

Comité Asesor de Vacunas de la A.E.P.

An Esp Pediatr 1999;50:341-345.

Desde hace décadas la comunidad científica ha tratado de poner a disposición de los clínicos y especialistas en salud pública un parámetro que permitiese predecir si un determinado sujeto (o un grupo de individuos) que ha sido vacunado está protegido frente a la infección. Este parámetro ha sido el título de anticuerpos (Ac) que se induce tras la vacunación, de fácil obtención -a partir de una muestra sérica del individuo- y fácil interpretación. Cuando en vez de un individuo se refiere a un grupo de individuos, el parámetro a usar es la Media Geométrica de los Títulos (MGT) de Ac obtenidos. A partir de los resultados de los ensayos clínicos de eficacia se establece el título mínimo de Ac que confiere protección. Es decir, si el título de Ac (o la MGT) obtenido con una determinada técnica serológica, supera un determinado umbral, el sujeto (o sujetos) vacunado tiene la razonable expectativa de estar protegido frente a la infección y la enfermedad. Esta protección durará todo el tiempo que el título de Ac se mantenga por encima de ese determinado umbral. Ahora bien, se sabe que los títulos de Ac disminuyen con el tiempo. La situación del vacunado puede entonces modificarse requiriendo, en algunos casos, dosis de recuerdo de la vacuna, mientras en otros dichas dosis pueden no ser necesarias, bien porque el agente infectante circula en la población donde reside el sujeto, que de manera natural estaría 'reinmunizándose' con los sucesivos contactos con el agente infeccioso, o bien porque aún siendo éstos esporádicos, la memoria inmunológica del vacunado provoca una respuesta que se traduce en un rápido e intenso incremento en el título de Ac.

La vacuna frente al *Haemophilus influenzae* tipo b

La historia de la vacuna frente al *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) tiene unas características singulares, y demuestra cómo su administración masiva en lactantes ha conducido a que, en poco tiempo, la enfermedad invasiva por Hib haya disminuido notablemente y haya dejado de ser un problema de salud pública en varios países occidentales, y se pueda pensar en eliminar la enfermedad por Hib en países con elevada tasa de cobertura vacunal⁽¹⁻⁵⁾. Por ello, en la actualidad se acepta que no es éticamente viable realizar más estudios de eficacia con este tipo de vacunas, pues no sería ético incluir un grupo de niños

El título de anticuerpos, la memoria inmunológica y la eficacia protectora de la vacuna frente a *Haemophilus influenzae* tipo b

que recibiesen placebo, en países donde la vacuna Hib está recomendada⁽⁶⁾.

La finalidad del desarrollo de la vacuna frente al Hib era inducir Ac bactericidas, opsonofagocíticos y, en última instancia, protectores⁽⁷⁾. Diversos estudios han mostrado qué clase de Ig y qué subclase de IgG están involucradas en la respuesta al polisacárido capsular del Hib - polirribosilribitol fosfato (PRP) - después de exposición natural al Hib, la enfermedad y la inmunización⁽⁷⁾. Se sabe que la mayor parte de individuos responden con IgG, y que ésta es bactericida, opsonizante para los polimorfonucleares en presencia de complemento, y protectora en estudios en animales⁽⁷⁾. El papel que juega el complemento en la defensa del huésped frente al Hib es de vital importancia; el Hib es capaz de activar las dos rutas - la clásica y la alternativa - del complemento, iniciando de esta forma la opsonofagocitosis, la muerte celular y otras respuestas inflamatorias, relevantes en la resolución de la infección^(7,8).

La evidencia de la eficacia de la vacuna frente al Hib, preparada a partir del PRP, se obtuvo hace 20 años^(9,10). Sin embargo, la respuesta inmunológica a esta vacuna (no conjugada) PRP es pobre en niños menores de 18-24 meses de edad^(2,9,11). Esto se debía a que la respuesta inducida por esta vacuna PRP es T-independiente, se manifiesta por la inducción de Ac tipo IgM y, en mucha menor medida, IgG1 e IgG2, y no induce memoria inmunológica^(3,6,11,12). Se acepta que títulos de Ac anti-PRP ≥ 0.15 mcg/ml y ≥ 1.0 mcg/ml, medidos por RIA, son indicadores de protección clínica a corto y a largo plazo, respectivamente, frente a enfermedad invasiva por Hib^(10,13,14). Estos límites fueron establecidos para la vacuna no conjugada PRP asumiendo que la protección de la enfermedad invasiva por Hib era mediada por Ac anti-PRP, siendo despreciable el papel que juega la inmunidad celular⁽¹³⁾.

La pobre respuesta inmune (títulos de anti-PRP < 0.15 mcg/ml) obtenida en niños menores de 2 años de edad, estimuló el desarrollo de vacunas PRP conjugadas a proteínas inmunógenas transportadoras, convirtiendo de este modo al polisacárido (PRP) en un antígeno T-dependiente^(2,15). Las características inmunogénicas de las vacunas *conjugadas*, que las distinguen de las no conjugadas, se recogen en la tabla 1. Así se desarrollaron vacunas conjugadas con toxoide diftérico (PRP-D), toxoide tetánico (PRP-T), mutante no tóxica de toxina diftérica (PRP-HbOC) o el complejo proteico de la membrana externa de la *Neisseria meningitidis* (PRP-OMP). De todas estas, PRP-

Comité Asesor de Vacunas de la A.E.P.

T (Hiberix® de SB, y Act-HIB® de PM-MSD) y PRP-HbOC (HibTITER® de Lederle) están comercialmente disponibles en España, aunque todas ellas han sido utilizadas en Europa en diversas pautas de administración⁽⁴⁾ y están comercializadas en EE.UU.⁽¹⁶⁾. Con dos de estas vacunas conjugadas (una PRP-T, otra PRP-HbOC), administradas según el esquema de primovacunación recomendado por la Sociedad Española de Pediatría (2,4,6 meses de edad)⁽¹⁷⁾, se han obtenido MGTs que varían entre 2.62 y 11.33 mcg/ml⁽¹⁸⁻²³⁾. A pesar de esta variabilidad, ambas vacunas han mostrado su eficacia protectora. Hay que resaltar que se desconoce la importancia del límite mínimo protector de Ac anti-PRP (establecido en ≥ 1.0 mcg/ml) tras la inmunización con vacunas conjugadas, aunque se sigue usando como indicador de protección a largo plazo⁽⁶⁾.

Se sabe que los portadores asintomáticos son la principal fuente de infección por Hib; pero la relación entre las tasas de portadores y el riesgo de desarrollar enfermedad no es, sin embargo, sencilla⁽²⁴⁾. En todo caso, las vacunas conjugadas han mostrado que producen una reducción de la tasa de portadores nasofaríngeos de Hib,⁽²⁴⁻²⁶⁾ a diferencia de lo que ocurre con las vacunas no conjugadas PRP⁽¹⁰⁾. La reducción en la transmisión de Hib de niños inmunizados a niños no vacunados, podría explicar porqué la incidencia de la enfermedad se ha reducido más allá de lo esperado a partir de la población vacunada estimada^(3,5,7).

La memoria inmunológica tras la primovacunación frente al *Haemophilus influenzae* tipo b

En ensayos clínicos realizados en Finlandia^(27,28) y Alaska⁽²⁹⁾ con vacuna conjugada Hib-PRP-D, se encontraron unas tasas de eficacia protectora del 83-94% (con MGTs de 0.42-0.53 mcg/ml al mes de administrada la tercera dosis) y del 35%, respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de sujetos que alcanzaron títulos de Ac anti-PRP ≥ 1.0 mcg/ml fue del 34-40% en los estudios finlandeses^(27,28) y del 15% en el realizado en Alaska⁽²⁹⁾, es decir, muy inferiores a la eficacia protectora observada. Esta discrepancia condujo al planteamiento de que las vacunas conjugadas de Hib pudieran inducir memoria inmunológica, lo que ayudaría a explicar que sujetos con concentraciones bajas de anti-PRP estuviesen protegidos frente al Hib.

El concepto de que la inducción de memoria inmunológica podría ser más importante en la protección frente al Hib que el nivel de Ac anti-PRP, tomó carta de naturaleza cuando, hace años, se observó que niños primovacunados - pero que presentaban concentraciones muy bajas de anti-PRP - desarrollaban una respuesta intensa a la administración de una dosis de recuerdo a los 14 meses de edad evidenciándose, por tanto, que habían respondido a la vacunación primaria⁽²⁸⁾. Kurikka et al (95)⁽³⁰⁾ demostraron que la administración de una dosis de recuerdo a los 14 meses de edad en niños que habían recibido una dosis previa de vacuna conjugada de Hib, daba lugar a una respuesta intensa de Ac, principalmente de IgG, lo que sugería que tras tan sólo una dosis se inducía memoria inmunológica.

Administración en lactantes de la vacuna conjugada frente al *Haemophilus influenzae* tipo b y otras vacunas en una sola inyección

Uno de los factores que asegurarían la administración sistemática de la vacuna frente al Hib a lactantes, es que pudiera administrarse simultáneamente con otras ya incluidas en el calendario vacunal. Debido a su esquema de administración - a los 2, 4 y 6 meses de vida - lo más lógico es administrarla junto a la vacuna frente a difteria, tétanos y tos ferina (DTP). De hecho, en los estudios que se mencionan en este trabajo y que se realizaron en lactantes con vacunas conjugadas de Hib, éstas se administraron junto a DTP.

En la actualidad en muchos países occidentales la vacuna conjugada de Hib se administra simultáneamente con la vacuna DTP durante el primer año de vida, en inyecciones separadas o en una sola inyección (mezcla extemporánea). La administración de DTP y vacuna conjugada Hib en una sola inyección, facilitaría la aceptación de ambas por la población, al reducir el número de pinchazos. En España están disponibles dos vacunas que permiten la administración en una sola inyección de vacunas DTP y Hib. En una de ellas, la DTP incluye vacuna pertussis de célula entera (DTPe) (Tetract-Hib®, de PM-MSD), mientras que en la otra, la DTP incluye pertussis acelular (DTPa) (Infanrix®-Hib, de SB). En ambas la vacuna conjugada de Hib es PRP-T. Algunos estudios comparativos^(18,20,31,32), pero no todos⁽³³⁾, han mostrado una menor respuesta de Ac anti-PRP - medida por las MGTs obtenidas - cuando se administran las vacunas DTPe o DTPa y vacuna conjugada Hib en la misma inyección, que si se administran por separado, pero simultáneamente; la respuesta obtenida (MGTs), en todo caso, se encuentra siempre dentro de los límites obtenidos cuando las vacunas conjugadas Hib se administran en dos inyecciones junto a DTPe^(22,27,28). Ahora bien, ¿puede este hecho tener trascendencia clínica? O en otras palabras, es posible que el título de MGT no sea el único parámetro a considerar al elegir entre la administración de las vacunas DTP y Hib en una o dos inyecciones simultáneas.

Como ya se comentó (Tabla I), se considera evidencia de respuesta protectora la demostración de la existencia de memoria inmunológica por la rápida e intensa respuesta a la dosis de recuerdo de vacuna no conjugada PRP - que remeda la respuesta a la infección por el Hib^(13,15) - o de vacuna conjugada Hib; además, la respuesta se manifiesta por una intensa inducción de IgG, siendo superiores los niveles de IgG1 que los de IgG2.

1.- Respuesta de primovacunados a la administración de una dosis de recuerdo de vacuna no conjugada PRP.

Desde hace años se sabe que las vacunas conjugadas Hib confieren protección frente al Hib, y que la primovacunación con vacuna conjugada Hib induce memoria inmunológica, al demostrarse una intensa respuesta de Ac anti-PRP tras la administración de la vacuna no conjugada PRP, que acontece incluso en niños con una pobre respuesta (bajo título de Ac anti-PRP) a la vacunación primaria⁽³⁴⁾.

Tabla I Características inmunogénicas de las vacunas conjugadas frente a *Haemophilus influenzae* tipo b^(6-8,13,15)

1. Respuesta T-dependiente con inducción de memoria inmunológica, mediada por células B
2. Una vez transcurridos al menos seis meses de la vacunación primaria, se produce un rápido e intenso incremento en el título de anticuerpos anti-PRP tras un contacto con PRP (*) o de la administración de una dosis de recuerdo de vacuna conjugada Hib
3. Intensa inducción de IgG, con niveles de IgG1 (**) superiores a los de IgG2
4. Buena respuesta en lactantes

(*) Se evidencia experimentalmente tras la administración de una dosis de recuerdo de vacuna no conjugada PRP (que remeda la respuesta a la infección por Hib)

(**) La IgG1 fija bien el complemento, de importancia capital para la fagocitosis bacteriana, y media la actividad bactericida del suero

Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b

PRP: polirribosilribitol fosfato; polisacárido capsular del Hib

Recientemente en un estudio⁽³⁵⁾, los investigadores pretendían observar si aparece respuesta - mediada por la memoria inmunológica - a la administración de una dosis de recuerdo de una vacuna no conjugada PRP, en lactantes que habían sido primovacunados con tres dosis de DTPa-HBV y vacuna conjugada Hib-PRP-T (en una o en dos inyecciones simultáneas) a los 3, 4 y 5 meses de edad. Aproximadamente un año después de concluida la primovacunación, los niños recibieron una dosis de recuerdo de DTPa-HBV y vacuna no conjugada PRP (en una o en dos inyecciones simultáneas). Pues bien, la vacuna no conjugada PRP indujo títulos de Ac anti-PRP ≥ 1.0 mcg/ml en el 86-98% de vacunados, y títulos de Ac anti-PRP ≥ 0.15 mcg/ml en la práctica totalidad de los niños (366 de 369)⁽³⁵⁾. Entre éstos se encontraban 12 de los 13 niños a los que no se les pudo medir respuesta inmunológica (es decir, con Ac anti-PRP < 0.15 mcg/ml) al mes de la primovacunación; de hecho, 11 de estos niños presentaban títulos de anti-PRP ≥ 0.5 mcg/ml tras la administración de la dosis de vacuna no conjugada PRP⁽³⁵⁾. En estos niños quedó demostrado que se había inducido respuesta inmunológica específica a PRP por la vacunación primaria, a pesar de que aquélla no pudo evidenciarse al mes de concluida la primovacunación. Es decir, una pobre respuesta a la vacunación primaria no parece correlacionarse con una pobre inducción de la memoria inmunológica⁽³⁵⁾.

La existencia de memoria inmunológica en primovacunados tras la administración de una dosis de recuerdo de vacuna no conjugada PRP debería manifestarse con la producción de gran cantidad de Ac anti-PRP, sobre todo del tipo IgG, y con mayores niveles de IgG1 que de IgG2^(6,15). Pues bien, en el estudio mencionado⁽³⁵⁾, los investigadores determinaron la cinética de la respuesta de Ac anti-PRP en 54 niños, de los que obtuvieron una muestra sérica a los 7-14 días de administrada la dosis de

recuerdo de vacuna no conjugada PRP, y observaron que todos los niños tenían títulos de anti-PRP ≥ 0.5 mcg/ml. Esta rápida respuesta puede ser de especial relevancia en clínica como respuesta del niño primovacunado a la eventual exposición natural al Hib. Con respecto a la clase de Ig de los Ac anti-PRP inducidos tras la administración de la dosis de recuerdo con vacuna no conjugada PRP, Zepp et al⁽³⁵⁾ observaron en 46 niños que las MGTs de IgG e IgG1 se habían incrementado respecto a las MGTs previas a la dosis de recuerdo un mínimo de 46-47 y 25-31 veces, respectivamente; la relación IgG1/IgG2 fue de 3.1 a 4.5. Los resultados de este estudio sugieren que la primovacunación induce una memoria inmunológica dependiente de las células T⁽³⁵⁾. Zepp et al⁽³⁵⁾ concluyen que la vacunación primaria con vacunas DTPa y hepatitis B junto a la vacuna conjugada Hib-PRP-T (en una o dos inyecciones simultáneas), no compromete la inducción de memoria inmunológica a ésta última, además de obtenerse una buena respuesta inmunológica contra los antígenos de DTPa y hepatitis B. Esto último también fué observado en un ensayo realizado en España en el que a 262 lactantes se les administraron tres dosis de DTPa-HBV y vacuna conjugada Hib-PRP-T en una inyección, a los 2, 4 y 6 meses de edad⁽³⁶⁾. Por otra parte, este estudio mostró que al mes de concluida la primovacunación el 100% y el 85% de los niños presentaban títulos de Ac anti-PRP ≥ 0.15 mcg/ml y ≥ 1.0 mcg/ml, respectivamente, con una MGT de 4.05 mcg/ml⁽³⁶⁾.

2.- Respuesta de primovacunados a la administración de una dosis de recuerdo de vacuna conjugada de Hib

Recientemente, se ha demostrado⁽³⁷⁾ que la administración de una dosis de recuerdo con vacuna conjugada de Hib a los 12 meses de edad, a niños primovacunados con tres dosis recibidas a los 2, 3 y 4 meses de edad - junto a DTPe en una inyección⁽³⁸⁾-, provocaba un incremento de 803 y 264 veces en el título de MGT total y de IgG, respectivamente; este enorme incremento en el título de Ac anti-PRP es consistente con una respuesta debida a la memoria inmunológica. De hecho, en este estudio el 98% de los niños presentaban un título de anti-PRP (IgG) > 1.0 mcg/ml, un mes después de recibida la dosis de recuerdo de vacuna conjugada⁽³⁷⁾.

En 1998 se publicaron los resultados de un ensayo que mostró que todos los niños (n=83) primovacunados - a los 3, 4 y 5 meses de edad con DTPa y vacuna conjugada Hib-PRP-T (DTPa-Hib) en una sola inyección -, presentaban unos títulos de anti-PRP ≥ 0.15 mcg/ml, con un incremento en las MGTs de 134 veces (hasta alcanzar 40.15 mcg/ml) un mes después de administrar una dosis de recuerdo de DTPa-Hib (en una inyección) a los 18-19 meses de edad; esta intensa respuesta indica la inducción de memoria inmunológica tras la vacunación primaria con DTPa-Hib⁽³²⁾.

En otro estudio reciente, los investigadores pretendieron observar si se induce memoria inmunológica tras la administración de sólo dos dosis de vacuna conjugada de Hib junto a DTPa en una sola inyección. Este es el caso de los lactantes en Austria donde reciben dos dosis a los 3 y 5 meses de edad, y hasta los 15-20 meses no reciben una dosis de recuerdo. A 149 niños que

habían recibido DTPa y vacuna conjugada Hib-PRP-T (DTPa-Hib) en una sola inyección a los 3 y 5 meses de edad (y una tercera dosis de DTPa a los 6 meses de edad) se les administró una dosis de recuerdo de DTPa-Hib a los 15-20 meses de edad; antes de recibirla, el 96% y el 22% presentaban títulos de Ac anti-PRP ≥ 0.15 mcg/ml y ≥ 1.0 mcg/ml, respectivamente; un mes después de administrada la dosis de recuerdo, las MGTs se habían multiplicado por 40 (hasta 23 mcg/ml) y el 100% de los niños tenían títulos de Ac anti-PRP ≥ 1.0 mcg/ml⁽³⁹⁾. Ante la intensa respuesta a la dosis de recuerdo, los investigadores concluyen que la inducción de la memoria inmunológica ocurre después de la administración de la segunda dosis de vacuna conjugada Hib-PRP-T, en una sola inyección con DTPa⁽³⁹⁾.

Conclusiones

En la actualidad, al no considerarse ético la realización de ensayos clínicos de eficacia con nuevas vacunas conjugadas de Hib, la evaluación de las mismas deberá hacerse, por tanto, a través de marcadores indirectos de inmunogenicidad y eficacia, tales como los títulos de Ac observados tras la primovacunación y la demostración de la existencia de memoria inmunológica. Si bien el título de Ac anti-PRP (o MGTs) es un parámetro sencillo que orienta al pediatra y al especialista en salud pública cuando se plantea qué vacuna conjugada Hib usar en la práctica clínica o en campañas de vacunación masiva, hay cada vez más evidencias que apuntan con claridad a que la primovacunación induce memoria inmunológica y que ésta juega un papel crítico en la protección frente al Hib. En los últimos años esto ha sido demostrado incluso cuando la vacuna conjugada de Hib se ha administrado a lactantes de forma simultánea, en una sola inyección, con otras vacunas establecidas en el calendario vacunal, sean éstas DTPE o DTPa.

Abreviaturas utilizadas en el texto

Ac: anticuerpos
 DTPa: vacuna frente a difteria, tétanos y B pertusis acelular
 DTPE: vacuna frente a difteria, tétanos y B pertusis de célula entera
 HBV: vacuna frente a hepatitis B
 Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b
 Ig: inmunoglobulinas
 IgG, IgM: inmunoglobulina tipo G o M
 MGT: media geométrica de los títulos de anticuerpos
 PRP: poloribosilribitol fosfato; polisacárido capsular del Hib
 RIA: radioinmunoanálisis

Agradecimientos

Agradecemos a los Dres. Rafael Dal-Ré, Pilar García, Lorenzo Aguilar y José Prieto la colaboración prestada en la confección de este trabajo.

Comité Asesor de Vacunas de la A.E.P.

Coordinador: Javier de Arístegui Fernández
 Vocales: Jose M^a Corretgert Rauet

Francisco García Martín
 Teresa Hernández Sampelayo
 Fernando Moraga Llop
 Carlos Rodrigo Gonzalo de Liria
 Jesús Ruiz Contreras
 Asesores: Francisco Calbo Torrecillas
 Gumersindo fontán casariego
 Jaime Muñiz Saitua

Bibliografía

- 1 Barquet N, Arístegui J, Ruiz-Contreras J et al. Hib-EuroSud'95: the South exists. *Vaccine* 1996; **14**:1569-1572.
- 2 Booy R, Kroll JS. Is *Haemophilus influenzae* finished? *J Antimicrob Chemother* 1997; **40**:149-153.
- 3 Heath PT. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: a review of efficacy data. *Pediatr Infect Dis J* 1998; **17** (Supl):S117-122.
- 4 Peltola H. *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Europe: lessons learned. *Pediatr Infect Dis J* 1998; **17**(Supl):S126-132.
- 5 Wenger JD. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b disease and impact of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in the United States and Canada. *Pediatr Infect Dis J* 1998; **17** (Supl):S132-136.
- 6 Frasch CE. *Haemophilus influenzae* type b conjugate and combination vaccines. *Clin Immunother* 1995; **4**:376-386.
- 7 Ward JI, Zangwill KM. *Haemophilus influenzae*. En: Textbook of pediatric infectious diseases. RD Feigin, JD Cherry (eds). 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1998: 1464-1482.
- 8 Heinzel FP. Antibodies. En: Principles and practice of infectious diseases. G Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds). 4th ed. New York: Churchill Livingstone. 1995: 36-57.
- 9 Peltola H, Kayhty H, Sivonen A, Makela PH. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics* 1977; **60**:730-737.
- 10 Peltola H, Kayhty H, Virtanen M, Makela PH. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with capsular polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1984; **310**:1561-1566.
- 11 Kayhty H, Karanko V, Peltola H, Makela PH. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and response to reimmunisation: no evidence of immunologic tolerance of memory. *Pediatrics* 1984; **74**:857-865.
- 12 Domínguez A, Prats G. Vacuna anti-*Haemophilus influenzae* tipo b. En: Vacunaciones preventivas. Principios y aplicaciones. L Salleras (ed). Barcelona: Masson SA. 1998: 311-336.
- 13 Kayhty H. Difficulties in establishing a serological correlate of protection after immunisation with *Haemophilus influenzae* conjugate vaccines. *Biologicals* 1994; **22**:397-402.
- 14 Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for use of *Haemophilus influenzae* conjugate vaccines and a combined diphtheria, tetanus, pertussis and *Haemophilus b* vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 1993; **42**(RR-13):1-14.
- 15 Stein KE. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. *J Infect Dis* 1992; **165**(suppl 1):S49-52.
- 16 American Academy of Pediatrics. En: 1997 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases, Peter G (ed). 24th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 1997.

- 17 Asociación Española de Pediatría: Calendario de Vacunaciones España 1995. *An Esp Pediat* 1995; **42**:81.
- 18 Miller MA, Meschievitz CK, Ballanco GA, Daum RS. Safety and immunogenicity of PRP-T combined with DTP: excretion of capsular polysaccharide and antibody response in the immediate post-vaccination period. *Pediatrics* 1995; **95**:522-527.
- 19 Greenberg DP, Vadheim CM, Partridge et al. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b tetanus toxoid conjugate vaccine in young infants. *J Infect Dis* 1994; **170**:76-81.
- 20 Ferreccio C, Clemens J, Avendano A et al. The clinical and immunologic response of Chilean infants to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine coadministered in the same syringe with diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine at two, four and six months of age. *Paediatr Infect Dis J* 1991; **10**:764-771.
- 21 Granoff DM, Anderson EL, Osterholm MT et al. Differences in the immunogenicity of three *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in infants. *J Pediatr* 1992; **121**:187-94.
- 22 Decker MD, Edwards KM, Bradley R, Palmer P. Comparative trials in infants of four conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccines. *J Pediatr* 1992; **120**:184-189.
- 23 Holmes SJ, Fritzell B, Guito KP et al. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infants. *Am J Dis Child* 1993; **147**:832-836.
- 24 Barbour ML. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerg Infect Dis* 1996; **2**:176-182.
- 25 Takala AK, Eskola J, Leinonen M et al. Reduction in oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1991; **164**:982-986.
- 26 Murphy TV, Pastor P, Medley F et al. Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *J Pediatr* 1993; **122**:517-523.
- 27 Eskola J, Peltola H, Takala AK et al. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infancy. *N Engl J Med* 1987; **317**:717-722.
- 28 Eskola J, Kayhty H, Takala AK et al. A randomized, prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infant and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *N Engl J Med* 1990; **323**:1381-1387.
- 29 Ward J, Brennenman G, Letson GW, Heyward WL. The Alaska *H influenzae* vaccine study group. Limited efficacy of a in Alaska native infants. *N Engl J Med* 1990; **323**:1393-1401.
- 30 Kurikka S, Kayhty H, Saarinen L, Ronnberg PR, Eskola J, Makela PH. Immunologic priming by one dose of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in infancy. *J Infect Dis* 1995; **172**:1268-1272.
- 31 Eskola J, Olander RM, Hovi T, Litmanen L, Peltola S, Kayhty H. Randomised trial of the effect of co-administration with acellular pertussis DTP vaccine on immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Lancet* 1996; **348**:1688-1692.
- 32 Schmitt HJ, Zepp F, Muschenborn S et al. Immunogenicity and reactogenicity of a *Haemophilus influenzae* type b tetanus conjugate vaccine when administered separately or mixed with concomitant diphtheria-tetanus-toxoid and acellular pertussis vaccine for primary and for booster immunizations. *Eur J Pediatr* 1998; **157**:208-214.
- 33 Scheifele D, Barreto L, Meekison W, Guasparini R, Friesen B. Can *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine be combined with diphtheria toxoid- pertussis vaccine-tetanus toxoid? *Can Med Assoc J* 1993; **149**:1105-1112.
- 34 Kayhty H, Eskola J, Peltola H, Saarinen L, Makela PH. High antibody responses to booster doses of either *Haemophilus influenzae* capsular polysaccharide or conjugate vaccine after primary immunization with conjugate vaccines. *J Infect Dis* 1992; **165**(suppl):S165-166.
- 35 Zepp F, Schmitt HJ, Kaufhold A et al. Evidence for induction of polysaccharide specific B-cell-memory in the first year of life: plain *Haemophilus influenzae* type b-PRP (Hib) boosters children primed with a tetanus-conjugate Hib-DPTa-HBV combined vaccine. *Eur J Pediatr* 1997; **156**:18-24.
- 36 Arístegui J, Dal-Ré R, Garrote E, González A, Arrate JP, Pérez A. Assessment of the immunogenicity and reactogenicity of a quadrivalent diphtheria, tetanus, acellular pertussis and hepatitis B (DTPa-HBV) vaccine administered in a single injection with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine, to infants at 2,4 and 6 months of age. *Vaccine* 1998; **16**:1976-1981.
- 37 Goldblatt D, Miller E, McCloskey N, Cartwright K. Immunological response to conjugate vaccines in infants: follow up study. *Br Med J* 1998; **16**:1570-1571.
- 38 Goldblatt D, Fairley CK, Cartwright K, Miller E. Interchangeability of conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccines during primary immunisation of infants. *Br Med J* 1996; **312**:817-818.
- 39 Deutsch J, Haschke F, Stögmann W, Willems P, Bogaerts H, Kaufhold A. Evidence that a 2-dose primary vaccination course of a combined DTPa-Hib vaccine induces immunological memory relevant for protection against *Haemophilus influenzae* type b disease. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. 1998; Abstract No G-33.