas existentes como en el desarrollo de vacunas nuevas. En el primer caso se encuentra la termoestabilidad de la vacuna contra el sarampión, que en los últimos años se ha mejorado notablemente. Esto permite que la mayoría de las vacunas existentes actualmente en el mercado internacional mantenga su potencia y capacidad inmunogénica incluso cuando son sometidas a temperaturas inadecuadas de almacenamiento. La prueba de termoestabilidad acelerada, en la cual la vacuna se somete a una temperatura de 37° C por siete días, se ha incluido en el control de calidad de estas vacunas, precisamente para asegurar su característica de termoestabilidad (15). Además, se ha estudiado la utilización de vacunas con altos títulos de virus (de 10 a 100 veces mayores que los títulos de las vacunas rutinarias de las cepas Edmonston-Zagreb y Schwarz), para superar la inmunidad materna en niños de 6 meses de edad, lo cual no resultó favorable debido a la alta mortalidad ocurrida en niños inoculados con este tipo de vacuna (16).

Las investigaciones para el desarrollo de nuevas vacunas contra el sarampión incluyen la utilización de virus recombinantes como vectores tales como los virus de la vaccinia, avipox y baculovirus, los cuales expresan las proteínas estructurales H (hemaglutinina) y F (fusión) del virus del sarampión (17, 18, 19), además del desarrollo de cepas atenuadas genéticamente. Por otro lado, la protección provista por las vacunas experimentales a base de la glicoproteína viral incorporada al complejo inmuno-estimulante (del inglés ISCOMs = *immuno-stimulating complexes*) (20), se ha demostrado en animales de laboratorio. Recientemente, en función de la importancia de esta enfermedad y de los nuevos conocimientos acumulados sobre su patología y sobre el virus del sarampión, además de las prácticas de inmunización, se revisó y discutió extensamente el tema (21) en una actividad apoyada por la "Iniciativa en Pro de la Vacuna Infantil" (CVI por sus siglas en inglés: *Children's Vaccine Initiative*) (22).

La vacuna pertussis acelular ha recibido especial atención en los últimos años. Recientemente, finalizaron en Suecia e Italia estudios de eficacia de las nuevas formulaciones de esta vacuna. Los resultados de estos estudios, llevados a cabo en niños de 2, 4 y 6 meses de edad, se dieron a conocer en forma simultánea en julio de 1995, por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos, por el Instituto de Control de Enfermedades Infecciosas de Suecia y por el Instituto Superior de Salud de Italia. El estudio de eficacia se organizó en forma aleatoria, a doble ciego y con placebo, utilizando cuatro vacunas acelulares. Tres vacunas pertussis acelulares arrojaron resultados entre 84 y 85% de protección y un significativo número de efectos adversos más bajos que la vacuna formulada con células enteras inactivadas de *B. pertussis*. Una cuarta vacuna acelular presentó protección de 58%. En estudios recientes de eficacia, en Italia, Alemania, Suecia y Senegal, la vacuna de células enteras inactivadas de *B. pertussis* presentó protección similar a las del tipo acelular. Todas las vacunas de pertussis acelular tenían en su formulación la toxina de pertusis inactivada. Otros componentes presentes incluyen aglutinógenos, hemaglutinina filamentosa y pertactina o proteína 69kD que es una proteína de membrana externa (23-27).

No obstante estos adelantos, la existencia de más de una centena de posibles agentes infecciosos virales y bacterianos causantes de IRA, dificulta el desarrollo de una vacuna específica para cada agente etiológico de las enfermedades incluidas en las IRA. Algunos de estos agentes como el *S. pneumoniae*, tienen más de 84 serotipos; el virus parainfluenza tiene cuatro serotipos; el *H. influenzae*, seis serotipos incluyendo el tipo b y las cepas no tipificables; los estreptococos se clasifican en grupos del A al O en base a la composición química del antígeno/grupo-específico que a su vez, se clasifica en tipos de acuerdo a las diferencias antigénicas de la membrana más externa de la bacteria y que van desde el 1 al 80 (28).

Teóricamente, sería necesario desarrollar una vacuna específica para cada uno de los tipos y subtipos a fin de proporcionar una protección inmunológica total. Sin embargo, en la práctica, no existe interés en desarrollar vacunas contra todos los agentes infecciosos determinantes de la IRA, limitándose a aquellos agentes que determinan una tasa mayor de morbilidad y letalidad.

En lo que respecta al *S. pneumoniae*, es importante señalar que la vacuna existente a base

de polisacáridos de 23 serotipos, se recomienda para adultos ya que no ofrece protección a los niños menores de 2 años que es la edad en la cual la enfermedad es más crítica. Por otro lado, la selección de los serotipos se determinó tomando en cuenta los resultados de los estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos y en algunos países de Africa. Los serotipos más importantes que afectan a los niños suelen ser diferentes a los que se encuentran en los adultos. De lo anterior, se infiere que no se sabe con certeza si los serotipos más importantes para América Latina se encuentran presentes en la vacuna existente, o si es necesaria la presencia de otros serotipos en la vacuna que se utilizaría en la Región.

La OPS, mediante el Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI) y con el apoyo financiero de la Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (CIDA), lleva a cabo un estudio con el propósito de determinar la distribución de los serotipos de *S. pneumoniae* responsables de las neumonías en niños menores de 5 años en seis países de América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México y Uruguay). Se cuenta al momento con información parcial de los resultados y se espera contar para fines de 1995 con los resultados que podrían definir cuales son los serotipos más importantes para la formulación de la vacuna contra *S. pneumoniae* en los países de la Región.

Al igual que con otras vacunas a base de polisacáridos, estos antígenos no son capaces de inducir una respuesta inmune en niños menores de 2 años. Esta falta de respuesta probablemente se debe al hecho de que estos polisacáridos son antígenos T independientes, por lo tanto no utilizan los linfocitos T ayudadores para estimular a las células B inmaduras (29). En los últimos años, se ha utilizado una alternativa tecnológica para convertir estos antígenos T independientes en T dependientes. La conjugación covalente de un polisacárido con una proteína portadora, como se hizo con el polisacárido capsular del *H. influenzae* tipo b hacia diversas proteínas, ha producido vacunas muy eficaces y útiles para niños menores de 2 años (30, 31).

Una serie de proteínas tales como el toxoide tetánico (32), el toxoide diftérico, la proteína diftérica CRM<sub>197</sub> (Cross Reacting Mutant 197 del *Corynebacterium diphtheriae*) (33), y el complejo proteínico de la membrana externa de la *Neisseria meningitidis* grupo B (OMP) (34), se han usado como proteínas portadoras para conjugar el polisacárido del *H. influenzae* tipo b. Este mismo principio están aplicando varios grupos de investigación para producir vacunas contra el *S. pneumoniae* (35, 36).

La dificultad particular del desarrollo de una vacuna conjugada en el caso del *S. pneumoniae*, es que no se trata de la preparación de un único serotipo. Las formulaciones de esta vacuna deben incluir múltiples serotipos que puedan cubrir al menos entre 70 y 80% de los serotipos responsables de enfermedades invasivas por *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se han planteado dos formulaciones que incluyen los serotipos A: 4, 6, 9, 14, 18C, 19F y 23F, y B: 1, 5, 6, 14, 18C, 19F y 23F. De acuerdo a los resultados preliminares de distribución de serotipos de *S. pneumoniae* en la Región, la formulación A cubre 50% de los serotipos y la B 70%.

A pesar de que se intenta una vacuna de una única aplicación, se debe preparar, producir y controlar varios conjugados de polisacárido-proteína o sea varias vacunas individuales. Como el proceso de producción de un conjugado polisacárido-proteína es complicado, es de espe-

rarse que estas vacunas sean muy caras. Existe además una serie de problemas científicos y técnicos que deben resolverse, tales como el número de conjugados polisacárido-proteína que pueden combinarse usando la misma proteína portadora; los problemas de interferencia entre los distintos antígenos, las dosis y los esquema de inmunización, entre otros.

La necesidad de incluir varios serotipos en una vacuna conjugada contra *S. pneumoniae* ha llevado a buscar otras opciones. Durante los últimos años, varios investigadores han trabajado con antígenos comunes, o sea antígenos idénticos o similares, presentes en todos los serotipos de neumococos. Esto permitiría conferir una protección más amplia; si son proteínas, podrían utilizarse además métodos de tecnología recombinante para obtenerlos en mayor cantidad, pues por su naturaleza T dependiente conferirían protección a temprana edad. Los resultados obtenidos hasta el momento en animales con tres antígenos en particular, PspA (proteína A de superficie) (37), neumolisina (38) y la proteína neumocócica 37KD (39), son muy prometedores.

El Informe Jordan (40) describe las investigaciones que se llevan a cabo para el desarrollo de otras vacunas como por ejemplo las vacunas en contra del grupo A y B del estreptococo, el *Mycoplasma pneumoniae*, la *Pseudomona aeruginosa*, y el desarrollo de una nueva cepa para la inmunización contra la tuberculosis, la cepa del *Mycobacteriae vaccae*, cuya utilización se estudia en referencia a la forma inactivada como adyuvante del BCG o como vacuna candidata. En estudios de campo realizados en Rumania, utilizando una dosis de la cepa *M vaccae* más quimioterapia, se demostró que esta terapia es significativamente efectiva en enfermos con tuberculosis resistente a drogas.

Se han alcanzado importantes avances en el desarrollo de la vacuna contra el estreptococo del grupo B, del cual se han identificado seis tipos que corresponden a seis polisacáridos diferentes. En niños, que es el grupo afectado más importante por esta enfermedad, estos polisacáridos no son inmunogénicos. Por lo tanto, debe vacunarse a la mujer en gestación o desarrollar una vacuna que sea efectiva en niños. La conjugación de los polisacáridos a una proteína, como en el caso de la vacuna Hib conjugada, se encuentra en proceso de desarrollo (41, 42).

La estrategia para el desarrollo de la vacuna contra el virus parainfluenza (con cuatro serotipos), incluye dos formas: en una se utilizan la proteína purificada de membrana externa, la glicoproteína F (fusión), la H (hemaglutinina) y la N (neuraminidasa) como inmunógenos. La segunda busca la atenuación de la cepa del virus, encontrándose disponibles actualmente algunas vacunas candidatas que están en estudio clínico para efectuar dicho proceso. De éstas, una cepa se deriva de un virus bovino y otras son cepas atenuadas, en las que se utiliza la técnica de adaptación de los virus en cultivos celulares por pasos sucesivos a bajas temperaturas.

Las primeras vacunas desarrolladas en la década de 1960 contra el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) inactivado en formalina, presentaron reacciones adversas de gran importancia (43). En la actualidad, se estudian al respecto algunos de sus componentes como las glicoproteínas virales purificadas F (fusión) y G (adhesión), las cuales han demostrado capacidad inmunogénica en modelos animales.

En relación a la vacuna contra la influenza, existe la forma inactivada y la de virus atenuados. La vacuna inactivada puede ser por virus completo e inactivado en formalina o bien por virus desensamblado. En Estados Unidos se utiliza solamente las vacunas inactivadas, y en Europa, particularmente en Rusia, se emplea la vacuna de virus vivos atenuados. Sin embargo, las vacunas existentes producen corta inmunidad, y debido a los cambios frecuentes de antigenicidad del virus, debe repetirse la vacunación cada año con la cepa indicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las variaciones antigénicas (*drift* con más frecuencia y *shift*) del virus de la influenza del tipo A, que tiene tres subtipos, del tipo B y del tipo C, son las que hacen necesaria la revisión anual para establecer la composición de la cepa del virus en la vacuna para el período del virus de influenza siguiente. Para el período 1995-1996, las cepas recomendadas para constituir la vacuna son la A/Johannesburg/33/94 (H3N2), la A/Singapore/6/86 (H1N1) y la B/Beijing/184/93 (44).

Varios grupos participan en el desarrollo de una vacuna más potente contra la influenza (45). Algunos grupos buscan desarrollar cepas atenuadas de virus adaptadas al cultivo por pasos sucesivos a bajas temperaturas (46). Otras técnicas que se emplean se basan en métodos de biología molecular e ingeniería genética. Se ha insertado los genes virales en bacterias o en levaduras de modo que produzcan péptidos con la secuencia de aminoácidos de los epitopos<sup>1</sup> específicos del virus, los cuales pueden purificarse para utilizarlos como vacunas (47-49).

La tecnología de ingeniería genética y la biotecnología se usan en el proceso de desarrollo de nuevas vacunas y en el perfeccionamiento de las vacunas existentes (50). Además, el desarrollo enorme de las ciencias básicas como la bioquímica, la química, la inmunología y la biología molecular, han determinando una gran acumulación de conocimientos, especialmente en los últimos dos decenios. Esto también ha permitido la mejor comprensión de la biología de los agentes etiológicos y de la respuesta inmune a nivel molecular en los huéspedes.

Con el empleo de estos conocimientos y de instrumentos modernos, se exploran varias y diferentes posibilidades de perfeccionamiento en la calidad de las vacunas existentes y en el desarrollo de nuevas formas de vacunas combinadas con mayor variedad de antígenos protectores. Muchos grupos trabajan en el desarrollo de vacunas a base de péptidos sintéticos (51), como extensión lógica de las investigaciones llevadas a cabo para identificar los sitios de los microorganismos responsables de la inducción de la respuesta inmune protectora (epitopos). La determinación de la secuencia de los aminoácidos de los epitopos, hace posible la producción de estos segmentos de la molécula de proteína en forma sintética, los cuales se usarán para la producción de la vacuna.

El dominio de la tecnología de manipulación a nivel molecular ha permitido que los investigadores diseñen y construyan antígenos de tal estabilidad genética que la reversión a su virulencia previa es prácticamente imposible (52). También se estudian formas para utilizar los virus como vectores de otros genes de interés, insertando en la región no esencial del genoma del virus uno o varios genes de otros agentes infecciosos, lo cual resulta en el desarrollo de

---

1 Sitios reconocidos de un antígeno

una respuesta inmunológica y protección adicional también contra los genes insertados en el genoma del vector (53).

Los avances de la biología molecular y de la ingeniería genética se reflejan de forma cada vez más importante en el desarrollo de nuevas formas de inmunizaciones tales como las vacunas genéticas. Recientemente se demostró que al inocularlos por vía intramuscular en ratones, los genes de hemaglutinina del virus de la influenza insertados en plasmideos producen anticuerpos contra la hemaglutinina y protegen contra el llamado “reto antigénico” letal utilizando virus homólogos, pero no protegen contra el reto del virus heterólogo. Sin embargo, cuando se inocular el gen de la nucleoproteína del virus de influenza, se obtiene la protección contra el reto del virus homólogo y heterólogo (54). Ciertas observaciones preliminares indican que si se utiliza el gen adecuado, este método puede presentar una ventaja enorme sobre las otras vacunas dada su capacidad de proteger, con una sola vacunación, contra varios subtipos o serotipos del agente infeccioso de una enfermedad determinada.

También se ha destacado como una ventaja de las vacunas genéticas la inducción de inmunidad celular más larga y efectiva, a raíz del proceso de síntesis y ensamble de los antígenos que se desarrollan intracelularmente en la región en la cual las moléculas de la clase I del complejo principal de histocompatibilidad (del inglés *major histocompatibility complex*, *MHC*) se codifican, estimulando como resultado a las células T citotóxicas y desarrollando inmunidad celular. Mientras tanto, los antígenos virales o bacterianos inyectados en los tejidos, se sintetizan y se ensamblan con la clase II de las moléculas del *MHC*, estimulando primariamente a las células T “ayudadoras” y a la inmunidad humoral.

Con respecto a la vacuna de ADN, el principal obstáculo para su desarrollo se presenta con las autoridades regulatorias, las cuales solicitan documentación extensa y la garantía de que el material genético inyectado en el músculo es transitorio y no se incorpora a los genes de las células somáticas, lo cual podría traer consecuencias imprevisibles.

Otro método nuevo utiliza plantas transgénicas como sistema para la producción de antígenos y proteínas inmunogénicas. Muchos grupos de investigadores realizan este tipo de estudios y han presentado resultados sugiriendo la posibilidad de utilizar plantas tratadas genéticamente y virus de plantas para producir vacunas contra enfermedades humanas tales como el cólera, la fiebre tifoidea, la hepatitis B, y el SIDA entre otras (55-57). A largo plazo, se estima que sería posible incluir algunas vacunas dentro de las plantas consumidas como alimentos de una dieta normal. Aunque estas investigaciones están todavía en una etapa inicial, la producción de vacunas para el uso humano en plantas podría tener ventajas significativas sobre los métodos que se usa actualmente en la producción de vacunas, dada la posibilidad de incrementar la producción y como consecuencia, de reducir el costo de los procesos de producción. Además de las vacunas, es también factible producir los anticuerpos monoclonales en plantas tratadas genéticamente (58).

Con algunas raras excepciones, casi todos estos estudios se han hecho en los países desarrollados según la prioridad conferida en la gama de sus necesidades. Se puede decir entonces, sin temor a equivocarse, que los países de América Latina y el Caribe deberán con-

tinuar por mucho tiempo como receptores pasivos de productos desarrollados y producidos en países tecnológicamente avanzados.

La inversión de los países industrializados en las actividades de investigación, desarrollo tecnológico y producción de vacunas, tanto por medio de sus laboratorios privados como a través de los del sector público, es enorme. Solamente el sector público de Estados Unidos invierte 250 millones de dólares y el sector privado cerca de 100 millones en dichas actividades (59). Estados Unidos mantiene el Programa para el Desarrollo Acelerado de Vacunas en el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, el cual coordina estas actividades.

Pocas agencias internacionales apoyan programas de desarrollo de vacunas. La Fundación Rockefeller es una de las instituciones no gubernamentales que contribuye en este rubro. Durante años, muchas veces en conjunto con países en desarrollo, esta Fundación ha apoyado el desarrollo de vacunas tales como la vacuna contra la fiebre amarilla. Actualmente, apoya el desarrollo de la vacuna antirrábica en un sistema de cultivo celular de alta densidad, junto con el Instituto Armand Frappier de Canadá, el Laboratorio Veterinario de Colombia (VECOL) y el Instituto Nacional de Salud de Colombia.

El Programa Especial para Investigación y Capacitación sobre Enfermedades Tropicales (TDR) (60), el Programa de Control de Enfermedades Diarreicas (CDD) (61) y el Programa Global para Vacunas (GPV) (62), todos de la OMS, junto con el Programa Especial para Vacunas e Inmunización de la OPS (SVI), son otras de las pocas instituciones que apoyan a nivel internacional las actividades de desarrollo de vacunas.

En septiembre de 1990, en la Cumbre Mundial en Favor de la Infancia, se emitió dentro de la Declaración de Nueva York la "Iniciativa en Pro de la Vacuna Infantil" (21), que tiene como patrocinadores a la OMS, a UNICEF, a la Fundación Rockefeller y al Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). La Cumbre reconoció que millones de niños mueren todavía anualmente de enfermedades que podrían prevenirse. Se requiere ampliar el espectro de enfermedades para las cuales se dispondría de vacunas, simplificar los requisitos de provisión de las vacunas y reducir los costos de vacunación.

Sin embargo, para la búsqueda del objetivo mayor, la inmunización universal, es necesario que se establezcan formas para aplicar rápidamente los últimos conocimientos científicos en el desarrollo de vacunas nuevas y mejores, beneficiando a los niños de todos los países. Una vacuna de este tipo debería presentar las siguientes características:

- requeriría sólo una o dos aplicaciones en lugar de dosis múltiples;
- se administraría en la fase temprana de la vida del niño;
- se combinaría en formas nuevas, diferentes de las ya existentes, reduciendo la necesidad de numerosas inyecciones y visitas del personal de salud;
- sería más termoestable, reteniendo su potencia durante el transporte y almacenamiento, particularmente en climas tropicales;
- sería eficaz contra una variedad de enfermedades que no son hoy objeto de programas de inmunización, pero que implican problemas serios de salud pública, tales como el

SIDA, las infecciones respiratorias agudas, las enfermedades diarreicas e importantes enfermedades parasitarias;

- sería accesible en términos de costo.

Esta iniciativa representa un hito significativo en la prevención de las enfermedades transmisibles. El logro de estas metas requeriría una inversión sustancial de capital, tiempo y esfuerzos de toda índole por parte de la comunidad científica y tecnológica en todo el mundo.

La mayor parte de la capacidad para participar en esta “revolución” científica y tecnológica, se encuentra en el mundo desarrollado, en donde los laboratorios existentes estarían en mejor situación para dirigir su atención a este esfuerzo. De ahí que se hace necesario fortalecer la capacidad científica y tecnológica de los países en desarrollo, a fin de que puedan participar activamente en el proceso de desarrollo de vacunas en lugar de quedar solamente como beneficiarios pasivos de la producción externa de estos biológicos.

Ante este diagnóstico de la situación, teniendo en cuenta la existencia de centros de excelencia científica y tecnológica en la Región y en respuesta a la solicitud de varios de los países miembros, la OPS empezó a organizar hace algunos años un programa regional de desarrollo y producción de vacunas, teniendo como eje central del trabajo, la cooperación técnica entre los países y la implementación de proyectos multicéntricos de investigación y desarrollo de vacunas importantes para la Región.

Fue así como, en 1994, la Conferencia Sanitaria Panamericana aprobó formalmente el llamado Sistema Regional de Vacunas (SIREVA) (63), el cual, a partir de marzo de 1995 forma parte del Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI) junto con el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) de la OPS/OMS.

### III. PRODUCCIÓN DE VACUNAS

La enorme dependencia de la importación de vacunas básicas por parte de los programas de inmunización en la mayoría de los países de la Región, expone a dichos programas a las variaciones del mercado y la política internacional, haciéndoles altamente vulnerables. Es importante, por lo tanto, prestar la atención debida a la producción de vacunas y tratar a la vez de fortalecer los laboratorios existentes en la Región a manera de mantener múltiples alternativas en cuanto a laboratorios productores y poder diversificar las fuentes abastecedoras para asegurar el suministro continuo de las vacunas esenciales para los diferentes programas en los países. A la luz de estas preocupaciones, se presenta someramente en este capítulo algunos de los problemas involucrados en la producción de vacunas.

Los laboratorios productores de vacunas más importantes se encuentran en los países desarrollados. Muchos de estos laboratorios trabajan en la producción de medicamentos, área que es la que representa mayores ganancias. Asimismo, la actividad de producción de vacunas en estos laboratorios está organizada de tal forma que permite el retorno de las inversiones y la

adquisición de fondos suficientes para continuar las inversiones en investigación y desarrollo tecnológico de vacunas nuevas.

Con el advenimiento de la biotecnología, han surgido centenas de pequeños laboratorios, casi siempre organizados por investigadores que tienen conocimientos tecnológicos y que se establecen para la explotación de esta tecnología. Sin embargo, la mayoría de estas pequeñas empresas están dedicadas al desarrollo de insumos para laboratorio o de utilización terapéutica, tales como anticuerpos monoclonales, o equipos (*kits*) de diagnóstico de laboratorio, debido a que estos productos exigen menos tiempo para su desarrollo y la comercialización.

En los últimos años, se ha observado un efecto importante del mercado en la producción de vacunas, esto es la tendencia al oligopolio, con una gran concentración del mercado de vacunas en pocos laboratorios, en su mayoría transnacionales. Las causas más directas y visibles están relacionadas al incremento del costo de operación de producción, a raíz de una mayor complejidad tecnológica, y a la necesidad de grandes inversiones en las instalaciones productivas, equipo y recursos humanos para el cumplimiento de las exigencias técnicas, tales como las llamadas Buenas Prácticas de Manufactura (64), provenientes de las agencias regulatorias. En Estados Unidos, el alto costo de los seguros debido al pago de indemnizaciones a los usuarios que sufren reacciones adversas relacionadas a la vacunación, es también una de las causas del precio alto de las vacunas en el mercado estadounidense.

Las grandes inversiones necesarias para la incorporación de nuevas tecnologías y el desarrollo de cualquier nueva vacuna, también constituyen factores de dificultad para los laboratorios que desarrollan solamente actividades de producción de vacunas y que no disponen de un gran capital. Un ejemplo de este problema es el costo del desarrollo de la vacuna recombinante de hepatitis B por un laboratorio europeo, que llegó al monto de US\$60 millones y tomó más de seis años de actividad. Esta vacuna está protegida por 14 patentes que pertenecen a varias instituciones diferentes. Estas circunstancias han obligado a los laboratorios internacionales a fortalecer su estrategia con la globalización del mercado y a buscar al mismo tiempo, una mejoría en el rendimiento y la optimización de la productividad. La producción de lotes económicos de vacunas y el asegurarse un mercado para mediano y largo plazo, son medidas esenciales para la continuidad de las actividades por parte de los laboratorios.

#### **IV. PRODUCCIÓN REGIONAL**

Son muy pocos los laboratorios privados de producción de vacunas para uso humano existentes en la Región. En general son muy pequeños y sin impacto en el mercado. La ausencia de los grandes laboratorios privados en la Región obedece a varias razones, entre otras:

- Los programas de inmunización generalmente los organizan e implementan los gobiernos, y como la cobertura de vacunación es muy alta, la demanda del mercado privado de vacunas es mínima en la mayoría de los países de la Región;

- Los gobiernos también son los responsables de la adquisición de todas las vacunas para su propio programa nacional de inmunización. Esta se hace mediante un proceso licitatorio, el cual siempre demanda mucho tiempo. Además, la selección se hace en favor del laboratorio que presenta el precio más bajo;
- El Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) así como el Fondo Rotatorio de la OPS<sup>2</sup>, promueven la licitación de grandes volúmenes de vacunas por agrupación de necesidades entre los diferentes países. De esta forma, hace la provisión de las vacunas muy atractiva a los laboratorios productores, los cuales pueden programar la entrega de la vacuna con gran anticipación y a precios muy bajos.

Por otro lado, los laboratorios privados obtienen sus ganancias vendiendo en mercados privados de países desarrollados, y el exceso de producción se ofrece a programas como UNICEF y el Fondo Rotatorio de la OPS a un costo marginal.

En general, en la Región existen pocos laboratorios productores que sean competitivos. La mayoría son estatales o públicos y tienen casi siempre una línea de producción limitada, satisfaciendo solamente la demanda espontánea de su propio país, sin una búsqueda activa de mercado. Además, su forma de organización y estructura no permite la flexibilidad y agilidad necesarias para el manejo adecuado de la actividad productiva.

Estos laboratorios producen algunas de las vacunas utilizadas para la prevención de enfermedades de la IRA, tales como la tos ferina y la difteria, las cuales se combinan con toxoide tetánico para formar la vacuna DPT. La producción de la vacuna contra el sarampión está limitada a solamente dos laboratorios (cuadro 1).

La producción actual no es suficiente para satisfacer las necesidades del mercado existente en la Región. Además, existen problemas técnicos por lo obsoleto de las metodologías, los procesos y los equipos de producción que determina una productividad baja productividad y calidad deficiente de las vacunas de algunos productores. Por lo general, estos laboratorios no disponen de instalaciones que cumplan con los requisitos de las Buenas Prácticas de Manufactura.

La mayoría de estos laboratorios tiene sus instalaciones adaptadas, por lo tanto el flujo de trabajo no siempre es el mejor. Adoptan la metodología clásica de producción en una cultura estacionaria, limitando enormemente el volumen de insumos producidos. Debido a múltiples dificultades económicas, no tienen equipos e instalaciones adecuados, por lo que están restringidos a la producción de lotes muy pequeños. En general, no se preocupan por hacer estudios de costo-beneficio para propiciar una producción más económica. Solamente algunos llevan a cabo actividades de investigación y desarrollo tecnológico en forma rutinaria. Esta situación hace difícil cualquier programa de modernización e incorporación de nuevas tecnologías. No obstante, algunos laboratorios desarrollan y mantienen la producción continua

2 Mecanismo administrativo establecido en 1979 que consolida los requerimientos de los países en materia de inmunizaciones para sus Programas Nacionales, a fin de obtener mediante un sistema de cotizaciones con diferentes laboratorios, vacunas de buena calidad a bajo costo.

**Cuadro 1: Producción de vacunas DPT y sarampión en países de la Región (número de dosis x 1.000, correspondientes al año 1994)**

PAÍS	D PT	SARAMPIÓN
México (1)	9.500	12.000
Brasil (2)	5.000	15.000
Chile	2.400	•••
Venezuela	4.000	•••
Colombia	2.600	•••
Cuba (3)	•••	***
Argentina (4)	***	•••
Uruguay	160	•••
Ecuador	750	•••

\*\*\* producción suspendida o sin información  
 ••• sin producción

(1) En proceso de modernización y expansión de las instalaciones de producción.  
 (2) El programa nacional de auto-suficiencia está haciendo grandes inversiones en tres instituciones. Cuando se complete tendrá una capacidad de 40 millones dosis de la vacuna DPT por año.  
 (3) Están finalizando nuevas instalaciones con una gran capacidad de producción de vacunas bacterianas y virales.  
 (4) Están modernizando todas las instalaciones de producción de vacunas bacterianas.

de vacunas por años, lo que demuestra que existen recursos humanos suficientemente capacitados en producción, los cuales al contar con apoyo adecuado, responden y atienden a las demandas solicitadas.

La Gerencia General de Biológicos y Reactivos/México, ha modernizado sus instalaciones y equipos, y está en el proceso de ampliar la producción de vacunas. Esta entidad, en sus dos instituciones, el Instituto Nacional de Higiene y el Instituto Nacional de Virología, es la única en América Latina que produce todas las vacunas consideradas en el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI). En Brasil, mediante el Programa de Autosuficiencia de Inmunobiológicos del Ministerio de Salud, se hace importantes inversiones en nuevas instalaciones para producción de vacunas DPT, en tres diferentes laboratorios (Instituto Butantán, Bio-Manguinhos/Fundación Oswaldo Cruz, e Instituto de Tecnología de Paraná/TECPAR), los cuales, se calcula que tendrán una capacidad conjunta de producción superior a 120 millones de dosis anuales de vacuna DPT. El Instituto de Salud Pública de Chile es un productor tradicional de vacuna DPT satisfaciendo la demanda total a nivel nacional de dicha vacuna. El Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel en Venezuela también ha modernizado sus instalaciones, y el Instituto Malbrán, en Argentina, así como el Instituto Nacional de Salud Pública de Colombia, están haciendo un enorme esfuerzo para volver a establecer las actividades de pro-

ducción de manera que puedan cumplir con los requisitos internacionales. Por otro lado, Cuba es el país que ha hecho el mayor volumen de inversiones en el área de investigación y desarrollo tecnológico de inmunobiológicos, biotecnología y producción de vacunas.

Considerando la importancia de las actividades de inmunización, que en los últimos años se han tornado esenciales para la ejecución de las políticas de control y erradicación de enfermedades inmunoprevenibles, es también fundamental una política que fortalezca el desarrollo tecnológico de vacunas y actividades de producción, para satisfacer la demanda de vacunas esenciales para los programas nacionales de inmunizaciones de la Región, a fin de evitar una dependencia total de la importación de vacunas, ya que esto debilita y limita la política de control de enfermedades. Algunos aspectos de carácter estratégico que deben considerarse en este sentido son:

- Las vacunas modernas deberán ser más complejas tecnológicamente, más potentes, menos reactogénicas y con posibilidades de aplicarse en solamente una o dos dosis; tendrán que ser a la vez, combinadas con muchos antígenos y presentar menores reacciones adversas. Sin embargo, con estas características es probable que estas vacunas “modernas” sean mucho más caras que las actuales y que no puedan utilizarse en nuestros países debido a su alto costo;
- Los más interesados en el desarrollo y la producción de vacunas contra las enfermedades prevalentes en la Región, deberían ser los propios países pertenecientes a ella;
- La actividad productiva debe estar asociada al desarrollo tecnológico para permitir la utilización de la tecnología más adecuada. Si no se incorpora un programa de investigación y desarrollo tecnológico, dicha actividad productiva quedará rápidamente obsoleta.
- Se requiere la definición de políticas a mediano y a largo plazo, que enfoquen la actividad de producción con lógica y dinamismo, desde los aspectos de organización, de estructura administrativa y desarrollo tecnológico, hasta el control de calidad y la gerencia de todas estas actividades. Como parte de este desarrollo, es imperativo buscar el fortalecimiento del sistema de Control de Calidad Nacional (65), para asegurar la calidad de la producción local.

En algunos países de la Región se han verificado importantes logros en el desarrollo de nuevas vacunas tales como la vacuna antirrábica por Fuenzalida y Palacios (66); más recientemente, la vacuna antimeningocócica, serogrupos B y C, desarrollada por C. Campa y colaboradores (11); la vacuna contra la hepatitis B, empleando la tecnología de ADN recombinante, a cargo de M. Limonta y colaboradores (67), estos dos últimos grupos provenientes de Cuba; y la vacuna contra la malaria, a cargo de M.E. Patarroyo y colaboradores (68), de Colombia, que se encuentra en su fase final de desarrollo.

No obstante estos importantes logros propios de la Región, es necesario resaltar que todas las demás vacunas se han originado en países desarrollados y se prevé que muy pronto, vacu-

nas perfeccionadas y más complejas tecnológicamente, estarán disponibles en el mercado internacional.

Esta situación muestra la necesidad de fortalecer esta actividad en un esfuerzo coordinado de cooperación técnica entre los países de la Región, hacia el desarrollo y perfeccionamiento de vacunas utilizando nuevas tecnologías. La iniciativa de la OPS/OMS de crear el Sistema Regional de Vacunas (SIREVA), e incorporar esta actividad al Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI), busca responder a esta necesidad.

El sistema consiste en el fortalecimiento de una red de instituciones afiliadas, las cuales coordinan, en función de determinadas actividades, tareas para el desarrollo y perfeccionamiento de vacunas. Adopta para su funcionamiento un concepto innovador que integra todas las actividades relacionadas al desarrollo de vacunas, tales como la investigación y la vigilancia epidemiológica, la investigación básica y aplicada, el desarrollo tecnológico, la escala de producción, el control de calidad y la evaluación clínica y de campo.

## V. CONCLUSIÓN

La victoria notable lograda por la humanidad en la erradicación de la viruela en los años setenta, el éxito del programa de erradicación del virus “salvaje” de la poliomielitis hecha realidad en 1994 y la eliminación del sarampión en la Región en un futuro muy cercano, han incentivado a las autoridades de gobierno en diversos países a fortalecer los programas de vacunación.

La OPS, la OMS, el PNUD y UNICEF, también intentan motivar a las organizaciones de financiación y a los gobiernos miembros, para que hagan inversiones en gran escala en proyectos de investigación y en el desarrollo de vacunas más potentes que causen menos reacciones adversas y sean más eficaces.

Este problema probablemente confrontará a dos mundos diferentes: uno tendrá la capacidad para progresar hacia la generación del conocimiento científico requerido en la resolución de los problemas por medios tecnológicos; mientras que el otro se encontrará cada vez más apartado de soluciones debido a su escasa capacidad para generar pericia local y a su dependencia de productos desarrollados en otros países para fines distintos de la protección de los niños en los países donde las IRA son endémicas.

La existencia actual de algunas vacunas contra algunos de los agentes etiológicos determinantes de IRA (por ejemplo *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *B. pertussis* acelular, entre otras) y la pronta disponibilidad de otras, presionará a los gobiernos para que éstas se incorporen a los programas de inmunización. Lamentablemente, el alto costo que esto significa limitará notablemente su uso e incluso puede amenazar el funcionamiento de los programas, a menos que los gobiernos de la Región tomen parte en la iniciativa y promuevan el desarrollo y producción de estas nuevas vacunas.

El Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI), mediante el SIREVA, busca expresamente el apoyo para acelerar el desarrollo científico y tecnológico, como parte del compromiso adquirido para orientar y dirigir enfoques regionales y nacionales, hacia la producción de vacunas para la prevención y el control de las enfermedades prevenibles mediante la inmunización en la Región de las Américas. Este compromiso se ofrece como una respuesta a una tarea cada vez más difícil: que los países de una Región en desarrollo progresen en lo científico y lo tecnológico para asegurar el acceso a y los beneficios de la ciencia moderna en la prevención y el control de las enfermedades. El sistema también se propone atraer la colaboración de los países desarrollados para consolidar y reforzar las instituciones en la Región, a fin de que las condiciones en las Américas mejoren sustancialmente de una forma que los países no podrían conseguir individualmente.

Hace falta movilizar a la comunidad de donantes internacionales para comprometer los recursos necesarios y apoyar el desarrollo del sistema durante los próximos diez años, pero en particular, durante el período inicial. Las metas propuestas son factibles en el área científica, económica, administrativa y política. No hay duda en cuanto al valor de la inversión; lo que queda por decidir es la voluntad de llevar a cabo las acciones.

## VI. REFERENCIAS

1. Henderson DA, de Quadros CA. *The Eradication of Poliomyelitis*. In Vaccines 95. 413-422, 1995. Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. World Bank (1993). *World Development Report: Investing in Health*. Oxford University Press, New York.
3. Pan American Health Organization/World Health Organization. Tenth Technical Advisory Group (TAG). *Meeting on Vaccine-Preventable Diseases*. Final Report. 16-19 March 1992, Rio de Janeiro, Brazil.
4. De Quadros CA. *Strategies for disease control/eradication in the Americas*. In Vaccination & World Health 17-34, 1994. London School of Hygiene & Tropical Medicine. Fourth Annual Public Health Forum. Ed. Felicity T. Cutts and Peter G. Smith. John Willey & Son Ltd.
5. OPS/OMS. *Table of Morbidity Rates*. Sistema de Información del PAI. Programa Especial de Vacunas e Inmunización (SVI), Washington, DC. 1980 y 1994.
6. Wunsch Filho V, Castilho EA, Rodrigues LC, Huttly SRA. *Effectiveness of BCG vaccination against tuberculous meningitis: a case-control study in São Paulo, Brazil*. Bulletin World Health Organization, 68:69-74, 1990.
7. Robbins JB, Austrian R, Lee C-J, Rastogi SC, Broome CV, Falklam RR, Tiejma RH, Parke JC. *Considerations for Formulating the Second-Generation Pneumococcal Capsular Polysaccharide Vaccine with Emphasis on the Cross-Reactive Types Within Groups*. J. Infec. Dis. 1983;148:1136-59.
8. Eskola J, Peltola H, Takala AK, et al. *Efficacy of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infancy*. New England J Med. 1987;317:717-22.

9. Kilbourne ED. *Inactivated Influenza Vaccines*. En: Plotkin SA, Mortimer Jr. EA. eds. *Vaccines*. Philad.: WB Saunders 1988:420-434.
10. Zollinger WD. *Meningococcal meningitis*. In *Vaccines and Immunotherapy*. 113-126, 1991. Edited by Stanley J. Cryz, Jr. Pergamon Press, Inc.
11. Sierra GVG, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, Rico CO, Rodriguez CR, Terry MH. *Vaccine against group B N Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba*. National Institute of Public Health Annals. 14:195-210, 1991, Norway.
12. Pan American Health Organization/World Health Organization. *Immunogenicity and Reactogenicity of two outer membrane protein-based anti-meningococcal serogroup B vaccines in Santiago, Chile*. 19-20 June 1995. Special Program for Vaccines and Immunization (SVI).
13. Kimura M, Hikino N. *Results with a new DTP vaccine in Japan*. Develop. Biological Standardization 1986;61:545-561.
14. Paradiso P. *Combination Vaccines for Diphtheria, Tetanus, Pertussis, and Haemophilus influenzae type b*. In *Combined Vaccines and Simultaneous Administration. Current Issues and Perspectives*. Annals of the New York Academy of Sciences. 754:108-113, 1995.
15. World Health Organization (WHO). *Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccine (live)*. Requirements for Biological Substances N° 47. Technical Report Series, N° 840, 1994.
16. Garebbem M, Leroy O, Beau JP, Sene I. *Child Mortality after high-titer measles vaccines: prospective study in Senegal*. The Lancet 338:903-907, 1991.
17. Taylor J, Pincus S, Tartaglia J et al. *Vaccinia virus recombinant expressing either the measles virus fusion or hemagglutinin glyco-protein protect dogs against canine distemper virus challenge*. Journal of Virology. 65:4263-74, 1991.
18. Wild TF, Bernard A, Spohner D, Drillien R. *Construction of vaccinia virus recombinant expressing several measles virus protein and analysis of their efficacy in vaccination of mice*. Journal of General Virology. 73:359-367, 1992.
19. Vialard J, Lalumiere M, Vernet T et al. *Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the beta-galactosidase gene*. Journal of Virology 70:175-262, 1990.
20. Van Binnendijk RS, van Baalen CA, Poelen MCM et al. *Measles virus transmembrane fusion protein synthesized de novo or presented in ISCOM is endogenously processed for HLA class I- and II- restricted cytotoxic T cell recognition*. Journal of Experimental Medicine 176:119-28, 1992.
21. Measles control. *Resetting the Agenda: A report of the Children's Vaccine Initiative Ad Hoc Committee on an Investment Strategy for Measles Control*. The Journal of Infectious Diseases 170, Supplement 1, 1994.
22. OMS. *Boletín de la iniciativa en pro de la vacuna infantil*. CVI Forum, División de Enfermedades Transmisibles. N° 1, Abril 1992.
23. Cherry J.D. *Pertussis: the trials and tribulations of old and new pertussis vaccines*. Vaccine, 10(14):1033-1038, 1992.

24. Kimura A, Mountzouros KT, Relman DA, Falkow S, Cowell JL. *Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model.* Infect Immun 1990;58:7-16.
25. Sato H, Sato Y. *Bordetella pertussis infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system.* Infect Immun 1984;46:415-21.
26. Shahin RD, Brennan MJ, Li ZM, Meade BD, Manclark CR. *Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69 kD outer membrane protein of Bordetella pertussis.* J Exp Med 1990;171:63-73.
27. Rappuoli R, Podda A, Pizza M, Covacci A, Bartolini A, Magistris MT, Nencioni L. *Progress towards the development of new vaccines against whooping cough.* Vaccine, 10 (14):1027-1032, 1992.
28. Fischetti VA. *Streptococcal M protein.* Scientific American, 58-65, June 1991.
29. Bixler GS, Pillai S. *The cellular basis of the immune response by conjugate vaccines.* Cruse JM, Lewis RE (eds) Conjugate Vaccines. Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Karger, 1989, 18-47.
30. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zell RE, Broome CV, Wenger JD. *Decline of childhood Haemophilus influenzae type b (Hib) disease in the Hib vaccine era.* JAMA 1993, 269, 221-226.
31. Black SB, Shinefield HR, and the Kaiser Permanente Pediatric Vaccine Study Group. *Immunization with oligosaccharide conjugate Haemophilus influenzae type b (HbOC) vaccine on a large health maintenance organization population: extended follow-up and impact on Haemophilus influenzae disease epidemiology.* Pediatr. Infect. Dis. 1992, 11, 610-613.
32. Schneerson R, Robbins JB, Parke JC, Bell C, Schlesselman JJ, Sutton A, Wang Z, Schiffman G, Karpas A, Schiloach J. *Quantitative and qualitative analyses of serum antibodies elicited in adults by Haemophilus influenzae type b and pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates.* Infect. Immun. 1986, 52, 519-528.
33. Anderson P, Pichichero ME, Insel RA. *Immunogens consisting of oligosaccharides from the capsule of Haemophilus influenzae type b coupled to diphtheria toxoid or CRM<sub>197</sub>.* J. Clin. Invest. 1985, 76, 52-59.
34. Marburg S, Jorn D, Tolman RL, Arison B, McCauley J, Kniskern PJ, Hagopian A, Vella PP. *Bimolecular chemistry of macromolecules: synthesis of bacterial polysaccharide conjugates with Neisseria meningitidis membrane proteins.* J. Amer. Chem. Soc. 1986, 108, 5282-5287.
35. Anderson P, Betts R. *Human adult immunogenicity of protein-coupled pneumococcal capsular antigens of serotypes prevalent in otitis media.* Pediatr. Infect. Dis. 1989, 8, S50-S53.
36. Giebink GS, Koskela M, Vella PP, Harris M, Le CT. *Pneumococcal capsular polysaccharide-meningococcal outer membrane protein complex conjugate vaccines: immunogenicity and efficacy in experimental pneumococcal otitis media.* J. Infect. Dis. 1993, 167, 347-355.
37. McDaniel IS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE. *PspA, a surface protein of Streptococcus pneumoniae is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type.* Infect. Immun. 1991, 59, 222-228.

38. Lock RA, Hansman D, Paton JC. *Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by Streptococcus pneumoniae*. Microb. Pathogen. 1992, 12, 137-143.
39. Russell H, Tharpe JA, Wells DE, White EH, Johnson JE. *Monoclonal antibody recognizing a species-specific protein from Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 1990, 28, 2191-2195.
40. The Jordan Report. *Accelerated Development of Vaccines 1994. Annual Report*. Division of Microbiology and Infectious Diseases. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. National Institutes of Health. Maryland, USA.
41. Robbins JB, Schneerson R, Vann WE, Bryla DA, Fattom A. *Prevention of Systemic Infections Caused by Group B Streptococcus and Staphylococcus aureus by Multivalent Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines*. In Combined Vaccines and Simultaneous Administration. Current Issues and Perspectives. Annals of the New York Academy of Sciences. 754:68-82, 1995.
42. Paoletti LC, Wessels MR, Kasper D. *Optimization of Group-B Streptococcal Glycoconjugate Vaccines*. In Vaccines 95:213:218, 1995. Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
43. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD et al. *Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine*. Am J Epidemiol 1969;89:422-34.
44. World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record*. Geneva, Switzerland 1995, 70:53-60.
45. Snyder MH, Betts RF, Deborde D, Tierney EL, Lements ML, Herrington D, Sears SD, Dolin R, Maassab HF, Murphy Br. *Four viral genes independently contribute to attenuation of live A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines*. Journal of Virology 62:488-491, 1988.
46. Clements ML. *New and improved vaccines against influenza*. In: New generation vaccines, pp 375-399. Woodrow GC, Levine MM (ed.). New York: Marcel Dekker Inc., 1990.
47. Panicali D, Davis SW, Weimberg RL, Paoletti E. *Construction of live vaccines by using genetically engineered poxviruses: biological activity of recombinant vaccinia virus expressing influenza virus hemagglutinin*. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:5364-68, 1983.
48. Yewdell JW, Bennik Jr, Smith GL, Moss B. *Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:1785-89, 1985.
49. Sveda M, Lai CJ. *Functional expression in primate cells of cloned DNA coding for the hemagglutinin surface glycoprotein of influenza virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:5488-92, 1981.
50. Ellis RW. *New technologies for making vaccines*. Vaccines, Ed. Stanley A. Plotkin & Edward Mortimer Jr., W. B. Saunders Co. 1988;568-575.
51. Milich DR. *Synthetic peptides: prospects for vaccine development*. Semin. Immunol.1990;2:307-15.
52. Kit S, Kit M, Pirtle EC. *Attenuated properties of thymidine kinase negative deletion mutants of pseudo-rabies virus*. Am J Vet Res. 1985;46:1359-67.

53. Brown F, Schild GC, Ada GL. *Recombinant vaccinia viruses as vaccines*. Nature, 1986; 319:549-50.
54. Rhodes GH, Dwarki VJ, Abai AM, Felgner J, Felgner PL, Gromkowski SH, Parker SE. *Injection of expression vectors containing viral genes induces cellular, humoral, and protective immunity*. Vaccines 93, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 0-87969-383-5/93.
55. Arntzen, CJ. *Production of low cost candidate oral vaccines in transgenic plants*, presented at the meeting "Vaccines, New Technologies & Applications". Cambridge Healthtech Institute, 21-23 March 1994.
56. Moffat AS. *Exploring transgenic plants as a new vaccine source*. Science. 268: 658-660, 1995.
57. Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ. *Oral Immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants*. Science 268:714-716, 1995.
58. Ma JKC, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, Dolleweerd CV, Mostov K, Lehner T. *Generation and assembly of secretory antibodies in plants*. Science 268:716-719, 1995.
59. Institute of Medicine. *The Children's Vaccine Initiative: Achieving the vision*. National Academy Press. Washington, D.C. 1993.
60. UNDP/World Bank/WHO. *Examen thematique prospectif des orientations et de l'organisation des activites de recherche et de developement du TDR relatives aus vaccins anti-parasitaires*. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. TDR/PTR, Vaccines 92.3, 1992.
61. WHO. *Report of the sixth meeting of the scientific working group on immunology*. Microbiology and Vaccine Development. WHO/CDD/IMV/88.1, 1988.
62. World Health Organization: Global Programme for Vaccines and Immunization. *Vaccine Research and Development (VRD): Report of the 11th Session of the Scientific Advisory Group of Experts (SAGE)*. GPV/VRD/94.14. June 22-24, 1994. Geneva, Switzerland.
63. OPS/OMS. Sistema Regional de Vacunas (SIREVA). *Estudio de factibilidad*. Mayo de 1991.
64. WHO. *Good Manufacturing Practices for Biological Products*. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series, 822:20-30, 1992.
65. WHO. *Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products*. Technical Report Series, 822:31-46, 1992.
66. Fuenzalida E, Palacios R. *Un método para la preparación de la vacuna antirrábica*. Boletín del Instituto Bacteriológico de Chile. 8:3-10, 1995.
67. CIGB (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología). *Vacuna cubana contra la hepatitis B de antígeno de superficie viral ADN recombinante*. La Habana, Cuba, 1992.
68. Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martínez A, Rodríguez R, Guzmán E, Cabezas E. *Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides*. Nature, 328:629-632, 1987.