

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”  
Subdirección de Microbiología  
Departamento de Bacteriología Micología

RESPUESTA DE ANTICUERPOS SERICOS FRENTE A  
UNA VACUNA CONJUGADA CONTRA  
*Haemophilus influenzae* tipo b  
OBTENIDA POR SINTESIS QUIMICA

Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud

Autora: Lic. Gilda T. Toraño Peraza, MCs

Asesoras: Prof. Susana Vázquez Ramudo, DrC  
Prof. Alina Llop Hernández, DrC

Ciudad de La Habana  
2009

## SINTESIS

Para la evaluación de la inmunogenicidad de un candidato vacunal cubano contra *Haemophilus influenzae* b (Hib) obtenido por síntesis química (Quimi-Hib), inicialmente se llevó a cabo la validación de un ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos anti-PRP en el suero de los vacunados. Se diseñaron ensayos clínicos en diferentes grupos poblacionales (adultos, niños entre 4-5 años y lactantes), en los que se administró a los grupos controles, la vacuna Vaxem-Hib (Chiron). Se cuantificaron las concentraciones de anticuerpos anti-Hib por ELISA y se determinó la actividad bactericida de estos. En los estudios en adultos, una dosis de Quimi-Hib incrementó sustancialmente los niveles de IgG en el 100% de los vacunados y el empleo de adyuvante no modificó la respuesta. En los niños entre 4 y 5 años, Quimi-Hib mostró un perfil de inmunogenicidad similar al de la vacuna control y reestimuló una respuesta inmune previa, elevando las concentraciones de anticuerpos hasta niveles capaces de prevenir el estado de portador nasofaríngeo. Los ensayos en lactantes demostraron que, un mes después de la tercera dosis, el 99.6% de estos quedaron protegidos contra la enfermedad por Hib a largo plazo, y que en más del 70% los anticuerpos eran funcionales, independientemente de la vacuna recibida y del empleo de adyuvante. En el ensayo en que se evaluó la prevalencia de los anticuerpos 12 meses después de la primo-vacunación y la respuesta tras una dosis de refuerzo de Quimi-Hib, se demostró que los niños mantenían niveles de IgG protectores contra la enfermedad por Hib, y se puso de manifiesto el efecto “booster” (en el 96% de ellos se produjo un incremento de la concentración de anticuerpos funcionales). Estos resultados permitieron afirmar que la inmunogenicidad generada por Quimi-Hib reúne los requisitos exigidos por la OMS para la producción y control de vacunas conjugadas contra Hib.

## ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

Ag DT: Antígeno dependiente de células T

Ag HbO-HA: Antígeno de *Haemophilus influenzae* b conjugado a albúmina humana

Ag IT: Antígeno independiente de células T

ASB: Albúmina de suero bovino

CDC: *Control Diseases Center*, Centro para el Control de las Enfermedades

CECMED: Centro para el Control Estatal de Calidad de los Medicamentos

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

CRM197: Mutante no tóxica de la toxina diftérica

CV: Coeficiente de variación

D: Toxoide diftérico

DE: Desviación estándar

DPT: Vacuna contra la difteria, tétanos y tos ferina

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, Ensayo Inmunoenzimático

EUA: Estados Unidos de América

FA: Fosfato de Aluminio

GAVI: *Global Alliance for vaccine and Immunization*, Alianza Mundial para Vacunas e Inmunización

HbOC: Vacuna contra *H. influenzae* b conjugada a una mutante no tóxica de la toxina diftérica

HbO-HA: Antígeno de *H. influenzae* b conjugado a albúmina humana

Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b

HTM: *Haemophilus Test Medium*, Medio para *Haemophilus*

IC: Intervalo de confianza

IPK: Instituto “Pedro Kourí”

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LNRH: Laboratorio Nacional de Referencia de *Haemophilus*

MGC: Media geométrica de las concentraciones

OFD: o-fenildiamina

OMP: Proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis*.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PNI: Programa Nacional de Inmunización

PRP-D: Vacuna contra *H. influenzae* b conjugada al toxoide diftérico

PRP-OMP: Vacuna contra *H. influenzae* b conjugada a proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*

PRP-T: Vacuna contra *H. influenzae* b conjugada a la toxina tetánica

Quimi-Hib: Vacuna cubana contra *H. influenzae* tipo b, obtenida por síntesis química

RI: Radioinmunoensayo

SFB: Suero fetal bovino

T: Toxina tetánica

TFS: Tampón fosfato salina

UH: Universidad de La Habana

Vaxem-Hib: Vacuna conjugada contra *H. influenzae* b, comercializada por Chiron, Italia

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

X: Media de las concentraciones

## INDICE

	Pág.
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Hipótesis</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Novedad científica</b>	<b>6</b>
<b>1.5. Valor teórico</b>	<b>6</b>
<b>1.6. Valor práctico y social</b>	<b>6</b>
<b>II. REVISION BIBLIOGRAFICA</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Enfermedad por <i>Haemophilus influenzae</i></b>	<b>9</b>
<b>2.2. La incidencia de la enfermedad por <i>H. influenzae</i></b>	<b>9</b>
<b>2.2.1. Transmisión</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2. Contagio</b>	<b>11</b>
<b>2.2.3. Factores de riesgo</b>	<b>11</b>
<b>2.2.4. Comportamiento epidémico</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Superficies microbianas de <i>H. influenzae</i> en relación con la patogenicidad</b>	<b>13</b>
<b>2.3.1. La cápsula de <i>H. influenzae</i></b>	<b>13</b>
<b>2.3.2. Anticuerpos contra el polisacárido capsular de <i>H. influenzae</i> b (Hib)</b>	<b>14</b>
<b>2.3.3. El polisacárido capsular de Hib como inmunógeno</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Identificación de <i>H. influenzae</i></b>	<b>16</b>
<b>2.5. Métodos para medir la inmunidad frente a Hib</b>	<b>16</b>
<b>2.5.1. Radioinmunoensayo</b>	<b>16</b>

2.5.2. Ensayos inmunoenzimáticos	17
2.5.3. Determinación de la actividad funcional de los anticuerpos	17
2.5.4. Concentración de anticuerpos anti-Hib protectores	18
2.6. Vacunas polisacarídicas contra Hib	20
2.6.1. Incremento de la respuesta inmune frente a vacunas polisacarídicas contra Hib	21
2.7. Vacunas conjugadas contra Hib	22
2.7.1. Respuesta inmune para las vacunas conjugadas contra Hib	22
2.7.2. Protección conferida por las vacunas conjugadas contra Hib	24
2.8. Las vacunas conjugadas contra Hib en el Programa de Vacunación Infantil	26
2.8.1. Empleo de las vacunas conjugadas contra Hib junto a otras vacunas	27
2.9. Costos y beneficios de la vacunación contra Hib	27
2.10. Reducción del estado de portador nasofaríngeo de Hib	29
2.11. Impacto de la vacunación en la epidemiología de Hib	30
2.11.1. Fallos vacunales	31
2.12. Recomendaciones de la OMS para la vacunación contra Hib	32
2.13. Incidencia de la enfermedad invasiva por Hib en Cuba e introducción de la vacunación	33
2.14. Vacunas sintéticas	34
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>36</b>
3.1. Confirmación del ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib en suero humano	37
3.1.1. Descripción del método	37
3.1.2. Protocolo para la confirmación	38

<b>3.1.2a.</b> Precisión intraensayo (Repetibilidad)	<b>38</b>
<b>3.1.2b.</b> Precisión interensayo (Reproducibilidad)	<b>38</b>
<b>3.1.2c.</b> Veracidad	<b>38</b>
<b>3.2.</b> Estudios clínicos para la demostración de la inmunogenicidad de Quimi-Hib	<b>39</b>
<b>3.2.1.</b> Vacunas y dosis administradas	<b>40</b>
<b>3.2.2.</b> Ensayos clínicos en voluntarios adultos	<b>40</b>
<b>3.2.4.</b> Ensayos clínicos en niños entre 4 y 5 años de edad	<b>41</b>
<b>3.2.4.a.</b> Determinación de la inmunidad naturalmente adquirida y estudio del estado de portador nasal y faríngeo en niños entre 4 y 5 años de edad.	<b>44</b>
<b>3.2.5.</b> Ensayos clínicos en lactantes	<b>44</b>
<b>3.2.6.</b> Estudio “Booster”	<b>47</b>
<b>3.3.</b> Evaluación de la inmunogenicidad	<b>47</b>
<b>3.4.</b> Análisis estadístico	<b>49</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>51</b>
<b>4.1.</b> Confirmación del ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib en suero humano	<b>52</b>
<b>4.1.a.</b> Resultados de la estimación de la precisión	<b>52</b>
<b>4.1.b.</b> Resultados de la estimación de la veracidad	<b>55</b>
<b>4.2.</b> Evaluación de la inmunogenicidad de Quimi-Hib	<b>57</b>
<b>4.2.1.</b> Ensayos clínicos en adultos	<b>57</b>
<b>4.2.2.</b> Ensayos clínicos en niños entre 4 y 5 años de edad	<b>61</b>
<b>4.2.2.a.</b> Resultados del estudio de fase I	<b>61</b>

<b>4.2.2.b.</b> Resultados del estudio de fase II	<b>64</b>
<b>4.2.2.c.</b> Inmunidad naturalmente adquirida y estudio del estado de portador nasal y faríngeo en niños entre 4 y 5 años de edad.	<b>67</b>
<b>4.2.3.</b> Ensayos clínicos en lactantes	<b>71</b>
<b>4.2.3.a.</b> Resultados del estudio de fase I	<b>71</b>
<b>4.2.3.b.</b> Resultados del estudio de fase II	<b>73</b>
<b>4.3.</b> Evaluación de la respuesta inmune tras una dosis de refuerzo de Quimi-Hib.	<b>76</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>83</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS</b>	

## Agradecimientos

*Fábula de Esopo*

*Una cierva era perseguida por unos cazadores y se refugió bajo una viña. Pasaron cerca los cazadores, y la cierva, creyéndose muy bien escondida, empezó a saborear las hojas de la viña que la cubría. Viendo los cazadores que las hojas se movían, pensaron muy acertadamente que allí adentro había un animal oculto, y disparando sus flechas hirieron mortalmente a la cierva. Ésta, viéndose morir, pronunció estas palabras:*

*-¡Me lo he merecido, pues no debí haber maltratado a quien me estaba salvando!*

*Agradece a los que te ayudan.*

La gratitud es aquella actitud que nace del corazón en aprecio a lo que alguien más ha hecho por nosotros, por eso quiero retribuir de manera sencilla las muestras de afecto y la generosidad que muchas personas tuvieron conmigo para llegar hasta aquí.

Le debo un cálido agradecimiento a la Dra. María Eugenia Toledo y al Lic. Alberto Baly con quienes tuve el privilegio de trabajar a lo largo de todo este proyecto, que cobró vida precisamente por ellos. Además de contar con el concurso de ambos como profesionales, les estoy profundamente agradecida por su disposición permanente e incondicional a aclarar mis dudas durante mis frecuentes enredos y variables estado de ánimo.

A la Lic. Ibis Hernández por su ayuda fundamental, por compartir conmigo muchas cosas y acompañarme en importantes y tristes momentos; sin lugar a dudas, tras largas horas de trabajo juntas en el laboratorio, ella es tan autora como yo de este trabajo. Ella sabe que la quiero y humildemente le pido que perdone mis constantes regaños.

Quiero agradecer a la Dra. Susana Vázquez y a la Dra. Alina Llop por la fructífera discusión, la valiosa asesoría científica y por sus sugerencias durante la redacción de este documento; el consejo y la orientación de ambas me permitió lograr esta meta.

Aprecio sincera y cordialmente, el apoyo recibido del Dr. Gerardo Martínez, con él tengo la obligación permanente de estar a la altura de su confianza.

Y, recordando un proverbio chino que reza: *Cuando bebas agua, recuerda la fuente*, creo que sería imperdonable no reconocer y agradecer la oportunidad que tuve de poder desarrollar este trabajo, en el marco de un proyecto de investigación que nació del talento de otros científicos y que se llevó a vías de hecho, también gracias al empeño de muchos otros investigadores. De igual forma no puedo

abstraerme de agradecer a los muchos niños que participaron en los estudios que posibilitaron la demostración de lo que nos proponíamos.

Vayan también mis agradecimientos sinceros para: Mayda Perurena, Carlos Fernández, Rosabel Falcón, Dianeya Mendoza, Lilian Mederos, María Teresa Illnait, Iliana Valdés, Dihadenys Lemus, Miriam Abreu, Miriam Pérez, Antonio Delgado, Rosarys Martínez, Iraidá Rodríguez, Rafael Llanes y Yaima Mendoza, por los alegres “*Tea Times*” y las entusiastas sesiones de cumpleaños colectivos. Sin ellos, yo sería más pobre como ser humano, y la vida es como una montaña rusa, que resulta mucho más divertida acompañada de amigos.

A mi grande y gran familia, por su apoyo incondicional, sin su inspiración no habría terminado este trabajo, sobre todo en los tristes momentos que vivimos juntos hacia el final. Gracias a mis hermanos por confiar en mi, y muy en especial a mi mamá y mi papá, que me infundieron la ética y el rigor que guían mi transitar por la vida y a quienes no pretendo “pagar” por el beneficio recibido de ellos, pero si agradecerles como hacen los niños, con una sonrisa, un abrazo y un beso. Se con eso, a mis padres les basta.

A mi esposo, Pelegrino, quien indiscutiblemente ha contribuido a mi formación profesional, “me ha sacado de apuros”, escuchado y aconsejado, pero sobre todas las cosas, por su comprensión. A Luis Andrés, mi hijo, quien con el simple pero sincero y dulce gesto de preguntarme como marchaban las cosas, me recordó que seguir creciendo intelectualmente es parte de mi responsabilidad en su educación y me incitó de esta forma a llegar al final.

Y para intentar reparar en lo posible las injusticias que se que siempre se cometen en los agradecimientos, quiero terminar dando las gracias a todos los que involuntariamente pueda haber olvidado; a los que de una forma u otra acudieron en mi auxilio y me colaboraron de buena voluntad, todos ocupan un rinconcito en mis afectos.

## Dedicatoria

---

*A mi papá*

## **I. INTRODUCCION**

### **1.1 Introducción**

*Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) es un importante patógeno humano que por muchos años, antes de la introducción de la vacunación, constituyó el principal responsable de las meningitis bacterianas en todas las regiones del planeta (Adams y col., 1993).

La vacunación contra este agente se inició en la década de 1970 con el empleo de vacunas polisacáridicas que fueron sucedidas 10 años después por vacunas conjugadas (Peltola, 2000). El licenciamiento de estas tuvo lugar en 1987 y actualmente son recomendadas para su empleo en todas las regiones del planeta pues constituyen herramientas eficaces para la prevención de las más severas y comunes infecciones invasivas por Hib. En los países en los que han podido ser incluidas en los programas de inmunización infantil ha tenido lugar una rápida y drástica reducción en la incidencia de la enfermedad (Garpenholt y col, 2000; Adegbola, 2005). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que Hib causa, por lo menos, 3 millones de casos de enfermedad severa y entre 400 000 y 700 000 muertes cada año, pues en muchos países no ha sido introducida aún la vacunación (WHO, 1998; Peltola, 2000; OMS, 2005).

El alto precio de las vacunas conjugadas constituye el principal obstáculo. Por ejemplo, a los precios actuales en los países industrializados, tres dosis de vacuna conjugada anti-Hib cuestan 15 veces más que el conjunto de las seis vacunas básicas contenidas en el calendario de vacunación infantil (a los precios descontados ofrecidos por la UNICEF) (García y col., 2002). Para aquellos países con derecho a financiamiento de la Alianza Mundial para Vacunas e Inmunización (GAVI), el precio actual de una vacuna combinada, que incluya la de Hib, se ha elevado a 3.60 \$US por dosis (Bennett, 2006).

Se proponen diversas alternativas para contribuir a disminuir el costo de la vacunación contra Hib, dentro de las cuales se destaca la que se refiere a que el número de dosis puede ser disminuido sin afectar los resultados (Levine y col., 1993; Booy y col., 1994; Peltola y col., 1999, Aracil y Campos, 2003). Una segunda sugerencia aborda la posibilidad de emplear una menor cantidad de antígeno por dosis de vacuna. Este es el caso de las

experiencias reunidas en la inmunización con la mitad o la tercera parte de la dosis tradicionales y con una dosis de vacuna conjugada anti-Hib, diluida 10 veces en la vacuna DPT (difteria, tétanos, tos ferina) (Lagos y col., 1998; Nicol y col., 2002).

Un tercer enfoque apunta hacia la conveniencia de administrar la vacuna anti-Hib en combinación con otras incluidas en los programas de inmunización, lo que conduce indudablemente a la reducción del costo y al incremento de la cobertura de vacunación, pero en algunos casos también a la disminución de la eficacia (Eskola y col., 1999; Aracil y Campos, 2003). El cuarto y último acercamiento al problema alude directamente a la necesidad de un mejor ajuste del costo, para que esta no constituya un privilegio exclusivo de sólo algunos países del mundo. Tal alternativa es la más difícil de concretar pues la alta incidencia de la enfermedad invasiva por Hib, hace de esta vacuna un excelente producto del mercado biotecnológico (CDC, 1999; Peltola, 2000; Clemens y col., 2003).

En Cuba, en 1989, el Laboratorio de Antígenos Sintéticos de la Facultad de Química en la Universidad de La Habana (UH), propuso una novedosa estrategia para la producción de una vacuna conjugada contra Hib a través de la síntesis química del polisacárido capsular de la bacteria. El éxito de esta permitiría obtener localmente las dosis necesarias para la cobertura nacional de vacunación.

Con esta estrategia se reproduce exactamente la estructura química de un fragmento del polisacárido capsular de Hib, por oligomerización del disacárido intermedio, a través de una reacción de policondensación en fase homogénea. El antígeno sintético así obtenido contiene una mezcla de oligosacáridos de unidades repetidas del monómero del polisacárido capsular de Hib (entre 4 a 15 unidades) y está provisto de un espaciador que se encuentra a continuación de la última unidad de fosfato (Verez-Bencomo y Roy, 1999).

Tras algunos años de investigaciones a nivel académico, la tecnología principal para crear esta vacuna fue patentada de manera conjunta con la Universidad de Ottawa, Canadá (Verez-Bencomo y Roy, 1999). El antígeno obtenido por síntesis química luego de su conjugación a una proteína “carrier” derivó en un preparado vacunal para el que se completaron satisfactoriamente los ensayos preclínicos, pero cuya inmunogenicidad y

seguridad para el uso en humanos debía ser comprobada (Fernández-Santana y col., 2004).

En este documento se presentan los resultados de los estudios clínicos llevados a cabo en diferentes grupos de poblaciones, tras los cuales el preparado obtenido se registró bajo la denominación de Quimi-Hib: *No. Certificado de Inscripción: B-03-150-J07, expedido por el Centro para el Control Estatal de Calidad de los Medicamentos (CECMED) el 5 de noviembre 2003.*

La ausencia de componentes bacterianos en la composición de esta vacuna condiciona que los procesos de certificación y de escalado productivo sean menos costosos, así como que su obtención sea más exacta, reproducible y económica que la de las vacunas conjugadas convencionales. Esto permitiría extender su uso hacia aquellas regiones del mundo donde la población infantil no recibe protección contra Hib y al mismo tiempo representa un paso adelante en el desarrollo de vacunas eficaces contra muchas otras enfermedades.

Quimi-Hib constituye la primera vacuna de su tipo para uso en humanos. La demostración de la eficacia clínica lograda con su empleo fue la motivación fundamental del presente trabajo, en el que nos propusimos la siguiente hipótesis:

### **1.2 Hipótesis**

**La vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b obtenida por síntesis química (Quimi-Hib), induce niveles de anticuerpos protectores que no difieren significativamente de los generados por las vacunas homólogas obtenidas a través de los métodos convencionales.**

Para su confirmación nos trazamos los siguientes objetivos:

### **1.3 Objetivos**

#### **Objetivo General**

Evaluar la respuesta inmune en voluntarios sanos de diferentes grupos poblacionales, tras la administración de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b obtenida por síntesis química (Quimi-Hib).

#### **Objetivos Específicos**

1. Confirmar, en las condiciones del laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus* en el IPK, un sistema ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib en suero humano.
2. Evaluar la respuesta inmune en adultos sanos tras la administración de una dosis de Quimi-Hib sin adyuvante y adyuvada fosfato de aluminio.
3. Investigar el estado de portador nasal y faríngeo y los niveles de anticuerpos contra *H. influenzae* b, en niños cubanos entre 4 y 5 años de edad no vacunados contra este agente, y evaluar la respuesta inmune tras la administración de Quimi-Hib.
4. Evaluar la inmunogenicidad de Quimi-Hib en lactantes y comparar los niveles de anticuerpos protectores que se logran al administrarla, con y sin adyuvante.
5. Determinar los niveles de anticuerpos contra *H. influenzae* b un año después de la primo-vacunación de los lactantes y evaluar el efecto, tras una dosis de refuerzo con Quimi-Hib, en este mismo grupo de niños.

#### **1.4 Novedad científica**

- Los resultados de los estudios que se integran en este documento contribuyeron al primer reporte en el mundo de alta eficacia en humanos, al emplear una vacuna producida por síntesis química. Tal evidencia científica es un paso adelante en el camino relativamente joven de las investigaciones inmunológicas sobre antígenos sintéticos, para el desarrollo de otras vacunas contra enfermedades que aún son un problema de salud mundial.
- Se recoge el primer estudio en Cuba que aporta datos sobre los altos niveles de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib en población infantil no vacunada, información que adquiere mayor relevancia si se considera que se evaluó la inmunidad natural para Hib en un grupo representativo de la última cohorte de niños no vacunados.

#### **1.5 Valor teórico**

Las observaciones del estudio de inmunidad naturalmente adquirida en niños sanos entre 4 y 5 años de edad, brindan información al respecto con verdadera magnitud. De esta forma se logró encontrar explicación a los bajos niveles de portadores nasofaríngeos de Hib en Cuba, demostrados en investigaciones anteriores desarrolladas por el laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus* en el IPK.

#### **1.6 Valor práctico y social**

- El conjunto de evidencias proporcionadas por los estudios clínicos recogidos en este documento, permitió poner a disposición del sistema de salud cubano una vacuna contra Hib. Su presentación a las autoridades del CECMED condicionó que el candidato a vacuna recibiera el Certificado de Registro para su uso en el país, haciendo posible la producción local de las dosis necesarias para la cobertura nacional de vacunación.
- La evaluación de la respuesta inmune tras la administración de Quimi-Hib a niños entre 4 y 5 años de edad, permitió beneficiar a un grupo representativo de la última cohorte no

vacunada en Cuba, que de acuerdo con la estrategia seguida en el país en el momento de la introducción de la vacunación, no cumplían con los requisitos de inclusión.

- Los estudios de inmunogenicidad que se describen en este documento para los diferentes grupos meta respaldan, con un nivel de evidencia robusta, la aplicación de la vacuna Quimi-Hib, erigiéndose esta como un producto biotecnológico de enorme impacto social que puede representar un avance hacia la accesibilidad para aquellos países en los que la vacunación contra Hib no ha podido ser introducida. Por otro lado, sentaron precedentes para el ulterior desarrollo de la vacuna Pentavalente cubana.
- La confirmación, en las condiciones del laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus* en el IPK, del ELISA indirecto para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib, abrió un camino en la acreditación del laboratorio. Esto permitió el aseguramiento de la calidad del trabajo durante los estudios de inmunogenicidad de Quimi-Hib y condicionó su participación en las evaluaciones clínicas de otras formulaciones de vacunas contra este agente.

## II. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1. Enfermedad por *Haemophilus influenzae*

La meningitis bacteriana constituye la entidad clínica más significativamente asociada con *H. influenzae*. Consiste en una inflamación aguda y purulenta de las meninges, producida también por otras bacterias, entre las que se destacan *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*. Para *H. influenzae* se reporta una incidencia mayor entre lactantes y se le reconoce como el agente más común en menores de 2 años de edad, con un índice de mortalidad que oscila entre un 2 y 5% (Munson y col., 1989; Makela y col., 1992). La muerte se produce fundamentalmente en los casos en los que el diagnóstico se realiza tardíamente, y en los pacientes que sobreviven se presenta como una importante causa de sordera y de otras manifestaciones neurológicas, tales como la epilepsia y retardo en el aprendizaje (Taylor y col., 1990; Fortum, 1992; Makela y col., 1992).

La epiglotitis es otra de las expresiones invasivas de la enfermedad por *H. influenzae*. Consiste en una inflamación aguda de la epiglotis que conlleva a la obstrucción de las vías respiratorias y por consiguiente a la muerte (Makela y col., 1995). En algunas áreas geográficas constituye la segunda causa de enfermedad por este agente, mientras que en otras es totalmente desconocida (Claesson y col., 1984; Ward y col., 1986). Se presenta más frecuentemente en niños alrededor de los 3 años de edad y entre madres de niños con una meningitis por *H. influenzae* en curso (Takala y col., 1990; Morgan y Walport, 1991).

Otras manifestaciones de la enfermedad por *H. influenzae* incluyen a la celulitis, artritis, neumonía, pericarditis, osteomielitis y septicemia. La distribución de estas varía en las diferentes regiones geográficas y depende además de la eficacia del diagnóstico (Takala y col., 1989; Otero y col., 2005).

### 2.2. La incidencia de la enfermedad por *H. influenzae*

La enfermedad invasiva por Hib tiene una distribución mundial y representa un problema de salud cuya incidencia y manifestación varían en diferentes regiones del mundo,

existiendo incluso diferencias entre regiones y grupos étnicos de un mismo país. Las poblaciones autóctonas en países desarrollados tienen a menudo una incidencia mucho más elevada. Por ejemplo: en poblaciones nativas de Alaska y aborígenes de Australia, es de más de 150/100 000, en niños menores de 4 años de edad; entre niños beduinos en Israel, maoris y melanesios en Oceanía y mapuches en Chile, el riesgo de meningitis por Hib es notablemente más alto que en la población general (Peltola, 2000).

De acuerdo con los datos ofrecidos por la OMS y por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas (CDC) de Atlanta, EUA, en los países desarrollados antes de la vacunación, Hib era la causa más importante de enfermedad bacteriana invasiva en niños pequeños, y la meningitis la manifestación más común (Wattanasri, 1993; WHO, 1998; CDC, 2003). Los datos que proporcionan estudios realizados en países en desarrollo, a pesar de subestimar la verdadera carga de la enfermedad, igualmente conducen a esta conclusión. Por ejemplo, en un estudio en una serie que incluyó 2 000 personas en el sur y sureste de Asia y en el Medio Oriente, Hib fue responsable del 50% de los casos de meningitis infantil y del 25% de todos los casos de meningitis (Peltola, 1999). Igualmente, en Tailandia durante 1990, Hib fue la causa más común de meningitis bacteriana infantil (43% de 389 casos) y la incidencia máxima se produjo entre los 5 y 6 meses de edad. En los países en desarrollo también las neumonías por Hib son un problema de salud significativo, pero debido a la inherente dificultad para establecer la etiología en infecciones respiratorias, es probable que se subestime la verdadera carga de enfermedad (WHO 1998; Peltola 2000; Baggett, 2006).

### 2.2.1. Transmisión

*H. influenzae* constituye una bacteria comensal de las vías respiratorias superiores en el hombre, que es el único reservorio natural conocido para este agente. La exposición comienza después del nacimiento y de ahí en adelante es común la transmisión de una o más cepas pues la colonización nasofaríngea es un proceso dinámico, con nuevas cepas que se adquieren y otras que se reemplazan. La transmisión ocurre a través del contacto directo con secreciones respiratorias o por inhalación de gotas transportadas por el aire (Moxon y Rappuoli, 1990; Murphy, 2001; CDC, 2003).

Antes del uso extendido de las vacunas para Hib las investigaciones dirigidas a la búsqueda de portadores nasofaríngeos reportaban una colonización en lactantes que oscilaba entre 0.5-3%, pudiendo llegar hasta un 15% en algunas poblaciones (WHO, 1998; CDC, 2003). En la mayoría de los casos Hib coloniza asintóticamente las vías respiratorias superiores, con frecuencia durante períodos prolongados, pero la enfermedad invasiva sólo se manifiesta cuando pasa de las vías respiratorias a la sangre (Murphy, 2001).

### **2.2.2. Contagio**

Hib tiene un potencial de contagio limitado y la enfermedad secundaria, definida como la enfermedad de 1 a 60 días después del contacto con un niño enfermo, es relativamente poco común (menos de un 5% de los casos de enfermedad invasiva por Hib). Cuando los contactos tienen lugar dentro de la misma casa, la tasa de ataque secundario es sólo del 0.3% y esta cifra que parece pequeña es sin embargo, 600 veces mayor que el riesgo por contacto para la población general (CDC, 2003). Las tasas de enfermedad como consecuencia de los contactos en la casa son específicas de la edad, variando desde 0 a 3.7% entre niños mayores de 6 años y menores de 2 años, respectivamente. Las tasas de ataque secundario en círculos infantiles varían de 0 a 2.7% (CDC, 2003).

### **2.2.3. Factores de riesgo**

Edad: Es la influencia principal en la susceptibilidad a la enfermedad por Hib. En neonatos, la enfermedad invasiva es relativamente infrecuente debido a la combinación de una exposición más baja al microorganismo, los efectos protectores de los anticuerpos maternos y la protección conferida por la lactancia. En cambio, desde los 6 meses y hasta los 2 años, los niños están en un riesgo más alto. A partir de los 3 años comienzan a desarrollar inmunidad natural y la incidencia de la enfermedad disminuye (Murphy, 2001; CDC, 2003). Su influencia varía en distintas poblaciones; por ejemplo, en EUA menos de un 20% de la enfermedad ocurre en niños mayores de 24 meses y se reportan las tasas más elevadas entre lactantes menores de 7 meses, para poblaciones con una alta incidencia (indios navajos y apaches). En Finlandia, en cambio, la incidencia se hace máxima en niños mayores; y en Gambia, el 83% de todos los casos de meningitis ocurren en menores de un

## *II. Revisión Bibliográfica*

---

año de edad (Coulchan, 1984; Losonsky, 1984; Bijlmer y van Alphen, 1992).

Sexo: Pese a que en general casi todos los estudios describen una incidencia igual de la enfermedad en ambos sexos, algunos reportes indican que las tasas de ataque son de 1.2 a 1.5 veces mayores, en los niños que en las niñas (Likitnukul, 1994; CDC, 2003).

Origen étnico: En ciertos grupos étnicos la incidencia de la enfermedad invasiva por Hib es más elevada, entre los que se encuentran: afro-americanos, americanos nativos en el sureste de Alaska, indios navajos y apaches, poblaciones hispanas en los EUA y aborígenes australianos. Pese a que aún se desconoce el motivo, se piensa que pudieran participar factores socioeconómicos, hacinamiento y diferencias genéticas en la capacidad para generar una respuesta inmunológica (Murphy, 2001; CDC, 2003).

Asistencia a círculos infantiles: Los niños que acuden a círculos infantiles o guarderías se exponen a un riesgo significativamente mayor de padecer una infección invasiva por Hib. La asistencia a estas instalaciones pudiera ser un factor de contribución de hasta un 50% de todos los casos de enfermedad invasiva por Hib (Istre y col., 1985; Istre, 1993).

Factores socioeconómicos: Varios factores socioeconómicos pudieran aumentar la probabilidad de exposición a la bacteria, entre ellos: gran número de contactos en la casa (hermanos en edad escolar), hacinamiento, bajos ingresos familiares, escasa educación de los padres y el no acceso a la vacunación (Istre y col., 1985; Vadheim, 1992; Istre, 1993).

Enfermedad subyacente: Ciertos trastornos hematológicos e inmunológicos aumentan el riesgo de infección por Hib, incluyendo la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), anemia de células falciformes, esplenectomía, síndromes de deficiencia de anticuerpos y complemento, e inmunosupresión durante los períodos de quimioterapia contra enfermedades malignas (CDC, 2003).

Infección viral previa: Los virus respiratorios aumentan la susceptibilidad a la enfermedad invasiva por Hib. Las infecciones respiratorias virales previas o concomitantes podrían alterar la inmunidad de la mucosa o la flora bacteriana de las vías aéreas superiores y aumentar temporalmente la susceptibilidad a la enfermedad (Takala, 1993; CDC, 2003).

### 2.2.4. Comportamiento epidémico

La enfermedad invasiva por Hib parece presentar un patrón de temporada bifásico. En EUA, por ejemplo, la incidencia máxima ocurre en septiembre-diciembre y en marzo-mayo, mientras que en Tailandia los picos máximos se producen en enero-marzo y septiembre-diciembre. Se desconoce la razón de este patrón, pero se sugiere que pudiera estar relacionado con las temporadas en que tienen lugar un mayor número de nacimientos, o con aquellas en las que se incrementa la escolarización de los hermanos mayores y por tanto, las probabilidades de introducción del agente en la casa (Peltola, 2000).

### 2.3. Superficies microbianas de *H. influenzae* en relación con la patogenicidad

En *H. influenzae* se han descrito algunos componentes y sustancias extracelulares que juegan un importante papel en la patogenicidad. La virulencia de *H. influenzae* es multifactorial e involucra: la producción de factores antifagocíticos (cápsula), la adhesión positiva de la bacteria a las células (pilis y proteínas de membrana externa), la toxigenicidad (lipopolisacárido), la invasividad (proteínas de membrana externa), así como la predisposición genética del hospedero y la funcionalidad de su sistema inmune.

#### 2.3.1 La cápsula de *H. influenzae*

Un gran número de especies de *Haemophilus* poseen cápsula, pero esta es de particular interés en *H. influenzae*, donde resulta vital en la patogenicidad, especificidad del serovar y producción de inmunidad. Los aislamientos de *H. influenzae* puede presentarse de dos formas diferentes: capsulados y no capsulados. Estos últimos son los predominantes en la microbiota nasal y faríngea, mientras que las formas capsuladas constituyen la principal causa de infección invasiva, pero son las menos importantes en los portadores nasofaríngeos. Un estudio realizado por Takala y colaboradores en 1991, demostró que el 19% de los niños finlandeses de 3 años de edad constituían portadores de formas no capsuladas y sólo el 3.5% portaban en la orofaringe formas capsuladas del serotipo b. Otras investigaciones señalan que *H. influenzae* puede ser aislado a partir de exudados del oído medio, entre el 10 y el 30% de los casos de otitis, pero sólo el 10% de los aislamientos son capsulados (Luotonen y col., 1981; Ruuskanen y Heikkinen, 1994; Xin-Xing y col., 2003).

La cápsula está compuesta por polisacáridos cuya estructura condiciona la especificidad serológica y define el serotipo. La composición química del polisacárido capsular del serotipo b ha sido bien estudiada y se conoce que es un polímero lineal de ribosa, ribitol y fosfato, con un promedio de 300 unidades repetidas a lo largo de la cadena (Rodrigues y col. 1971; Crisel y col., 1975). Su estructura está estrechamente relacionada a la del polisacárido capsular de *Escherichia coli* K100 y, aunque de forma más distante, con la de los tipos 6A y 6B de *S. pneumoniae* (Lagergard y Branefors, 1983; Tsui Fai-P y col. 1988). Sin embargo, sólo en el caso de *E. coli* K100 se describe reacción con anticuerpos específicos para Hib (Myerowitz y col., 1973; Schneerson y Robbins, 1975).

El tipo b es el más común en infecciones invasivas y se le asocia con un mayor potencial patogénico, seguido por los tipos a, c y d (Zwahlen y col., 1989). Las formas del tipo b representan el 95% de los aislamientos a partir de meningitis (Shann, 1986; Weinberg y col., 1989). La cantidad de polisacárido capsular producido varía y el incremento en la producción se reconoce como un mecanismo potencial de virulencia (Corn y col., 1993).

### 2.3.2. Anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib

De acuerdo con estudios realizados en diferentes áreas geográficas, la media geométrica de la concentración (MGC) de anticuerpos específicos para el polisacárido capsular de Hib en el suero de individuos adultos, oscila entre 1 y 2  $\mu\text{g/mL}$ . Estos niveles se atribuyen a la respuesta inmune que se produce como consecuencia de una colonización nasofaríngea por Hib y a la reacción cruzada con otras bacterias (Schneerson y col., 1971; Peltola y col., 1977; Kayhty y col., 1991).

En el caso de los niños recién nacidos se conoce que estos reciben de la madre, a través de la placenta, anticuerpos contra el polisacárido de Hib, pero que la concentración disminuye en los lactantes como consecuencia del incremento de la masa corporal y de la eliminación de los anticuerpos maternos, para los cuales se ha descrito una vida media de 46 días (Sorva y col., 1990; Sarvas y col. 1993). A los 4 meses de edad la MGC de anticuerpos se reduce hasta representar el 10% de la observada al nacer, y a los 8 meses sólo constituye el 1% de

la concentración inicial (Makela y col., 1995), permaneciendo baja hasta el segundo año de vida (Schneerson y col., 1971; Peltola y col., 1977; Kayhty y col., 1981 y 1984; Rijkers y col., 1988; Trollfors y col., 1992).

### 2.3.3. El polisacárido capsular de Hib como inmunógeno

Los polisacáridos son el prototipo de antígenos independientes de células T (Ag IT), lo que se refiere a su incapacidad para ser presentados a dichas células y auxiliarse de ellas para desencadenar respuesta inmune; por lo tanto, además de realizar por sí solos el reconocimiento de las inmunoglobulinas de superficie de las células B, necesitan estimularlas de forma específica (Mosier y Subbarao, 1982; Stein, 1992). Únicamente las células B maduras son capaces de responder frente al estímulo de los antígenos capsulares bacterianos, reconocidos como antígenos Ag IT tipo 2. Sólo después del segundo año de vida el sistema inmune del hombre adquiere esta capacidad (Howard, 1987; Gordon, 1991).

La respuesta frente a los Ag IT tiene otras importantes características con implicaciones directas para la respuesta ante una vacuna. Entre ellas se destaca la incapacidad de generar memoria en las células T, lo que hace necesario la administración de dosis de refuerzo. Por otra parte, la respuesta frente a Ag IT generalmente se restringe a una clase u otra de inmunoglobulinas. Algunos sólo inducen una respuesta dominante de IgM en ratones; sin embargo, para otros, como es el caso del polisacárido capsular de Hib en el hombre, se observa respuesta de anticuerpos del tipo IgM, IgG e IgA, con predominio de la IgG (Kayhty y col., 1981; Makela y col., 1987).

La respuesta de isotipos de IgG es también restringida frente al antígeno capsular de Hib: IgG3 en ratones e IgG2 en el hombre, aunque para este último es posible encontrar respuesta del tipo IgG1 (Makela O y col., 1987; Shackelford y col. 1987). De igual forma, un alotipo específico de IgG2 parece ser más productivo que otros, y así, individuos homocigóticos para el alelo *G2m(23)* producen más IgG2 que los homocigóticos para el alelo negativo (Granoff y col., 1988; Sarvas y col., 1990). Existen además, algunos indicios sobre que la respuesta de tipo IgG1 podría ser más activa que la del tipo IgG2, lo que

resulta relevante para el caso de la infección invasiva en lactantes, pues la IgG2 se produce sólo después de los 2 años de edad (Makela y col., 1995; Baggett y col., 2006).

### 2.4. Identificación de *H. influenzae*

Los aislamientos de *H. influenzae* se caracterizan por ser bacilos gramnegativos pequeños o cocobacilos, que requieren factores de crecimiento X y V. Crecen en agar chocolate, pero no en agar sangre de carnero, y tienen un olor picante a indol. Su presencia se detecta por colonias aplastadas, opacas, entre incoloras y grises; el medio no presenta hemólisis ni decoloración aparente. Su identificación en el laboratorio incluye la prueba de los requerimientos de factores X y V y serotipificación. En el Anexo 1 se presenta el diagrama de flujo recomendado internacionalmente para la confirmación de la identificación de *H. influenzae* (Perilla y col., 2003).

### 2.5. Métodos para medir la inmunidad frente a Hib

#### 2.5.1. Radioinmunoensayo

El método clásico para la cuantificación de anticuerpos para el polisacárido capsular de Hib es el Radioinmunoensayo (RI). En este, el antígeno polisacarídico se marca con  $I^{125}$  y  $C^{14}$  y se genera una curva estándar a partir de las diluciones seriadas de un suero de referencia (NIH, lote 1293, Department of Health and Human Services, National Institute of Health, Maryland) al cual se asigna una concentración de 70  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpos para Hib. La cantidad de radioactividad en el precipitado de la mezcla de ensayo de cada uno de los sueros, se extrapola contra la radioactividad que se obtiene para la curva patrón y los resultados se expresan en  $\mu\text{g/mL}$  (Robbins y col., 1973; Kuo y col., 1981). Es un método muy reproducible pero con algunas limitaciones en la interpretación, pues emplea un suero estándar hiperinmune con elevada concentración de anticuerpos de alta afinidad. Esto conduce a que sueros con anticuerpos de baja afinidad requieran para precipitar igual concentración de antígeno, que sueros con alta concentración. Esto es lo que explica las diferencias observadas en los resultados obtenidos por este método para un mismo suero,

diluido y sin diluir, y cuando un suero es procesado en diferentes laboratorios (Steward y Lew, 1985; Anderson y col., 1987; Edwards y col., 1987; Ward y col., 1988b).

### 2.5.2. Ensayos inmunoenzimáticos

Las investigaciones para el desarrollo de vacunas contra Hib hicieron evidente la necesidad de métodos más sencillos para la estimación de la concentración de anticuerpos. Los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), también en este caso resultaron útiles y diversas modificaciones se han utilizado para la determinación y cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib. El ELISA permite la determinación de anticuerpos de diferentes clases e isotipos, generando una curva estándar a partir de un suero de referencia, contra la cual se extrapolan los valores de absorbancia obtenidos para cada suero problema. Las concentraciones de anticuerpos se expresan en  $\mu\text{g/mL}$  (Leinonen y Frasch, 1982; Sepala y col., 1984; Sutton y col., 1985; Schreiber y col., 1986; Kayhty y col., 1988; Phipps y col., 1990).

### 2.5.3. Determinación de la actividad funcional de los anticuerpos

La afinidad de los anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib es decisiva en su función. Para su medición se emplean métodos que tienen como base el RI y el ELISA, pero que son engorrosos y difícilmente aplicables en grandes ensayos clínicos (Hetherington, 1988; Griswold y col., 1989; Amir y col., 1990; Hetherington y Rutkowski, 1990). Los métodos dirigidos a la determinación de la actividad bactericida de los anticuerpos anti-Hib reflejan mucho mejor que el RI la funcionalidad de estos, pero tampoco revelan completamente su modo de acción *in vivo*. La observación de que alteraciones en los componentes de la cascada del complemento, necesarios para la expresión de la actividad bactericida de los anticuerpos, no incrementan el riesgo de infección invasiva por Hib, sugieren que otros mecanismos, como el de la opsonofagocitosis, resultan más importantes en la protección (Weiler y col., 1976; Deveikis y col., 1988; Amir y col., 1990). Por otra parte, son difíciles de estandarizar, influyendo significativamente en esto la fuente de complemento, quien constituye el elemento que

condiciona las diferencias entre los resultados obtenidos para un mismo suero en diferentes laboratorios, y por un mismo laboratorio en el tiempo (Makela y col., 1992).

La funcionalidad de los anticuerpos anti-Hib se puede estudiar además en modelos animales, ensayos que consumen muchos más tiempo pero que resultan útiles para la demostración de los principios básicos de protección *in vivo*. La infección puede ser reproducida en ratas a través de la inoculación intraperitoneal o intranasal de la bacteria. A través de este modelo animal se pudo demostrar que una concentración de 0.05 µg/mL de anticuerpos humanos protegen de una meningitis y/o bacteremia a las ratas, así como que una concentración mayor de 7 µg/mL parece ser necesaria para prevenir la colonización nasofaríngea (Moxon y col., 1974; Ambrosino y col., 1983; Kauppi y col., 1993).

### **2.5.4. Concentración de anticuerpos anti-Hib protectores**

La enfermedad invasiva por Hib es sumamente rara en adultos lo que sugiere que la concentración de anticuerpos presentes en el suero de estos resulta protectora. El rango de 0.04-0.1 µg/mL se consideró como protector en un estudio realizado por Robbins y colaboradores en 1973, en el que el 95% de los individuos tenían niveles de anticuerpos mayores a 0.04 µg/mL. En 1977, Makela y colaboradores, en otra serie de individuos adultos, encontraron que la concentración de anticuerpos excedía los 0.15 µg/mL en todos los sueros y adoptaron esta cifra como valor conservador relacionado con la protección.

El análisis de la relación entre concentración de anticuerpos anti-Hib y la susceptibilidad a la infección por Hib en lactantes, necesita otro enfoque. Los niveles de anticuerpos transferidos de la madre declinan con el tiempo, de modo que la concentración que se observa cuando comienza a presentarse la enfermedad invasiva por Hib (edad del lactante), podría indicar el nivel de anticuerpos necesarios para conferir protección (Murphy, 2001; CDC, 2003).

En Finlandia, antes del impacto de la vacunación, ese momento se identificó entre los 4 y 6 meses de edad, cuando la concentración media inicial de anticuerpos anti-Hib en los recién

## *II. Revisión Bibliográfica*

---

nacidos (0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) declinó a 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En ese momento el 10% de los lactantes tenían niveles de 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en un 20% se demostró una concentración de 0.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Kayhty y col., 1991 y 1992). En cambio, en un estudio en Alaska, se demostró que los casos de infección invasiva por Hib comenzaban a presentarse a los 2 meses de edad, cuando aún la concentración media de anticuerpos en los recién nacidos era de 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Este hallazgo hizo pensar que una mayor concentración parecía ser necesaria para prevenir la enfermedad invasiva en Alaska, pero el hecho de que las determinaciones no fueran realizadas en el mismo laboratorio reduce el valor de esta hipótesis (Ward y col., 1981).

Otros trabajos, dirigidos por Anderson en 1984 y Kaythy y Makela en ese mismo año, para determinar la protección conferida por la vacunación contra Hib en lactantes y niños mayores, indicaron que: una concentración de anticuerpos  $\geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$  predice protección para la enfermedad durante uno o dos años después de la vacunación, y que como la concentración de anticuerpos inducidos por la vacunación disminuye rápidamente, los valores de esta hacia el final del primer año suelen oscilar alrededor de 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El estimado más directo de la eficacia de los anticuerpos anti-Hib procede de un estudio llevado a cabo en una reserva de indios apaches, en los que se evaluó la inmunoprofilaxis con un preparado de inmunoglobulinas rico en anticuerpos para el polisacárido de Hib. A los 2 meses de edad los lactantes recibieron 0.5 mL del preparado o de solución salina, según correspondiera al grupo de estudio al que habían sido asignados. Pasados tres meses se observó un incremento de la protección frente a la enfermedad invasiva, pero tanto en el grupo placebo como en el favorecido con el preparado de inmunoglobulinas, se registraron más tarde igual número de episodios infecciosos por Hib. Tomando en cuenta la vida media calculada para las inmunoglobulinas en este preparado (31 días) y su concentración en el suero de los lactantes incluidos en el estudio, el nivel de anticuerpos protectores se estimó entre 0.05-0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Ambrosino y col., 1986; Santosham y col., 1987).

Todo lo discutido en este acápite parte de la base de que la protección para la enfermedad invasiva por Hib es sólo mediada por anticuerpos y que el papel que juega la inmunidad celular es insignificante, teniendo como fundamento para esta consideración que el

antígeno capsular de Hib es un Ag IT. Sin embargo, el acercamiento a este tema es diferente cuando el carácter del antígeno es alterado por su conjugación a una proteína y este adquiere la capacidad de estimular a las células T.

### 2.6. Vacunas polisacarídicas contra Hib

Durante la década de 1970 el conocimiento de la repercusión de la enfermedad invasiva por *H. influenzae*, del predominio del serotipo b como agente etiológico y de la ausencia de anticuerpos anti-Hib en las edades más susceptibles a la infección, indujeron a investigadores de Finlandia y EUA a comenzar a explorar la posibilidad de desarrollar una vacuna contra Hib basada en su polisacárido capsular (Robbins y col., 1973; Rodrigues, 1971; Anderson y col., 1972 y 1977). Los trabajos iniciales estuvieron inspirados en los exitosos avances alcanzados en el desarrollo de una vacuna antimeningocócica utilizando el mismo principio (Kayhty, 1998) y condujeron a importantes conclusiones, entre las que se destacaban: 1-) la vacuna polisacarídica confería protección; 2-) la respuesta inmune y la eficacia eran dependientes de la edad; 3-) tendría que ser estimada la concentración de anticuerpos anti-Hib capaz de conferir protección; 4-) la aplicación de una dosis de refuerzo, 18 meses después, no produjo el efecto “booster” deseado, lo que sugirió tolerancia inmunológica (Peltola y col., 1977; Kayhty y col., 1984).

Durante la década de 1980 la vacuna polisacarídica se licenció en EUA para niños  $\geq 2$  años, pero se aceptó como la edad límite los 18 meses, atendiendo al alto riesgo de enfermedad invasiva (Cochi y Broome, 1986). La vacuna se utilizó ampliamente para la inmunización de niños atendidos en guarderías y millones de dosis se vendieron en muy pocos años, quedando demostrado que resultaba segura. (Cochi y col., 1986; Milstien y col., 1987; Adams y col., 1993). También la variabilidad en la eficacia se puso de manifiesto, pues en algunas regiones la incidencia de la enfermedad fue significativamente menor entre los niños vacunados, pero en otras, por ejemplo en Minnesota, se presentaron más casos de enfermedad por Hib entre los niños que recibieron la vacuna (Shapiro y col., 1988; Black y col., 1988; Harrison y col., 1988 y 1989). Múltiples factores parecen haber intervenido en la baja eficacia, entre los que se podrían incluir: una baja respuesta de anticuerpos (no

demostrado), baja inmunogenicidad de los lotes de vacuna (no demostrado) y mayor exposición de los niños a la infección (tampoco demostrado, pero muy aplicable a los niños atendidos en guarderías, población a la que fundamentalmente estuvo dirigida esta vacuna en EUA) (Makela y col., 1995).

### 2.6.1. Incremento de la respuesta inmune frente a vacunas polisacáridicas contra Hib

Con el objetivo de incrementar la respuesta inmune generada por las vacunas polisacáridicas contra Hib, los intentos iniciales estuvieron encaminados al uso de adyuvantes. El gel de alúmina fue el primero que se probó, pero con él no se logró incrementar la respuesta de anticuerpos (Robbins y col., 1973). Las investigaciones siguientes estuvieron dirigidas a evaluar el empleo de bacterias enteras, tales como *Bordetella pertussis*, usada en otras vacunas de la infancia como la DPT (difteria, tétanos, tos ferina). Las primeras experiencias consistieron en mezclar las vacunas polisacáridicas de Hib con la DPT en el momento de la inoculación, con lo que se logró una estimulación de la respuesta inmune en ensayos realizados en niños menores de un año (King y col., 1981). Estudios posteriores no condujeron siempre a los mismos resultados, por lo que se concluyó que la estrategia de la inoculación conjunta no resultaba útil para ser aplicada en lactantes (Moxon y col., 1975; Ambrosino y col., 1985; Kayhty y col., 1987).

El siguiente enfoque estuvo dirigido a comprobar el efecto de la adsorción del polisacárido capsular de Hib a proteínas, con la intención de aumentar la capacidad de estimular las células T en el preparado vacunal resultante. Se usó entonces la albúmina de suero bovino (ASB) pero como no se observó un incremento de la respuesta inmune cuando se inoculó el preparado a ratones y conejos, no se investigó el efecto de esta combinación en ensayos clínicos en humanos (Schneerson y col., 1982).

Finalmente se ensayó la variante de acoplar covalentemente el polisacárido capsular de Hib a una proteína “carrier”, estrategia utilizada con éxito durante décadas para hacer más inmunogénicas a pequeñas moléculas (haptenos) (Goebel y Avery, 1929; Svenson y Lindberg, 1978). Esta variante mostró que el conjugado obtenido resultaba inmunogénico y

generaba una respuesta secundaria apropiada en estudios en animales, sin embargo, no se investigó en humanos.

### 2.7. Vacunas conjugadas contra Hib

Los datos proporcionados por los ensayos en los que se acopló el polisacárido capsular de Hib a ASB y a proteínas “carrier” mostraron que la conjugación era técnicamente posible y que transformaba al polisacárido en un antígeno dependiente de células T (Ag DT). Las investigaciones se encaminaron entonces al desarrollo de ensayos clínicos en lactantes cuya aprobación no resultó fácil en un principio pues se trataba de un tipo de vacuna sin antecedentes. Para facilitar su aceptación se consideró emplear como “carrier” a una vacuna bien conocida, de forma que el primer candidato fue el polisacárido capsular de Hib conjugado al toxoide diftérico (Granoff y col., 1984; Lepow y col., 1984; Eskola y col., 1985; Kayhty y col., 1987).

Las vacunas conjugadas que actualmente se comercializan difieren fundamentalmente en el tipo de proteína “carrier” usada por cada fabricante. Además del toxoide diftérico (D), se han empleado: una mutante no tóxica de la toxina diftérica a la que se ha denominado CRM197, la toxina tetánica (T) y proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis* (OMP). Los correspondientes conjugados son conocidos como PRP-D, HbOC, PRP-T y PRP-OMP (Kayhty y col., 1991; Anderson, 1983; Lepow y col., 1984; Carlsson y col., 1994; Claesson y col., 1989; Einhorn y col., 1986). La conjugación introduce una estructura artificial entre el polisacárido y la proteína “carrier” que puede ser corta como en el caso de las vacunas del tipo HbOC, mediana como sucede para las vacunas del tipo PRP-T y PRP-D, o más larga como en el caso de las conjugadas a OMP. La relación proteína/polisacárido es regularmente similar (Dick y Beurret, 1989).

#### 2.7.1. Respuesta inmune para las vacunas conjugadas contra Hib

Los ensayos en adultos y en niños de 2 años de edad con vacunas conjugadas contra Hib, demostraron que eran seguras e inmunogénicas, pero que la respuesta de anticuerpos

## *II. Revisión Bibliográfica*

---

obtenida no era sustancialmente superior (Pincus y col. 1982; Granoff y col., 1984; Lepow y col., 1984; Schneerson y col., 1986; Shapiro y col., 1989; Holmes y col., 1991; Rothstein y col. 1991b; Kayhty y col., 1991). La concentración de IgG lograda no fue mayor a la observada con vacunas polisacáridicas y la interpretación de estos datos se tornaba complicada dada la presencia previa de anticuerpos contra Hib en el suero de los vacunados (Makela y col., 1987; Kayhty y col., 1988; Holmes y col., 1991).

Los estudios en lactantes se materializaron hacia 1985-1986 y con ellos se observó un significativo incremento de la concentración de anticuerpos un mes después de la tercera dosis y luego de una dosis de refuerzo (un año después). Se demostró que las vacunas contra Hib se comportaban entonces como Ag DT y más importante aún: que eran capaces de inducir en lactantes anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib (Anderson y col., 1985a; Eskola y col., 1985 y 1990; Einhorn y col., 1986; Insel y Anderson, 1986; Kayhty y col., 1989; Parke y col., 1991; Decker y col., 1993).

La respuesta inmune inducida por las vacunas conjugadas se ha estudiado en detalles y hoy se conoce que se producen fundamentalmente anticuerpos de los isotipos IgG1 e IgG2, que la proporción de IgG1 es mayor a la observada a cuando se inmuniza con vacunas polisacáridicas, e incluso superior para vacunas del tipo HbOC que para vacunas PRP-D (Makela y col., 1987; Kayhty y col., 1988; Holmes y col., 1991; Turner y col., 1991; Jelonek y col., 1993).

A las vacunas conjugadas se les atribuye una respuesta de anticuerpos de mayor avidez, pero el grado de esta varía. A las del tipo PRP-OMP se les relaciona con una menor avidez, lo que se asocia a la capacidad de estas para inducir respuesta de anticuerpos desde la primera dosis, fenómeno que sugiere una estimulación directa de las células B y por consiguiente una dependencia inferior de las células T (Schlesinger y col., 1992; Donnelly y col., 1990; Granoff y col., 1993a y b).

Son diversos también los estudios llevados a cabo con el objetivo de estimar la inmunogenicidad de las vacunas conjugadas en circunstancias especiales, con los que ha

sido posible demostrar que resultan útiles para la inmunización de lactantes de diferentes grupos étnicos (Ward y col., 1988a; Campbell y col., 1990; Santosham y col., 1991; Ferreccio y col., 1991; Reid y col., 1993; Bulkow y col., 1993), así como para la inmunización de niños con leucemia e infecciones recurrentes (Claesson y col., 1984; Barra y col., 1992; Schneider y col., 1990). En uno de estos estudios se hizo evidente que lactantes prematuros con enfermedad crónica pulmonar respondían mejor a la vacunación con PRP-OMP (Washburn y col., 1993). Otro ejemplo, lo constituye el estudio en individuos adultos infectados con el VIH, en el que se demostró una respuesta positiva frente a la vacunación con HbOC (Steinhoff y col., 1991).

### **2.7.2. Protección conferida por las vacunas conjugadas contra Hib**

Los niveles de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib alcanzados durante los primeros ensayos clínicos con vacunas conjugadas, no fueron muy altos. El 70% de los lactantes de 7 meses de edad incluidos en estudios realizados en Finlandia tenían una concentración  $\geq 0.15 \mu\text{g/mL}$  y sólo en el 40% de ellos se observaron valores superiores a  $1 \mu\text{g/mL}$ , luego de tres dosis de una vacuna del tipo PRP-D. Considerando  $1 \mu\text{g/mL}$ , como la concentración de anticuerpos mínima para conferir protección frente a la enfermedad invasiva por Hib a largo plazo, se pronosticaba entonces que la vacuna sólo protegería al 40% de los lactantes vacunados, pero se esperaba que tuviera lugar en los niños inmunizados una rápida y fuerte respuesta de memoria cuando se produjera el enfrentamiento natural a la bacteria durante la etapa de colonización. Finalmente, un ensayo clínico de eficacia demostró que el 90% de los niños vacunados resultaban protegidos y que la protección se extendía al 100% luego de la dosis de refuerzo, entre los 14 y 18 meses de edad (Eskola y col., 1985 y 1990).

En cambio, en un estudio similar desarrollado en Alaska con el mismo tipo de vacuna conjugada (PRP-D), se estimó una eficacia de sólo el 35%. Se descartaron diferencias en la composición de los lotes de vacuna utilizados en los dos estudios (Ward y col., 1990) y una posible explicación a tan bajo nivel de protección se encontró en el hecho de que la cohorte de lactantes se vacunó a una menor edad (6 semanas). Se conoce que altas concentraciones

## *II. Revisión Bibliográfica*

---

de anticuerpos obtenidos de forma pasiva interfieren con la respuesta en lactantes luego de la vacunación. La influencia de tal interferencia puede haberse intensificado dada la alta prevalencia de anticuerpos reportada para las mujeres en esta región (Ward y col., 1981; Sarvas y col., 1992; Barington y col., 1994). No obstante, la causa más importante es quizás la alta incidencia de la infección invasiva por Hib en las etapas más temprana de la vida, lo que hace suponer la necesidad de una mayor concentración de anticuerpos en el suero de los lactantes para prevenir la enfermedad. De acuerdo con esto, la vacuna PRP-D resultó eficaz en las circunstancias de baja incidencia de la enfermedad descritas para Finlandia, pero no para la protección de una población sujeta a un mayor riesgo. Otras vacunas conjugadas inducen mejor respuesta en poblaciones con una incidencia mayor (Anderson y col., 1985a y b; Kayhty y col., 1989 y 1991; Parke y col., 1991).

Estudios comparativos entre lactantes caucásicos en EUA y Finlandia muestran por ejemplo, que una serie primaria de inmunización con HbOC o PRP-T conduce a concentraciones de anticuerpos anti-capsulares mayores que los alcanzados con PRP-OMP, muy superiores a los generados por la inmunización con PRP-D (Kayhty y col., 1991; Turner y col., 1991; Granoff y col., 1992; Decker y col. 1992; Jelonek y col., 1993). Los resultados de estos estudios han sido ampliamente corroborados, aunque no todas las comparaciones han sido realizadas, pues por razones éticas, no se admite la inclusión de grupos placebos (Booy y col., 1992a y b; Vadheim y col., 1993; Eskola y col., 1992; Peltola y col., 1994).

Otros ensayos clínicos, llevados a cabo en California entre indios navajos, demostraron para las vacunas conjugadas del tipo HbOC y PRP-OMP un 100% y un 95% de eficacia, respectivamente (Santosham y col., 1991; Black y col., 1991a). Para la vacuna PRP-OMP estos estudios fueron importantes en dos direcciones: mostraron su capacidad para conferir protección desde la primera dosis y que la respuesta se obtuvo en una población en un riesgo a la infección comparable al descrito para Alaska. Esto la señaló como altamente inmunogénica y a ser tomada en consideración para administrarla a poblaciones con una alta incidencia (Eskola y col., 1992; Booy y col., 1992a y b; Vadheim y col., 1993).

## **2.8. Las vacunas conjugadas contra Hib en el Programa de Vacunación Infantil**

Las vacunas conjugadas contra Hib fueron rápidamente aceptadas e introducidas en los programas nacionales de inmunización. En EUA la primera acción al respecto consistió en sustituir la vacuna polisacáridica que había sido recomendada para todos los niños en edad preescolar. El primer conjugado disponible fue la vacuna tipo PRP-D y la experiencia ganada con su empleo proporcionó elementos para su licenciamiento en 1987. Un año después fue también aprobada la vacuna HbOC y en 1989 fue licenciada la PRP-OMP. Las vacunas PRP-D y HbOC fueron recomendadas para la vacunación de todos los niños a partir de los 18 meses de edad, y la PRP-OMP para niños mayores de 15 meses (Pickering, 1988; American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases, 1989).

Entre 1988 y 1990 cerca de 10 millones de dosis de vacuna conjugada contra Hib fueron distribuidas en EUA y la eficacia para estas se estimó alrededor del 80% (Wegner y col., 1991; Greenberg y col., 1991; Loughlin y col., 1992). En los tres años siguientes se observó disminución de la incidencia de las meningitis por Hib y un hallazgo sorprendente lo constituyó el hecho de que esto no se restringía a los niños del grupo de edad favorecido por la vacunación, lo que sugirió la posibilidad del desarrollo de protección colectiva (Adams y col., 1993; Murphy y col., 1993a y b; Frasci y col., 1991). Las evidencias presentadas por Takala y colaboradores en 1991, sobre la reducción del estado de portador nasofaríngeo de Hib en los niños vacunados, también apoyan esta hipótesis.

En 1988-1989, en Finlandia, se ejecutaron los primeros ensayos clínicos para comparar la eficacia en lactantes de las vacunas conjugadas contra Hib del tipo PRP-D, HbOC y PRP-T. Durante estos se observaron pocos fallos vacunales luego de la serie primaria de inmunizaciones y no se reportó ninguno después de la dosis de refuerzo (Eskola y col., 1992; Peltola y col., 1994). La eficacia de estas vacunas se consideró alta, lo que se reafirmó con la rápida disminución en la incidencia de la enfermedad: sólo 2 casos de infección invasiva en menores de 4 años de edad en 1991, contra 120-180 casos registrados en los años previos a la vacunación (Eskola y col., 1992). Estos estudios indicaron también que otras formas de la enfermedad invasiva por Hib podían ser prevenidos con la

vacunación, como es el caso de la epiglotitis (Takala y col., 1994a).

### **2.8.1. Empleo de las vacunas conjugadas contra Hib junto a otras vacunas**

Se describe un corto período de riesgo (pocos días) luego de la administración de las vacunas conjugadas contra Hib, en los que se incrementa la susceptibilidad a la bacteria (Daum y col., 1989 y 1991; Ruben y Condon, 1993) y durante los que se puede encontrar antígeno en la orina de los vacunados (Rothstein y col., 1991a; Goepp y col., 1992). Sin embargo, millones de lactantes han sido beneficiados con ellas hasta la fecha y las reacciones adversas observadas son pocas (Eskola y col., 1990; Vadheim y col., 1990; Madore y col., 1990a y b; Yogev y col., 1990; Black y col., 1991a,b y 1993; Kovel y col., 1992).

Las vacunas conjugadas contra Hib pueden ser administradas junto a la DPT sin afectar la respuesta inmune (Claesson y col., 1989; Ferreccio y col., 1991; Watemberg y col., 1991; Clemens, 1992; Fritzell y Blotkin, 1992; Black y col., 1993; Avendano y col., 1993; Carlsson y col., 1994). El toxoide tetánico o el toxoide diftérico, componentes de la DPT, actúan como proteínas “carriers” que contribuyen a aumentar el carácter de Ag DT de las vacunas PRP-T, PRP-D y HbOC (Schneerson y col., 1984; Kayhty y col., 1991; Granoff y col., 1993a; Carlsson y col., 1994). La inmunización contra Hib puede hacerse coincidir también con otras vacunas, como por ejemplo la triple viral contra rubéola, sarampión y parotiditis (Dashefsky B y col., 1990; CDC, 2008a; Rizzo, 2008).

### **2.9. Costo y beneficios de la vacunación contra Hib**

Luego de que las autoridades médicas recomendaran el empleo de las vacunas conjugadas contra Hib en los lactantes, cobró importancia el análisis de la relación costo-beneficios. En un informe publicado por Clements y colaboradores en 1993, basado en datos provenientes de cinco países industrializados, incluyendo a EUA, se hace una reflexión sobre cómo se esperaba que influyera la vacunación en el número de vidas salvadas, secuelas prevenidas y en la disminución de los costos por atención médica. En este informe se estimaba que por

## *II. Revisión Bibliográfica*

---

cada 10 000 lactantes, se evitarían anualmente 0.65 muertes y 2.9 casos de secuelas leves o moderadas, además de evitar el gasto de 0.2-0.8 millones de dólares por año, por concepto de tratamiento y atención de casos graves. Para arribar a tales estimados se partía del supuesto de que se lograra una cobertura de vacunación del 95% de los lactantes y de que una dosis de refuerzo fuera administrada en el segundo año de vida.

Actualmente se estima que para la compra de las tres dosis necesarias para vacunar 100 000 lactantes se necesitan cada año 0.4 millones de dólares. Aunque el monto puede ser menor si se compran un gran número de dosis, el precio de una sola dosis constituye aun un verdadero obstáculo para la inclusión de la vacunación contra Hib en el programa de inmunización de los países en desarrollo (CDC, 1999). El costo actual de una vacuna combinada, que incluya la de Hib entre otras, se ha elevado a 3.60 \$US por dosis, incluso para los países con derecho a financiamiento de la GAVI (Bennett, 2006). A los precios actuales en los países industrializados, tres dosis de vacuna conjugada anti-Hib cuestan 15 veces más que el conjunto de las seis vacunas básicas del programa de vacunación infantil (a los precios descontados ofrecidos por la UNICEF) (García y col., 2002).

Un estudio realizado en Chile concluyó, que la balanza costo-beneficios se inclinaba hacia estos últimos si se lograba reducir el costo de las tres dosis necesarias, hasta un precio entre 1 y 3 dólares (Levine y col., 1993). Una solución para lograr esto, apunta al desarrollo de nuevas vacunas conjugadas o hacia la producción local en los propios países en desarrollo, pero ambas alternativas se dificultan como consecuencia de la alta tecnología involucrada en la producción (Clemens y col., 2003).

Otra vía consiste en la reducción del volumen al aplicar una dosis de vacuna. En este sentido se destacan los trabajos dirigidos a demostrar que una dosis diluida 10 veces en la vacuna DPT, es igualmente inmunogénica y segura (Mark y col., 2002). Con este mismo enfoque, otros estudios demostraron que la administración de la mitad o la tercera parte de una dosis, constituye un régimen de vacunación mucho más económico, que confiere niveles adecuados de anticuerpos protectores (Lagos y col., 1998; Fernández y col., 2000).

### **2.10. Reducción del estado de portador nasofaríngeo de Hib**

La reducción del estado de portador nasofaríngeo fue un sorprendente e importante hallazgo asociado al uso de las vacunas conjugadas contra Hib, porque se había estudiado este aspecto al emplear las vacunas polisacáridicas contra neumococo y meningococo y no se había demostrado que tuvieran potencial para ello. La cápsula no se reconocía como una estructura que mediara en la unión de la bacteria a las células de las mucosas. Para el caso de Hib se habían descrito las fimbrias como los organelos involucrados en esta unión (Peltola y col., 1977; Greenwood y col., 1978; Herva, 1980, van Alphen y col., 1988, Makela y col., 1992, Murphy y col., 1993a; Mohle-Boetani y col., 1993; Takala y col., 1994b).

Para encontrar explicación a este hallazgo se hicieron experimentos en ratas, en las que se pudo prevenir la colonización por Hib a través de la inoculación previa (intranasal o intraperitoneal) del suero de lactantes inmunizados y anticuerpos monoclonales contra el polisacárido capsular de Hib del tipo IgA e IgG (Kauppi M y col., 1993). De acuerdo con lo concluido por Challacombe y colaboradores (1978) en un estudio anterior, una fracción de la IgG presente en el suero trasciende hacia la superficie de las mucosas del tracto respiratorio, donde impide entonces la colonización. La forma en que esto ocurre no es completamente conocida, aunque se propone que pueda tener lugar una unión en la que intervienen mecanismos bactericidas y de opsonofagocitosis.

La disminución del estado de portador es una consecuencia que se manifiesta luego de la aplicación de la dosis de refuerzo pues una alta concentración de anticuerpos parece ser necesaria para prevenir la colonización, mayor que la concentración que se requiere para prevenir la infección invasiva (Takala y col., 1991). No está dilucidado el papel potencial de la producción de anticuerpos anti-Hib a nivel de las mucosas como respuesta a la vacunación, pero se piensa que esta pueda ser de corta duración (Gilsdorf y McDonnell, 1991). No obstante, está claro que el efecto de las vacunas conjugadas en la erradicación del estado de portador tiene importantes implicaciones en la transmisión de la bacteria, que conllevan a un estado de protección colectiva con el que resultan beneficiados también los

individuos no vacunados (Anderson y May, 1985; Anderson, 1992; Makela y col., 1995; Yash, 2004).

### **2.11. Impacto de la vacunación en la epidemiología de Hib**

El efecto primario de las vacunas conjugadas contra Hib es la prevención de la enfermedad invasiva, lo cual se alcanza a través de la inducción de niveles moderados de anticuerpos anti-Hib. Para asegurar una adecuada concentración de estos por un largo período, tomando en consideración las diferencias individuales para responder ante la inmunización, las vacunas deben ser capaces de generar MGC de anticuerpos muy superiores a los niveles mínimos requeridos para conferir protección. A esto contribuye notablemente la respuesta de memoria generada por este tipo de vacunas (Peltola 2000). El hecho de que las vacunas conjugadas contra Hib sean además capaces de prevenir la colonización y por consiguiente de reducir el estado de portador nasofaríngeo, obviamente proporciona un beneficio adicional reconocido como protección colectiva (Yash, 2004). Esta juega un papel significativo en la prevención de infecciones que se transmiten de persona a persona, como en este caso (Anderson y May, 1985; Anderson, 1992; Garpenholt y col, 2000).

Otra posible consecuencia, podría ser la ocurrencia de cambios en las propiedades antigénicas de la cápsula. Sin embargo, como la información genética que determina la estructura polisacáridica excluye la posibilidad de cambios en esta, se piensa que lo que podría esperarse es un reemplazamiento del tipo capsular b por otros, como por ejemplo, el tipo a, y se sugiere que esto podría suceder por intercambio genético entre cepas (Kroll y col., 1991; Millar y col., 2005; Gabastou y col. 2008).

El uso extendido de las vacunas conjugadas contra Hib hace prever la posibilidad de la erradicación de la enfermedad invasiva por este agente pues no existe otro reservorio natural. Para deducir el efecto en este sentido, se han desarrollado modelos matemáticos para cuya aplicación deben tomarse en consideración los distintos modos e intensidad de transmisión de la bacteria en diferentes circunstancias socioeconómicas. Un estudio de este tipo concluyó, que en ausencia de nuevos casos de infección o de portadores nasofaríngeos,

en 10 años, el 57 % de la población no vacunada podría tornarse susceptible a la infección invasiva. Tal suposición parte de una aproximación teórica para la cual aún no se ha descrito un escenario real (Leino y col., 2000). Las interrogantes claves serían: ¿La exposición natural a otras bacterias con estructura antigénica similar a Hib podría inducir anticuerpos capaces de conferir protección? ¿Por cuánto tiempo persistiría esta?

### **2.11.1. Fallos vacunales**

Aunque la enfermedad por Hib se produce en niños demasiado pequeños para que hayan recibido las dosis completas de vacunación, ocurren casos de verdaderos fallos vacunales que pueden estar relacionados con aspectos inherentes a la vacuna o del huésped. En este último caso se reconocen algunos factores predisponentes como son la prematuridad y la inmunodeficiencia, entre otros (Peltola 2000).

A pesar de que las vacunas conjugadas contra Hib son altamente efectivas en la protección, el incrementado de los reportes de casos de enfermedad invasiva en niños vacunados (Pushparajah y col., 2003; Garner y Weston, 2003; Cruces y col., 2006), atribuibles a factores inherentes a estas pudieran responder a: el descenso de las tasas de cobertura vacunal y por tanto, de la protección colectiva, junto al aumento de la circulación de cepas de Hib en portadores y la reintroducción de cepas procedentes de adultos o niños no vacunados (Pushparajah y col., 2003; Steinhoff y Goldblatt, 2003). En cambio, los fallos vacunales no parecen asociarse a ninguna marca o lote específico de vacuna (Mc Vermont y col., 2003).

En el Reino Unido, por ejemplo, se investigó la posibilidad de que estos pudieran estar relacionados con el hecho de que sólo se administraban dosis de la vacuna contra Hib a los 2, 4 y 6 meses de vida, pues no parecía necesario una dosis de refuerzo, considerando el excelente sistema de vigilancia epidemiológica del país (McVernont y Heath, 2003). Esta decisión se revocó recientemente y se adoptó la estrategia de aplicar una dosis a todos los niños entre 6 meses y 4 años de edad (Trotter y col., 2003; Heath, 2003).

Por otra parte, en los últimos años se ha administrado masivamente la vacuna contra Hib combinada con difteria, tétanos y *B. pertussis* acelular, que produce niveles de anticuerpos menores que con otras combinaciones, por lo que es lógico suponer que la eficacia vacunal sea menor y la protección menos duradera. Esto, unido a la no administración de la dosis de refuerzo, podría explicar el aumento de los fallos vacunales. Sin embargo, en Holanda, donde se ha seguido utilizando la vacuna combinada con *B. pertussis* celular completa, con dosis de refuerzo incluida, también se informa un aumento de estos casos por razones hasta ahora no esclarecidas. Se especula que pudieran estar relacionados con la disminución en la avidéz de los anticuerpos y de la concentración de IgG2 en el suero de los individuos en los que se han presentado los fallos, sugiriendo que la vacunación no indujo una adecuada respuesta inmune (Breukels y col., 2002; Aracil y Campos, 2003).

Ante el incremento de los fallos vacunales, las autoridades sanitarias de algunos países se cuestionan también, si la aplicación de la vacuna pentavalente (que protege contra la hepatitis B, Hib, difteria, el tétano y la tos ferina), es realmente una mejor opción para la protección (Espinosa, 2001).

Aunque no existen evidencias de que esta situación se generalice, la situación clínica y epidemiológica alerta a microbiólogos y pediatras y aconseja un estudio completo de las cepas de Hib aisladas de LCR y sangre (Meissner y col., 2002; Aracil y Campos, 2003; CDC, 2008b).

### **2.12. Recomendaciones de la OMS para la vacunación contra Hib**

Desde 1998 la OMS recomienda la inclusión de una vacuna conjugada contra Hib en los programas de inmunización de lactantes, en todos los países en los que los recursos permitan su uso y la carga de morbilidad haya sido establecida. Se proponen dos estrategias: la inmunización de todos los lactantes y la vacunación de actualización en niños mayores (WHO, 1998).

La protección de los lactantes constituye la prioridad fundamental y es una estrategia

efectiva independientemente del área geográfica. Los niños mayores de 12 meses pueden también quedar protegidos con una dosis de vacuna conjugada, pero el Fondo Mundial para Vacunas no ofrece financiamiento para la compra de vacunas dirigidas a la actualización inmunitaria. No obstante, algunos países deciden llevar a cabo campañas únicas de vacunación de todos los niños entre 1 y 5 años con una sola dosis, estrategia que puede ofrecer cierta protección pero que sólo se puede acometer si no afecta los recursos destinados a la inmunización de lactantes. La actualización inmunitaria es una opción que permite conseguir una reducción más inmediata del número de casos de enfermedad invasiva por Hib, pero es costosa y más difícilmente viable (WHO, 1998).

### **2.13. Incidencia de la enfermedad invasiva por Hib en Cuba e introducción de la vacunación**

En Cuba, las meningitis bacterianas se han considerado enfermedades de declaración obligatoria desde 1961 y en los informes estadísticos se consigna el agente causante cuando se identifica; en caso contrario, se notifica como una meningitis bacteriana sin aislamiento. Este sistema de vigilancia reportó, entre 1994 y 1998, un promedio anual de 59 casos de enfermedad invasiva por Hib en menores de un año y 64 casos en niños entre 1 y 4 años de edad, con tasas de incidencia entre 32.2 y 44/100 000 habitantes y 7.2 y 12.9/100 000 habitantes, respectivamente (Ministerio de Salud Pública de Cuba, 1998).

Como Hib se erigió el principal patógeno causante de meningoencefalitis bacteriana en niños menores de 5 años de edad, la vacunación se introdujo en el Programa Nacional de Inmunización (PNI) en 1999 (Llanes y col., 1997; Tamargo y col., 1999 y 2003). La estrategia seguida consistió en vacunar durante ese año a todos los nacidos entre enero de 1998 y octubre de 1999 (306 098 niños), siguiendo de forma simultánea las tácticas de campaña y programa. En la campaña se incluyeron a los nacidos entre enero-octubre de 1998 y en la segunda estrategia, a todos los nacidos a partir de noviembre de 1998 y hasta octubre de 1999. La vacuna administrada fue VaxemHib, comercializada por la Chiron, Italia (Dickinson y col., 2001; Dickinson y Pérez, 2002).

Luego de la introducción de la vacunación se observó una disminución importante del número de casos de infección invasiva por Hib, la mayor reducción se observó en los niños menores de un año (70.5%). Hacia finales del 2001 la incidencia disminuyó a 10 casos (0.1/100 habitantes) y se estimó un 99% de efectividad de la vacunación. Para alcanzar estos indicadores el estado cubano invirtió más de 2.4 millones de dólares cada año en la compra de las dosis necesarias de la vacuna (Dickinson y col., 2001; Dickinson y Pérez, 2002).

Un estudio llevado a cabo con el objetivo de estimar en Cuba la relación costo-efectividad del tratamiento terapéutico y profiláctico de las meningitis causadas por Hib, en menores de un año, demostró que la vacunación resultaba una alternativa costo-efectiva. Para esto el costo no debía exceder los 2.50 dólares y debían alcanzarse valores de eficacia entre 90 y 100%. Sin embargo, considerando los altos precios de las vacunas conjugadas contra Hib, esta resultaba una alternativa efectiva, pero al mismo tiempo una carga para el estado cubano (García y col., 2002).

### **2.14. Vacunas sintéticas**

La historia de las investigaciones inmunológicas sobre los antígenos sintéticos es relativamente joven, comenzó como algo un poco esotérico pero se ha desarrollado como una herramienta de múltiples utilidades en la investigación, de las cuales la más importante es el progreso en la obtención de vacunas sintéticas. Si esta aproximación es coronada por el éxito, serviría de base para dar el paso adelante en el desarrollo de vacunas eficaces contra muchas enfermedades que azotan a la humanidad.

Sobresale en este sentido, el trabajo realizado por más de tres decenios por el científico colombiano Patarroyo Murillo para la obtención de la primera vacuna contra la malaria, basada en un péptido sintético (SPf66). Para esta se demostró protección limitada en los primeros ensayos clínicos en humanos: 38.8% en la población negra en Colombia; 55% en Venezuela, en población caucásica; 66% entre indígenas de Ecuador y sólo 29% en la población mestiza de Brasil. No obstante, representó el primer acercamiento al desarrollo

## II. Revisión Bibliográfica

---

de una vacuna compuesta de subunidades de diferentes proteínas de *Plasmodium falciparum*, obtenida por síntesis química (Lozano y Patarroyo, 2007; Bermúdez y col. 2007).

La continuación de estos estudios permitió proponer una metodología química para lograr una nueva vacuna denominada Colfavac (*Colombian Falciparum Vaccine*), para la cual está aún por probar la efectividad; aunque atendiendo a los resultados experimentales se prevé sea superior al 95% (Lozano y Patarroyo, 2007; Patarroyo 2006).

Esta estrategia novedosa sentó las bases para investigaciones encaminadas a la obtención de otros preparados vacunales. En este terreno se destacan los estudios llevados a cabo por el laboratorio de Antígenos Sintéticos de la UH para el desarrollo de una vacuna conjugada contra Hib, que tiene como principio antigénico el polisacárido de la bacteria obtenido por síntesis química (Verez-Bencomo y Roy, 1999; Fernández-Santana y col., 2004).

Existen reportes de investigaciones previas, también encaminadas a la obtención por síntesis química de fragmentos del polisacárido capsular de Hib, y de los resultados de la inmunogenicidad de estos en animales de experimentación. Sin embargo, no hay precedentes de ensayos clínicos en humanos, pues los métodos de síntesis empleados no fueron lo suficientemente competitivos como para permitir la obtención de cantidades suficientes de antígeno (Hoogerhout y col., 1987; Nilsson y col., 1991).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Confirmación del ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib en suero humano**

##### **3.1.1. Descripción del método**

Para la cuantificación de anticuerpos anti-Hib durante los ensayos clínicos para la demostración de la inmunogenicidad de Quimi-Hib, se utilizó el ELISA indirecto descrito por Phipps y colaboradores en 1990, con modificaciones introducidas por otros autores (Madore y Quataert, 1999; Nicol y col., 2002). El protocolo del método se detalla en el Anexo 2. En síntesis: las placas ELISA se recubrieron con una suspensión de antígeno de Hib (1 µg/mL) conjugado a albúmina humana (HbO-HA) en tampón fosfato salina (TFS) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Luego de añadir las diluciones de los sueros a estudiar, los complejos antígeno-anticuerpos formados se hicieron reaccionar con un conjugado anti-IgG humana-peroxidasa. La reacción se reveló empleando o-fenildiamina (OFD) y las lecturas de absorbancia se realizaron a 490 nm. Para el cálculo de las concentraciones se empleó el Programa ELISA para Windows Versión 1 del CDC (Plikaytis y col., 1996).

La curva estándar se preparó a partir del suero humano de referencia internacional As Hib Lote 1983 (FDA, Bethesda, Maryland), para el que se conoce que la concentración de inmunoglobulinas totales anti-Hib es de 70 µg/mL (Kayhty y col., 1987; Phipps y col., 1990; Madore y Quataert, 1999; Nicol y col., 2002). En cada placa ELISA se incluyó además, un suero control positivo, para el cual se determinaron los valores aceptables de concentración de IgG (límite inferior: 47.53 µg/mL y límite superior: 100.72 µg/mL) (Anexo 3).

Para complementar los estudios de confirmación se ensayaron dos protocolos diferentes en el modo de construir la curva de calibración. Esta prueba estuvo motivada por el hecho de que el ELISA sugerido por el Laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus* en el IPK (LNRH-IPK) construye la curva a partir de una menor cantidad de puntos (Anexo 4).

### **3.1.2. Protocolo para la confirmación**

Como el ELISA propuesto constituye un sistema validado a nivel internacional para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib, se diseñó para su validación, un protocolo de confirmación (nivel de validación en la acreditación, aplicable a métodos normalizados) en las condiciones del LNRH-IPK. En el protocolo se dispuso la determinación de la precisión y la veracidad del método (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998; Comité Europeo de Normalización, 2003). Se emplearon sueros de adultos vacunados, que se seleccionaron de entre los obtenidos en un ensayo clínico que se describe más adelante (Acápito 3.2.2).

**3.1.2a. Precisión intraensayo (Repetibilidad):** Se usaron tres sueros de concentración conocida (suero 1, baja; suero 2, media y suero 3, concentración alta), se prepararon cuatro diluciones (1/1 250, 1/6 250, 1/31 250, 1/156 250) en suero fetal bovino (SFB) y de cada una se hicieron 10 réplicas. Se procedió con el ELISA bajo las mismas condiciones de operación y por un mismo analista. Para el procesamiento estadístico se calculó la media de las concentraciones ( $X$ ), la desviación estándar ( $DE$ ) y el coeficiente de variación ( $CV$ ) para cada una de las diluciones. Se adoptó como criterio de aceptación que la precisión intraensayo tuviera un  $CV \leq 10\%$  (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998; Comité Europeo de Normalización, 2003).

**3.1.2b. Precisión interensayo (Precisión intermedia):** Se seleccionaron siete sueros de concentración conocida, cuidando que estuvieran representados sueros de baja, media y alta concentración. Se prepararon cuatro diluciones y 10 réplicas de cada una. Se procedió con el ELISA en días distintos y por dos analistas diferentes (Ensayos 1 y 2). Para el procesamiento estadístico se calculó la  $X$ , la  $DE$  y el  $CV$  de cada muestra por día y el  $CV$  interensayo. Se adoptó como criterio de aceptación que este fuera  $\leq 20\%$  (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998; Comité Europeo de Normalización, 2003).

**3.1.2c. Veracidad:** Se estimó a través de un ensayo de recuperación. Se seleccionó una

muestra libre de anticuerpos (SFB 10%) a la que se añadieron diferentes volúmenes de un suero de concentración conocida (suero de referencia Hib Lote 1983), del cual se prepararon cuatro diluciones y de cada una se trabajaron 7 réplicas. La recuperación se calculó a través de la fórmula que se describe a continuación y como criterio de aceptación se adoptó que esta debía oscilar entre 80-120% (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998; Comité Europeo de Normalización, 2003).

$$\% \text{ de recuperación} = \text{valor obtenido } (\mu\text{g/mL}) / \text{valor teórico } (\mu\text{g/mL}) \times 100$$

Donde: **valor obtenido** = concentración obtenida empleando el ELISA

### 3.2. Estudios clínicos para la demostración de la inmunogenicidad de Quimi-Hib

Cada propuesta de ensayo clínico fue aprobada por las Comisiones de Revisión y Bioética del IPK, el Grupo Nacional de Pediatría, el Grupo de Aseguramiento de la Calidad del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el CECMED. Se siguieron los principios éticos regidos por la declaración de Helsinki (Asamblea Médica Internacional, Tokio, 2004).

Todos los sujetos incluidos en los ensayos se beneficiaron con la vacunación y en cada ensayo de fase I, con un examen físico completo. Se obtuvo el consentimiento informado de los voluntarios adultos y de los padres de los lactantes y niños mayores. A estos últimos se les comunicó que podrían retirar a sus hijos de la investigación en el momento que lo desearan y que en ese caso, o si se comprobaba al final del ensayo que los niños que recibieron el candidato vacunal no habían alcanzado concentraciones de anticuerpos protectores, se les administraría la vacuna comercial utilizada en el país (Vaxem-Hib).

Se diseñaron siete ensayos clínicos en diferentes grupos de individuos sanos, que se relacionan a continuación y que se describen más adelante:

- Dos estudios de fase I en voluntarios adultos.
- Un estudio de fase I y otro de fase II en niños entre 4 y 5 años de edad.

- Un estudio de fase I y otro de fase II en lactantes.
- Un estudio “booster”, en el que se evaluó, en un grupo de los lactantes inmunizados durante la Fase I, la prevalencia de los anticuerpos después de 12 meses de la primo-vacunación y el efecto de una dosis de refuerzo.

### **3.2.1. Vacunas y dosis administradas**

Vacuna en estudio: Se evaluó el candidato vacunal Quimi-Hib, preparado por el Laboratorio de Antígenos Sintéticos de la UH y el CIGB. Una dosis (0.5 mL) de este contiene 10 µg del oligosacárido capsular de Hib obtenido por síntesis química, conjugado covalentemente a 20.8-31.25 µg de anatoxina tetánica (Verez-Bencomo y Roy, 1999).

Vacuna control: Se empleó la vacuna Vaxem-Hib comercializada por la Chiron (Italia). Una dosis está constituida por 10 µg de oligosacárido capsular de Hib conjugado a aproximadamente 25 µg de la proteína CRM 197 y adyuvada a fosfato de aluminio (1.36 mg). En los ensayos conducidos en adultos se usó la misma vacuna pero adyuvada a hidróxido de aluminio (1 mg/dosis).

### **3.2.2. Ensayos clínicos en voluntarios adultos**

Se llevaron a cabo dos estudios (Estudios 1 y 2) con diseño experimental de fase I de un ensayo clínico controlado, aleatorizado y a doble ciegas, en voluntarios sanos de 19 a 35 años de edad. Las vacunas se administraron por vía intramuscular y se incluyeron 40 voluntarios en cada uno, para conformar 3 grupos de estudio y uno control (Figura 3.1).

Estudio 1: Se ejecutó entre septiembre y octubre del 2001. Se administró una dosis de tres lotes diferentes de Quimi-Hib a los grupos A, B y D, mientras que el C representó el grupo control, pues los voluntarios incluidos en este recibieron la vacuna Vaxem-Hib.

Estudio 2: Se ejecutó entre marzo y abril del 2002. Los voluntarios del grupo F recibieron una dosis de Quimi-Hib sin adyuvante y los de los grupos G y H, una dosis de dos lotes

diferentes de Quimi-Hib adyuvado a fosfato de aluminio. Al grupo control (grupo E) le correspondió el mismo lote de vacuna Vaxem-Hib utilizado en el Estudio 1.

#### **3.2.4. Ensayos clínicos en niños entre 4 y 5 años de edad**

Se llevaron a cabo dos estudios experimentales aleatorizados y a doble ciegas, correspondientes a las fases I y II de un ensayo clínico, en niños sanos entre 4 y 5 años de edad, pertenecientes a la última cohorte de niños no vacunados contra Hib en Cuba.

Ensayo clínico de fase I: Se desarrolló en los meses de febrero y marzo del 2002. Los niños incluidos se seleccionaron en los círculos infantiles de cinco áreas de salud de la zona urbana del Municipio Camagüey. No se utilizó procesamiento estadístico alguno para determinar el tamaño de la muestra. Se conformaron cuatro grupos de estudio (A, B, C y D) de 30 niños cada uno, para lo cual era necesario reclutar al menos 120 niños, pero para garantizar el tamaño de la muestra, atendiendo a que algunos podían ser excluidos en el momento de la vacunación, se reclutaron 35 niños por grupo. Esto elevó el número en la lista aleatoria hasta 140 niños (Figura 3.2). Se administró por vía intramuscular una dosis del candidato vacunal o de la vacuna control, según correspondiera. Los grupos A, B y C recibieron una dosis de tres lotes diferentes de Quimi-Hib y a los niños agrupados en D (grupo control) se les administró la vacuna Vaxem-Hib.

Ensayo clínico de fase II: se llevó a cabo en 936 niños sanos entre 4 y 5 años de edad, en los meses de julio y agosto del 2002. Estos se seleccionaron dentro de los círculos infantiles y escuelas primarias de las nueve áreas de salud de la zona urbana del municipio de Camagüey. Se empleó también la vía de inoculación intramuscular, al nivel de la inserción del músculo deltoides. Se conformaron tres grupos de estudio (A, B y C) con 312 niños cada uno. A los agrupados en A y B se les administró una dosis de dos lotes diferentes de Quimi-Hib. El C constituyó el grupo control (Figura 3.2).

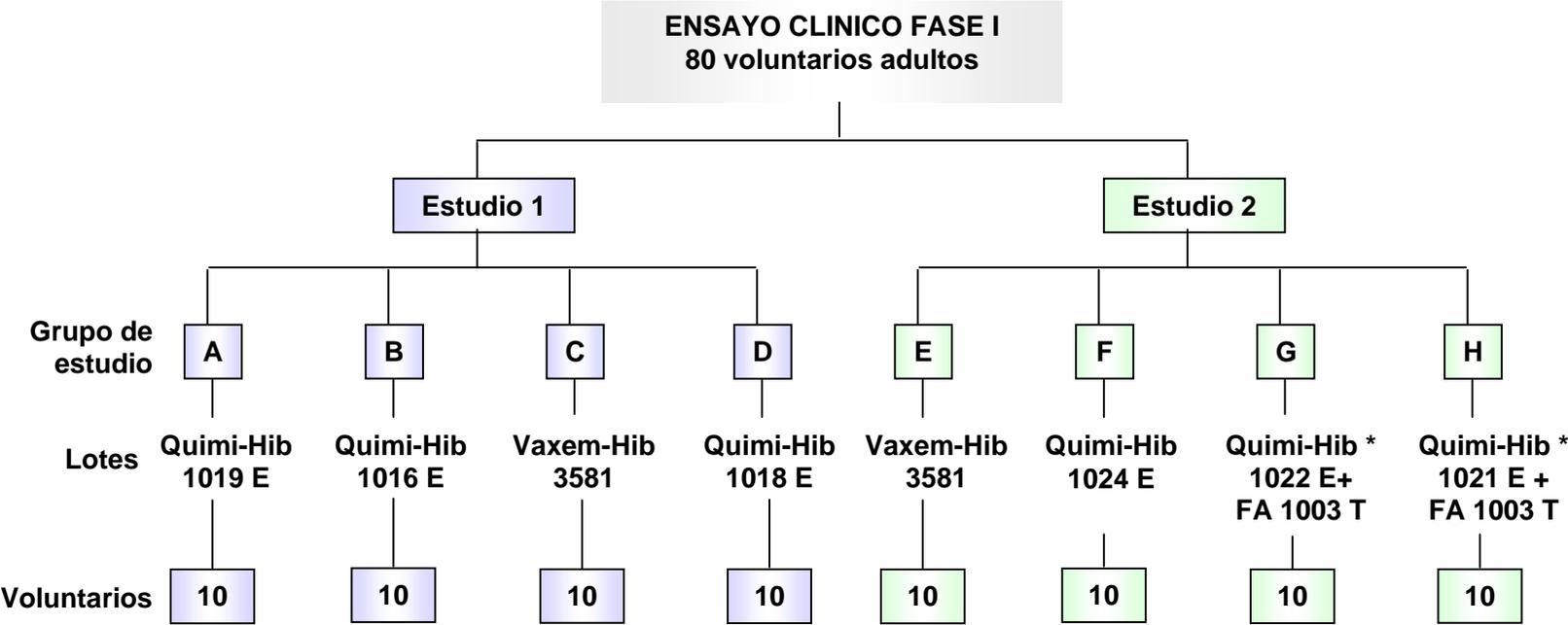


Figura 3.1 Regímenes de vacunas asignados a cada grupo de voluntarios, durante los ensayos clínicos de fase I en adultos.

\* FA: adsorbida a fosfato de aluminio

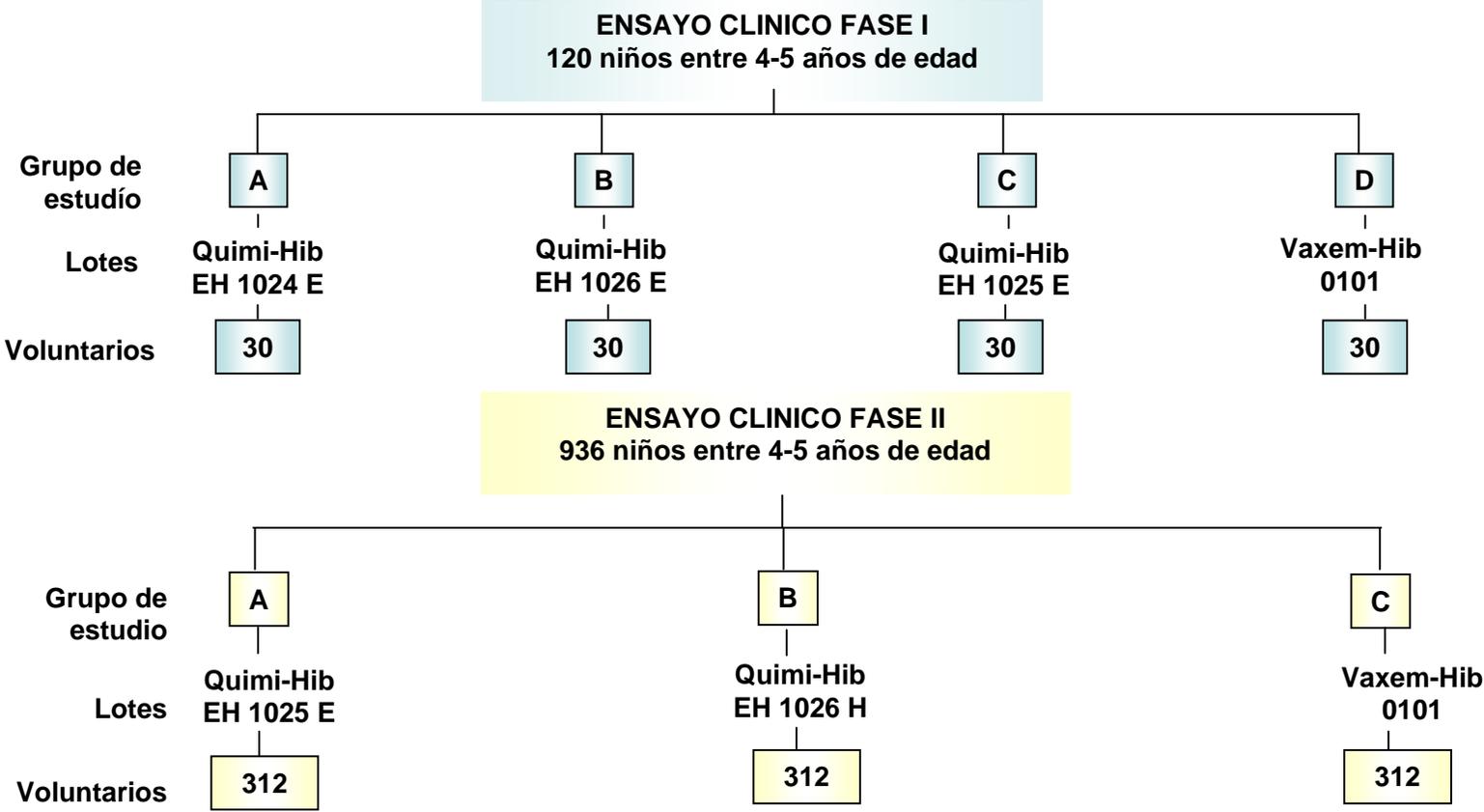


Figura 3.2 Regímenes de vacunas asignadas a cada grupo de estudio, durante los ensayos clínicos de fase I y II en niños entre 4 y 5 años de edad.

### **3.2.4.a. Determinación de la inmunidad naturalmente adquirida y estudio del estado de portador nasal y faríngeo en niños entre 4 y 5 años de edad**

Con el objetivo de conocer los niveles de IgG anti-Hib, adquiridos de manera natural en este grupo de niños, representativo de la última cohorte no vacunada en Cuba, se llevó a cabo un análisis de los niveles de anticuerpos en los sueros extraídos justamente antes de la vacunación, en el estudio de fase II. Se tomaron como valores de referencia las cifras de 0.15, 1 y 5 µg/mL de IgG anti-Hib, concentraciones que correlacionan con protección a corto y largo plazo y con la eliminación del estado de portador nasofaríngeo de Hib, respectivamente (Anderson, 1984; Kaythy y Makela, 1984; Takala y col., 1991).

Para complementar este estudio se colectaron exudados nasales y faríngeos de cada niño, estos se inocularon en placas de agar chocolate suplementado con NAD y Hemina y se incubaron en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 18-24 h. Las colonias sugerentes de *H. influenzae* se identificaron atendiendo a los requerimientos de los factores V y X (*BBL TAXO X and V FACTOR STRIPS*, Becton Dickinson Microbiology System) y la serotipificación se llevó a cabo por aglutinación en lámina utilizando antisueros específicos contra los tipos capsulares de la **a** hasta la **f** (Difco) (Perilla y col., 2004). El procedimiento para la toma de los exudados y para el seguimiento en el laboratorio de Microbiología, se describe en el Anexo 5.

### **3.2.5. Ensayos clínicos en lactantes**

Ensayo clínico de fase I: Se desarrolló un estudio controlado y a doble ciegas entre abril y septiembre del 2002 en lactantes sanos que se seleccionaron en las nueve áreas de salud de la zona urbana del municipio Camagüey. Atendiendo a las posibles exclusiones por criterios pediátricos o al abandono voluntario de la participación en el estudio, se previó la captación de 150 lactante para conformar cinco grupos de estudio (A, B, C, D y E), con 30 niños cada uno. Los grupos quedaron conformados de la siguiente manera: A, 24 lactantes; B, 19; C, 23; D, 29 y C, 18 lactantes (Figura 3.3). Se administraron por vía intramuscular, tres dosis (a los 2, 4 y 6 meses de edad) del candidato vacunal con o sin adyuvante, o de la

vacuna control, según correspondiera. A los lactantes incluidos en los grupos B y C se les administraron dos lotes diferentes de Quimi-Hib adyuvado a fosfato de aluminio (1.35 mg/mL), a los agrupados en D y E les fueron administrados dos lotes diferentes del candidato sin adyuvante. Los lactantes del A (control) recibieron Vaxem-Hib (Figura 3.3).

Ensayo clínico de fase II: Un segundo estudio, con diseño experimental de fase II de un ensayo controlado, aleatorizado y a doble ciegas, se efectuó entre junio del 2002 y marzo del 2003. Se definieron tres grupos de estudio (A, B y C) y el tamaño de la muestra para comprobar la hipótesis de inmunogenicidad se estimó en 660 lactantes (220 por grupo). Se sobreestimó la muestra hasta 1 200 lactantes, por las mismas razones tomadas en consideración durante la fase I, pero el ensayo se desarrolló finalmente en 730 lactantes: A, 235; B, 249; C, 246 (Figura 3.3).

La selección se inició en la zona urbana del municipio de Camagüey, pero dado el amplio tamaño de la muestra fue imprescindible extender la captación a los municipios de Florida, Vertientes, Nuevitas, Santa Cruz del Sur, Jimaguayú, Sibanicú y Guáimaro. Por esta misma causa, los lactantes fueron incorporándose al ensayo escalonadamente en cuatro meses (junio, julio, agosto y septiembre). Se aplicó el mismo esquema de vacunación empleado en la fase I. Al grupo A se le designó como control. Los lactantes de B recibieron tres dosis de un mismo lote de Quimi-Hib adyuvado a fosfato de aluminio y a los del grupo C se les administraron tres dosis de un mismo lote de Quimi-Hib sin adyuvante (Figura 3.3).

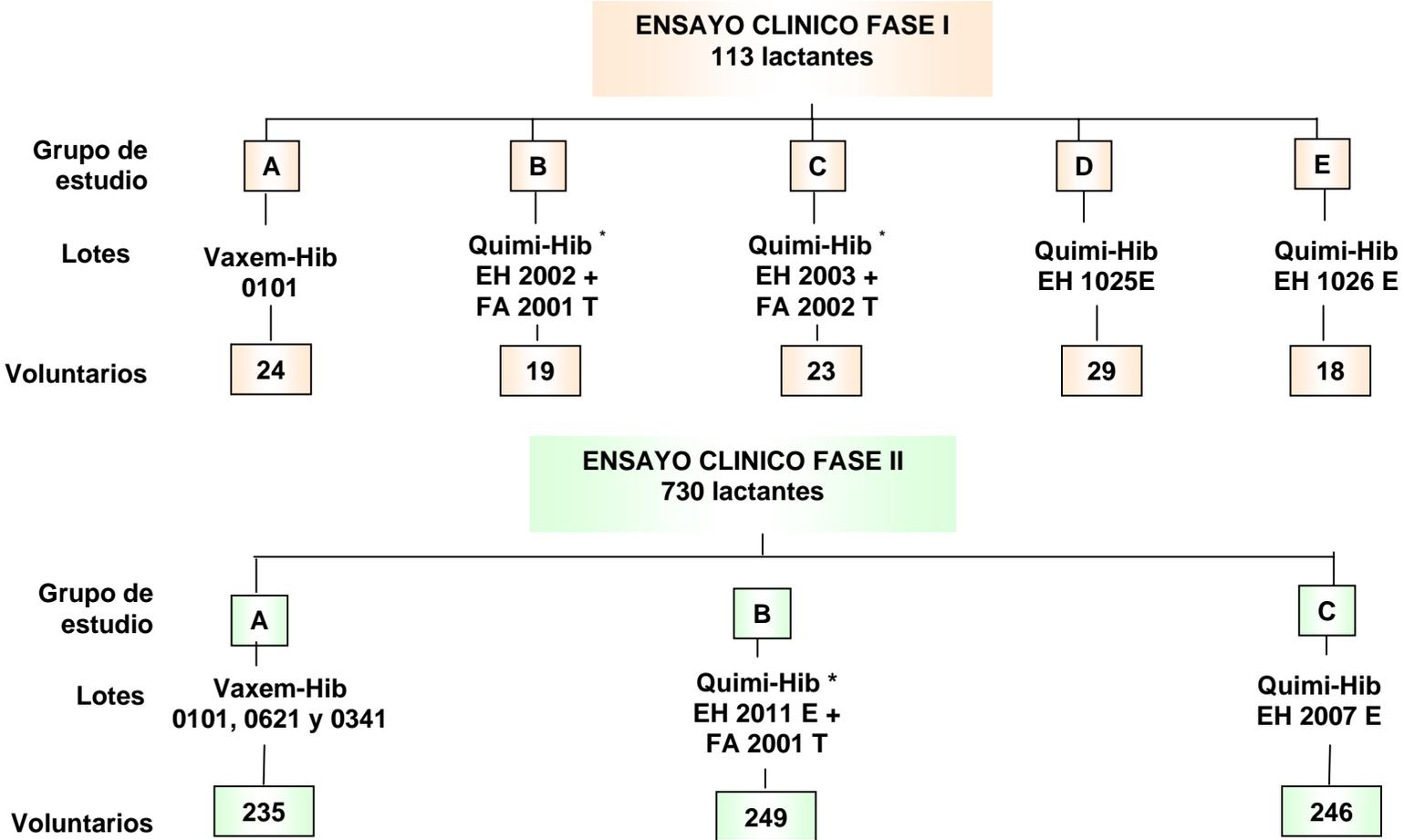


Figura 3.3 Regímenes de vacunas asignadas a cada grupo de estudio durante los ensayos clínicos de fase I y II en lactantes

\* FA: adsorbida a fosfato de aluminio

### **3.2.6. Estudio “Booster”**

Entre septiembre y octubre del 2003 se evaluó la prevalencia de los anticuerpos 12 meses después de la primo vacunación y el comportamiento de la respuesta inmune, tras una dosis de refuerzo de Quimi-Hib, en un estudio abierto y no aleatorizado, en 76 de los 120 niños que participaron en el ensayo clínico de fase I en lactantes. Se hizo un registro de los niños que completaron las tres dosis durante la fase I y se seleccionaron aquellos en los que se determinó que persistían los criterios para su inclusión. Independientemente de la vacuna recibida en la primo-vacunación, durante la que se definieron cinco grupos de tratamiento, todos los niños recibieron al inicio de este nuevo estudio, una dosis de Quimi-Hib sin adyuvante (Lote EH2007E) por vía intramuscular profunda.

Para el análisis de los resultados se definieron tres grupos (A, B y C). Al A se asignaron los niños que durante el ensayo clínico en lactantes de fase I recibieron la vacuna control (20 niños). En B y C se agruparon los niños a los que se les administró Quimi-Hib adyuvada y sin adyugar durante la serie primaria de vacunación en aquel ensayo (25 y 31 niños, respectivamente).

### **3.3. Evaluación de la inmunogenicidad**

Para una mejor comprensión de este acápite se presenta en la Tabla 3.1 un resumen de las pruebas realizadas en cada ensayo.

En todos los estudios, excepto en el de fase II en lactantes, la inmunogenicidad se evaluó antes y después de la vacunación mediante la cuantificación de IgG, empleando el ELISA ya descrito. A cada voluntario se le extrajo sangre justamente antes de ser vacunado (tiempo cero o suero pre-inmune) y entre los 28 y 30 días después (suero post-inmunización). Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones en el laboratorio y se prestó especial cuidado en que los provenientes de un mismo voluntario fueran procesados paralelamente. Las muestras de tiempo cero se trabajaron partiendo de la dilución 1/50 y las de suero post-inmunización se comenzaron a

ensayar a partir de la dilución 1/250. Cada muestra se trabajó por duplicado.

**Tabla 3.1 Pruebas realizadas en cada ensayo para la evaluación de la inmunogenicidad generada por Quimi-Hib.**

Ensayo Clínico	ELISA			Anticuerpos bactericidas
	IgG	IgA	IgM	
Adultos. Estudio 1	X	X	X	
Adultos. Estudio 2	X			
Fase I. 4 y 5 años	X			X
Fase II. 4 y 5 años	X			
Fase I. Lactantes	X	X	X	X
Fase II. Lactantes	X *			X*
“Booster”	X			X

\* Sólo en suero post-inmunización

Para el análisis de los resultados se consideraron como niveles seroprotectores los valores de 0.15 y 1 µg/mL (protección a corto y largo plazo contra la enfermedad por Hib, respectivamente) (Anderson, 1984; Kaythy y Makela 1984; Ambrosino y col., 1986; Santosham y col., 1987; Eskola y col., 1985 y 1990). En los ensayos en adultos y niños entre 4 y 5 años de edad, se aplicó para el análisis el concepto de seroconversión, como: el incremento en 2 veces o más en la concentración de IgG en el suero, 30 días después de la vacunación, con respecto al suero inicial.

Adicionalmente, en el Estudio 1 en adultos, se cuantificaron las concentraciones de IgA e IgM empleando los conjugados a peroxidasa anti-IgA y anti-IgM humana correspondientes, y manteniendo las mismas condiciones para el ELISA.

En el ensayo clínico de fase I en niños entre 4 y 5 años de edad se demostró además, la funcionalidad de los anticuerpos a través de la determinación de la actividad bactericida de

estos. El método empleando se describe en el Anexo 6. Se expresaron los títulos de actividad bactericida como el recíproco de la mayor dilución del suero en que se produjo un 50% de disminución de células vivas de Hib. Esto se determinó por el conteo de colonias en los pocillos de cada dilución de un mismo suero y comparando con el pocillo control, al que corresponde un 100%. Se informaron sueros con actividad bactericida a aquellos para los cuales el título fue  $\geq 8$  (Peeters y col., 1992; Fernández-Santana y col., 2004).

En el ensayo clínico de fase I en lactantes se cuantificó además la concentración pre-inmune y post-inmunización de IgA e IgM anti-Hib y se determinó la actividad bactericida. En el ensayo clínico de fase II sólo se realizaron extracciones de sangre luego de los 30 días de administrada la tercera dosis de la vacuna y además de cuantificarse los niveles de anticuerpos post-inmunización del tipo IgG, se determinaron los títulos de anticuerpos bactericidas.

Por último, en el estudio del efecto “booster” se realizaron extracciones de sangre justamente antes de administrar la dosis de refuerzo y 30 días después. Además de medir la inmunogenicidad a través de la determinación de la concentración de IgG anti-Hib por ELISA, se determinaron los títulos de anticuerpos bactericidas.

#### 3.4. Análisis estadístico

Para el cálculo de los parámetros definidos durante la confirmación del ELISA para la determinación de anticuerpos anti-Hib, se empleó el Programa Excel.

Para el análisis de los resultados de los diferentes ensayos clínicos se utilizaron medidas de estadística descriptiva, como las de frecuencia absoluta y relativa de la seroconversión, y medidas de tendencia central y de dispersión de las evaluaciones de inmunogenicidad, para cada grupo de estudio. Se calcularon los intervalos de confianza de las MGC de anticuerpos.

Se compararon las proporciones de seroconversión por el *test* exacto de Fisher y de Stuart-Maxwell. Para la comparación de las medias de las diferencias de los logaritmos de las

### ***III. Materiales y Métodos***

---

concentraciones de anticuerpos, entre los grupos y dentro de los grupos (antes y después de la vacunación), se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba t-Student para muestras independientes y pareadas. No se excluyó del análisis ningún dato disponible.

Los resultados que verificaron las hipótesis nulas fueron obtenidos antes de que se conociera la identidad de los grupos de tratamiento.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **4.1. Confirmación del ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib en suero humano.**

La validación de un ensayo analítico es el proceso a través del cual se definen los parámetros apropiados de exactitud, precisión, linealidad, límites de detección y especificidad. Dependiendo del tipo de método (físico-químico o biológico) se fijan criterios de aceptación que deben ser documentados en el laboratorio. Atendiendo a si se trata de un método normalizado, normalizado con ampliaciones o modificaciones, o desarrollado en el laboratorio, se definen diferentes niveles de validación durante la acreditación del laboratorio a cargo del método (Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998; Comité Europeo de Normalización, 2003).

EL ELISA indirecto propuesto para la cuantificación de los anticuerpos anti-Hib durante la evaluación de la inmunogenicidad de Quimi-Hib, constituye un método validado internacionalmente y seguro para este propósito. Como se han comparado variaciones en su protocolo en distintos laboratorios del mundo y tiene probada correlación con el RI (Leinonen y Frasch, 1982; Sutton y col., 1985; Schreiber y col., 1986; Kayhty y col., 1988; Phipps y col., 1990), se consideró suficiente la confirmación del método en las condiciones de trabajo del LNRH-IPK (Comité Europeo de Normalización, 2003).

#### **4.1.a. Resultados de la estimación de la precisión**

Se define como precisión a la dispersión de los resultados obtenidos para una muestra procesada varias veces por un ensayo, partiendo de la base de que el grado de concordancia entre los datos de una serie, refleja el efecto de los errores aleatorios producidos durante el proceso analítico. La precisión de un procedimiento de medición dado se subdivide según las condiciones de precisión especificadas (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998; Comité Europeo de Normalización, 2003).

**Tabla 4.1 Resultados de la determinación de la precisión intraensayo del ELISA de cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib.**

Suero	Dilución	Concentración de IgG ( $\mu\text{g/mL}$ ) en cada réplica										X	DE	CV %
<b>1</b>	1/50	0.72	0.59	0.60	0.62	0.56	0.63	0.64	0.60	0.58	0.56	0.61	0.04	7.96
	1/250	0.53	0.57	0.57	0.51	0.55	0.48	0.46	0.63	0.62	0.57	0.55	0.05	9.81
	1/1250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/6250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
													<b>0.58</b>	<b>0.09</b>
<b>2</b>	1/250	7.46	7.52	5.86	7.53	7.57	5.56	7.47	8.14	7.45	6.41	7.10	0.84	11.09
	1/1250	6.67	7.37	6.20	6.88	6.38	6.20	6.84	7.09	5.97	5.35	6.49	0.59	9.15
	1/6250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/31250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
													<b>6.79</b>	<b>1.43</b>
<b>3</b>	1/1250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/6250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/31250	598.02	606.60	636.73	737.49	649.65	633.77	597.07	601.82	624.95	625.93	631.20	41.46	6.57
	1/156250	601.70	711.13	764.03	772.69	715.65	768.38	776.98	772.69	789.79	819.30	749.23	60.88	8.12
													<b>690.21</b>	<b>102.34</b>

**Sueros 1, 2 y 3:** Sueros de baja, media y alta concentración, respectivamente.

**X:** Media de las concentraciones para cada dilución.

**DE:** Desviación Estándar

**CV:** Coeficiente de Variación

- : diluciones que produjeron valores de DO fuera del rango de la curva estándar.

#### IV. Resultados y Discusión

Los resultados del experimento de precisión intraensayo, medida para tres sueros diferentes, se recogen en la Tabla 4.1. Los CV que se obtienen, considerando para cada muestra las 10 réplicas de todas las diluciones, son menores al 10%, excepto para la dilución 1/250 del suero 2, que produjo un valor de 11.09 %. No obstante, el CV para cada suero, tomando en cuenta la concentración media calculada considerando todas las diluciones, exhiben valores aceptables (1, 7.75%; 2, 10.12% y 3, 7.41%).

La precisión intraensayo o repetibilidad expresa condiciones esencialmente sin cambio y en este caso se da en función del CV obtenido para una misma muestra durante un mismo ensayo (Comité Europeo de Normalización, 2003). Los CV logrados para las tres muestras cumplen con el criterio de aceptación, por lo que la precisión que alcanza el método se calificó de satisfactoria

En la Tabla 4.2 se resumen los resultados de la determinación de la precisión interensayo.

**Tabla 4.2 Resultados de la determinación de la precisión interensayo del ELISA de cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib.**

Suero	Ensayo 1		Ensayo 2		CV interensayo %
	X (µg/mL)	CV %	X (µg/mL)	CV %	
1	2.52	19.5	1.40	10.2	<b>18.3</b>
2	6.41	18.6	3.75	20.3	<b>4.9</b>
3	1.41	20.2	2.13	6.6	<b>15.6</b>
4	55.51	20	39.37	11.9	<b>19.8</b>
5	101.54	17.8	150.32	19.6	<b>5.8</b>
6	190.75	19.3	301.14	15.7	<b>1.8</b>
7	712.56	13.1	693.94	18.7	<b>5.5</b>
<b>CV promedio %</b>					<b>10.24</b>

**Ensayos 1 y 2:** ELISA en días distintos y por dos analistas diferentes.

**X:** Media de las concentraciones en cada día que se trabajó el ensayo.

**CV:** Coeficiente de variación.

No se listan en la tabla los valores obtenidos para cada una de las 10 réplicas de los siete sueros, pero se muestran las medias de las concentraciones obtenidas para cada uno. Como puede apreciarse, el CV interensayo para todos los casos fue inferior al 20%, e incluso inferior al 10% para cuatro sueros. Se logró un CV promedio igual a 10.24%.

La precisión interensayo o precisión intermedia se refiere a condiciones donde hay variación en uno o más de los siguientes factores: tiempo, calibración y equipos, generalmente dentro de un mismo laboratorio. En este caso se expresó en función del CV que se logró al procesar varias diluciones de una misma muestra pero en diferentes ensayos, trabajando un número mayor de muestras que en el ensayo anterior. De acuerdo con los resultados obtenidos puede afirmarse que el método tiene una precisión intermedia satisfactoria.

#### **4.1.b. Resultados de la estimación de la veracidad**

La veracidad de medición es el grado de concordancia entre el valor medio obtenido a partir de series grandes de resultados de mediciones y un valor verdadero, y puede ser expresada de forma numérica en función de la recuperación, pues su concepto es cualitativo. La recuperación de un método analítico es el sesgo o porcentaje de error entre el valor de la concentración observada para una muestra y el valor real de concentración (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998; Comité Europeo de Normalización, 2003). Frecuentemente su determinación no es posible para productos biológicos pues no siempre se dispone de un estándar de referencia puro. En este estudio se optó por la utilización del propio suero de referencia internacional Hib Lote 1983, para el cual se conoce que la concentración de IgG es de 60.9 µg/mL (Kayhty y col., 1987; Phipps y col., 1990; Madore y Quataert, 1999; Nicol y col., 2002).

Los resultados del ensayo para determinar la veracidad del sistema se resumen en la Tabla 4.3. Para las diluciones 1/6 250 y 1/31 250, que se corresponden con el segundo y tercer segmentos de la curva patrón, se obtienen valores de recuperación de 96.3% y 90.4%, respectivamente. El CV para ambas concentraciones fue satisfactorio (<15%). El

#### IV. Resultados y Discusión

valor promedio del recobrado fue de 93.35 %. Los porcentajes de recuperación logrados se comportan dentro de los valores óptimos fijados para este parámetro (80-120%).

**Tabla 4.3 Resultados del ensayo de recuperación del ELISA de cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib.**

Dilución de la muestra	Concentración de IgG ( $\mu\text{g/mL}$ ) en cada réplica							X	DE	CV	R %
1/1250	-	-	-	-	-	-	-				
1/6250	49.5	51.5	49.5	60.0	68.3	54.7	67.8	58.6	8.41	14.3	<b>96.3</b>
1/31250	52.7	46.3	55.2	50.1	69.3	56.5	55.2	55.0	7.21	13.0	<b>90.4</b>
1/156250	-	-	-	-	-	-	-				
<b>Promedio de recobrado %</b>											<b>93.35</b>

**X:** Media de las concentraciones para cada dilución.

**DE:** Desviación Estándar

**R %:** Por ciento de Recuperación.

**CV:** Coeficiente de variación.

- : diluciones que produjeron valores de DO fuera del rango de la curva estándar.

La primera y cuarta dilución de la muestra rindieron valores de DO ligeramente superiores e inferiores ( $\text{DO} \geq 1.1$  y  $\leq 0.052$ , datos del laboratorio), respectivamente, a los observados en la curva estándar para esas mismas diluciones, por eso no fueron considerados para el cálculo. Quedaron fuera, no porque el sistema no tenga una buena recuperación en esos puntos, si no porque la curva del estándar rindió valores de DO entre 0.052 y 0.877. Considerando que el suero de referencia Hib Lote 1983 utilizado para la curva estándar y la muestra de concentración de anticuerpos con concentración bien definida, son lo mismo en este experimento, el comportamiento observado para estas diluciones responde a variaciones lógicas que se describen para el ELISA, relacionadas muchas veces con la manipulación del analista.

Otro elemento que permite hacer el cálculo de la recuperación del sistema sin tomar en cuenta los resultados de las diluciones 1/1 250 y 1/ 56 250, guarda relación con lo estipulado por el Programa ELISA para Windows Versión 1 del CDC, de acuerdo con el cual para el cálculo de la concentración de anticuerpos es suficiente con que dos de las diluciones produzcan DO que caigan dentro del rango de la curva y que la diferencia entre los CV de las réplicas de una misma dilución sea menor del 15% (Plikaytis y col., 1996). Es inusual que las cuatro diluciones de una misma muestra resulten útiles para la cuantificación de los anticuerpos, en unos casos por tener bajas concentraciones y en otros por todo lo contrario.

Como se puede ver en la Tabla 4.3, para la segunda y tercera dilución se obtienen concentraciones para el suero de referencia de 58.67 y 55.08 µg/mL, respectivamente, que se corresponden con los porcentajes de recuperación citados antes y que están muy próximos al valor teórico reportado para el suero de referencia internacional (60 µg/mL). Estos resultados evidencian la exactitud del sistema, definida como el grado de concordancia entre el resultado y un valor de referencia certificado (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998).

Atendiendo a los resultados de cada uno de los parámetros estimados, quedó demostrado que el método es preciso y veraz para la aplicación propuesta. Se confirmó que el diseño de ELISA sugerido, empleado en anteriores evaluaciones clínicas de candidatos vacunales (Phipps y col., 1990; Madore y Quataert, 1999; Nicol y col., 2002) podía ser utilizado en la evaluación de la inmunogenicidad de Quimi-Hib en las condiciones del LNRH-IPK.

## **4.2. Evaluación de la inmunogenicidad de Quimi-Hib**

### **4.2.1. Ensayos clínicos en adultos**

Se consideró necesario este estudio, a pesar de no constituir los adultos la población diana a la que va dirigida esta vacuna, porque Quimi-Hib representaba el primer candidato de su tipo para uso en lactantes y se imponía primero su evaluación en un grupo de voluntarios

menos sensibles éticamente. El estudio de la inmunogenicidad se acometió con el conocimiento de que la respuesta observada sería sólo una aproximación a lo que podría producirse en lactantes. En la Tabla 4.4 se refleja como se distribuyó la respuesta de anticuerpos del tipo IgG anti-Hib en los diferentes grupos de voluntarios en este ensayo.

La MGC de anticuerpos antes de la vacunación osciló entre 2.95 y 7.03 µg/mL, cifras un poco superiores a las reportadas para adultos en otros estudios (1-2 µg/mL) (Schneerson y col., 1971; Peltola y col., 1977; Kayhty y col., 1991). Tales niveles pueden atribuirse a la respuesta inmune que se produce como consecuencia de la colonización nasofaríngea por Hib o ante la colonización o infección por otras bacterias tales como *E. coli* K100, cuya estructura antigénica guarda estrecha relación con la del polisacárido capsular de Hib y para la cual se describe producción de anticuerpos de igual especificidad (Myerowitz y col., 1973; Schneerson y Robbins, 1975). Teniendo esto en cuenta se asumió que sólo una parte de los anticuerpos en los sueros post-inmunización serían consecuencia de la estimulación por la vacunación. Por eso para el análisis de los resultados se consideró oportuno aplicar el criterio de seroconversión, como el incremento en cuatro veces o más de la concentración de anticuerpos en el suero post-inmunización con respecto al suero pre-inmune.

En el Estudio 1, las MGC de IgG post-vacunales resultaron similares para los grupos A, B y D; para el C (grupo control) fue menor, pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos. En el Estudio 2 se hizo más evidente el incremento en la concentración de IgG. El grupo H mostró la menor MGC pero tampoco se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de voluntarios ( $p > 0.05$ ). La respuesta de anticuerpos no se incrementó por la utilización del fosfato de aluminio como adyuvante en los grupos G y H. En ambos estudios se puso de manifiesto la consistencia entre los resultados obtenidos para los diferentes lotes de Quimi-Hib utilizados.

De manera general, la MGC de IgG en todos los grupos, independientemente de los regímenes de vacuna, aumentó significativamente después de la vacunación y se generó incremento de la concentración de IgG, que llegó a ser en muchos vacunados de hasta 150

ó 200 veces. La seroconversión fluctuó entre 80 y 100% y no hubo diferencias significativas entre regímenes ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 4.4 Respuesta de IgG anti-Hib en voluntarios adultos.**

Estudio	Grupo Vacuna	Media Geométrica de las Concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ )				Seroconversión (% incremento de 4 veces o más en la [IgG]) <sup>b</sup>
		Antes de la vacunación <sup>a</sup>		Un mes después de la vacunación		
		IgG	Rango	IgG	Rango	
1	<b>A</b>					
	1019 E	4.38	1.00-21.43	84.64	21.21-1 009.7	100
	<b>B</b>					
	1016 E	3.91	1.21-18.33	82.75	5.54-1 009.7	80
	<b>C</b>					
Control	2.95	0.72-49.13	54.95	7.82-1 644.5	90	
<b>D</b>						
1018 E	5.53	1.00-295.88	189.97	13.37-1 575.7	90	
2	<b>E</b>					
	Control	7.03	2.69-39.89	159.17	33.86- 1475.1	90
	<b>F</b>					
	1024 E	4.66	1.16-12.07	134.29	12.19-941.33	100
	<b>G</b>					
1022E FA	5.47	0.98-21.98	101.49	14.21-1 239.1	90	
<b>H</b>						
1021E FA	3.86	0.90-22.90	56.83	7.83-163.91	90	

<sup>a</sup> No hay diferencias significativas entre la media geométrica de las concentraciones de IgG obtenidas para los diferentes grupos de voluntarios luego de la vacunación ( $p > 0.05$ ).

<sup>b</sup> No hay diferencias significativas entre los grupos, respecto al número de voluntarios que respondieron con un incremento de 4 veces o más en la concentración de IgG ( $p > 0.05$ ).

#### IV. Resultados y Discusión

Los ensayos clínicos en adultos para determinar la inmunogenicidad de vacunas conjugadas contra Hib no son comunes, pero en algunos de ellos se reporta una respuesta similar a la descrita en este. Es el caso de los reportes hechos por Granoff y colaboradores en 1984, por Lepow y colaboradores en ese mismo año y por Shneerson y colaboradores en 1986, en los que se describen también altos porcentajes de seroconversión con incrementos de hasta 150 veces o más en las concentraciones de IgG.

**Tabla 4.5 Composición de clases de inmunoglobulinas anti-Hib generada por la vacunación en los diferentes grupos de voluntarios adultos.**

Grupo Vacuna		Media geométrica de las concentraciones (µg/mL)		
		IgM (Rango)	IgA (Rango)	IgG*
A (n=10) 1019E	Pre-inmunización	0.31 (0-0.63)	1.29 (0-6.51)	4.38
	Post-inmunización	6.83 (0-16.90)	6.31 (0-15.28)	84.64
	Incremento $\geq$ 4 veces <sup>a</sup>	8/10	3/10	9/10
B (n=10) 1016E	Pre-inmunización	0.11 (0-0.63)	0.98 (0-6.51)	3.91
	Post-inmunización	3.31 (0-7.70)	7.42 (0-18.48)	82.75
	Incremento $\geq$ 4 veces	4/10	5/10	8/10
C (n=10) Control	Pre-inmunización	0.24 (0-1.06)	0.23 (0-0.85)	2.95
	Post-inmunización	3.92 (0-10.86)	5.38 (0-17.43)	54.95
	Incremento $\geq$ 4 veces	4/10	4/10	10/10
D (n=10) 1018E	Pre-inmunización	0.29 (0-2.27)	2.10 (0-19.11)	5.53
	Post-inmunización	6.99 (0-26.79)	8.29 (1.09-25.32)	189.97
	Incremento $\geq$ 4 veces	3/10	4/10	9/10

\* Los rangos para las medias geométricas de las concentraciones de IgG se muestran en la Tabla 4.4

<sup>a</sup> Número de voluntarios con un incremento de 4 veces o más en la concentración de anticuerpos.

Los niveles de IgA e IgM anti-Hib detectados en los sueros post-inmune de los voluntarios adultos participantes en el Estudio 1, se dan en la Tabla 4.5. Luego de la vacunación la composición de clases de inmunoglobulinas fue muy parecida para los cuatro grupos. Los diferentes regímenes de vacuna indujeron incremento tanto de IgG como de IgA e IgM. En los grupos A, B y C un mayor número de voluntarios respondió incrementando las concentraciones de IgM, IgA e IgG, respectivamente. Sin embargo, no hubo diferencias en los niveles post-inmunización ( $p > 0.05$ ).

Esta misma composición de inmunoglobulinas se observa para las vacunas conjugadas convencionales contra Hib luego de su conjugación con una proteína “carrier”, pues se logra así que el polisacárido capsular de la bacteria se comporte como un Ag DT, (Makela y col., 1987; Kayhty y col., 1981 y 1988; Holmes y col., 1991; Turner y col., 1991; Jelonek y col., 1993). Este representa el primer resultado de caracterización de la respuesta inmune inducida por la vacuna Quimi-Hib, que deberá ser complementado con la determinación de isotipos de IgG y de la funcionalidad y avidéz de los anticuerpos.

En resumen, el candidato vacunal fue altamente inmunogénico. Una única dosis de Quimi-Hib indujo un incremento sustancial de los niveles de anticuerpos en el 100% de los vacunados. Esta respuesta sugirió la posibilidad potencial de su empleo en la prevención de la enfermedad invasiva por Hib, lo que unido a los positivos resultados de los estudios de seguridad y reactogenicidad (no recogidos en este documento), sustentaron la propuesta de su evaluación en lactantes y niños mayores.

#### **4.2.2. Ensayos clínicos en niños entre 4 y 5 años de edad**

##### **4.2.2.a. Resultados del estudio de fase I**

En la Tabla 4.6 se presenta la respuesta de anticuerpos IgG anti-Hib observada en los diferentes grupos de voluntarios en el ensayo clínico de fase I. En el 100% de los niños del grupo A se produjo seroconversión, definida para este estudio como el incremento en 2 veces o más de la concentración de anticuerpos. En el grupo C seroconvirtieron el 97% de

#### IV. Resultados y Discusión

los vacunados y en los grupos B y D, el 94% de los niños. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ). En cambio, entre las MGC de IgG de un mismo grupo antes y después de la vacunación sí se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). La mayor variación se produce en el grupo A, en el que antes de la vacunación era de 2.24  $\mu\text{g/mL}$  y luego se incrementó hasta 46.22  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 4.6 Respuesta de IgG anti-Hib durante el ensayo clínico de fase I en niños entre 4 y 5 años de edad.**

Grupo Vacuna	Media Geométrica de las Concentraciones <sup>a,b</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )				Seroconversión <sup>c</sup> (% incremento de 2 veces o más en la [IgG])
	Antes de la vacunación		Un mes después de la vacunación		
	IgG	Rango	IgG	Rango	
<b>A</b>					
EH1024E	2.24	1.67-2.99	46.22	30.58-69.87	100
<b>B</b>					
EH1026E	2.49	1.86-3.34	18.98	12.38-29.11	94
<b>C</b>					
EH1025E	1.99	1.45-2.72	19.36	13.63-24.37	97
<b>D</b>					
Control	4.4	3.07-6.30	39.26	27.49-63.25	94

<sup>a</sup> No existen diferencias significativas entre los grupos, en las medias geométricas de la concentración de IgG, antes y después de la vacunación ( $p > 0.05$ ).

<sup>b</sup> Hay diferencias significativas entre las medias geométricas de la concentración de IgG para un mismo grupo, antes y después de la vacunación ( $p < 0.05$ ).

<sup>c</sup> No hay diferencias significativas entre los grupos, respecto al número de voluntarios que respondieron con un incremento de la concentración de anticuerpos de al menos 2 veces ( $p > 0.05$ ).

Los resultados de la evaluación de la funcionalidad a través de la determinación de la actividad bactericida de los anticuerpos inducidos por la vacunación aparecen recogidos en la Tabla 4.7.

**Tabla 4.7 Respuesta de anticuerpos bactericidas durante el ensayo de fase I en niños entre 4 y 5 años de edad.**

	<b>A</b> EH1024E	<b>B</b> EH1026E	<b>C</b> EH1025E	<b>D</b> Control
<b>Anticuerpos bactericidas pre-inmune</b>				
N	31	33*	27*	35
Número de niños	2	3	3	4
%	6.5	9.1	11.1	11.4
Promedio para los grupos de estudio y control		8.7%		11.4%
<b>Anticuerpos bactericidas post-inmune</b>				
N	31	33**	32**	35
Número de niños	31	29	24	31
%	100	87.9	75	88.6
Promedio para los grupos de estudio y control		87.5%		88.6%
Diferencia entre las proporciones (después - antes) para cada grupo	<b>93.5%</b>	<b>78.8%</b>	<b>63.9%</b>	<b>77.2%</b>
Diferencia entre los promedios de las proporciones (después - antes)		78.8%		77.2%

N - Número total de niños en cada grupo

\* No se analizó un suero en el grupo B y seis sueros en el C por insuficiente volumen de muestra.

\*\* No se procesó un suero en el grupo B por insuficiente volumen de muestra y no se analizó otro en el C por abandono del estudio.

La proporción de niños con anticuerpos bactericidas 30 días después de administrada la dosis de vacuna, varía entre los grupos. En los que se administró el candidato vacunal (A y B), los porcentajes de niños con anticuerpos bactericidas son superiores (93.5% y 78.8%,

respectivamente) al observado en el grupo control (D = 77.2%). Sólo el grupo C, mostró una proporción menor (63%). Promediando los porcentajes de los grupos A, B y C se encuentra que la proporción de niños con anticuerpos bactericidas es ligeramente mayor que para el grupo control (78.8% contra 77.2%), pero en términos generales la actividad bactericida en los diferentes grupos no difirió significativamente de la actividad inducida por la vacuna control.

Los resultados de este ensayo corroboran los obtenidos en los estudios de fase I en adultos. Los tres lotes del candidato vacunal evaluados mostraron un perfil de inmunogenicidad preliminar tan bueno como el de la vacuna control. Se encontró que los niños estaban protegidos antes de la vacunación y que esta actuó como una dosis de refuerzo que reestimuló una respuesta inmune previa de células B de memoria, induciendo elevadas concentraciones de anticuerpos que no difirieron significativamente de los inducidos por la vacuna control. Esto constituye otra evidencia a favor del empleo del antígeno sintético contra Hib como principio activo de una vacuna contra este agente.

#### **4.2.2.b. Resultados del estudio de fase II**

La respuesta de anticuerpos observada en los diferentes grupos de voluntarios en el ensayo clínico de fase II en niños entre 4 y 5 años de edad se muestra en la Tabla 4.8. Como puede apreciarse en ella, la MGC de anticuerpos pre-inmunes en todos los grupos fue superior a 1 µg/mL, lo que sugiere que todos los niños tenían en el suero niveles de anticuerpos protectores contra la infección por Hib (Anderson, 1984; Kaythy y Makela, 1984).

Para los valores de las MGC antes y después de la vacunación se reportan diferencias significativas en todos los grupos. La estimulación de la respuesta inmune con la vacunación se puso de manifiesto en los grupos A y B con seroconversión en el 89% de los niños. Para el grupo C la seroconversión fue mayor (97.5%), de manera que se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, que pudiera asociarse al empleo de adyuvante con la vacuna control.

#### IV. Resultados y Discusión

De la misma forma, la mayor variación de la MGC de IgG se produce en el grupo C, donde la concentración se incrementa de 2.80 µg/mL hasta 64.29 µg/mL. En los grupos A y B la variación de MGC IgG antes y después de la vacunación es menos notable, por lo que se constataron diferencias significativas entre estos y el grupo C. Este resultado no tiene implicación a los efectos de la evaluación de la inmunogenicidad, pues el valor que se toma como referencia para considerar protegidos a los vacunados a largo plazo es de 1µg/ml, y en este estudio, todos los niños, después de recibir una dosis de vacuna, sobrepasaron esa cifra (Anderson, 1984; Kayhty y Makela, 1984; Wegner y Heath, 1999).

**Tabla 4.8. Respuesta de IgG anti-Hib durante el ensayo clínico de fase II en niños entre 4 y 5 años de edad.**

Grupo Vacuna	Media Geométrica de las Concentraciones <sup>a,b</sup> (µg/mL)				Seroconversión <sup>c</sup> (% incremento de 2 veces o más en la [IgG])
	Antes de la vacunación		Un mes después de la vacunación		
	IgG	Rango	IgG	Rango	
<b>A</b>					
EH1025E	2.66	2.35-3.04	27.35	23.35-32.03	89.5
<b>B</b>					
EH1026E	2.67	2.38-2.99	31.01	26.4-36.4	89.7
<b>C</b>					
Control	2.80	2.38-2.99	64.29	55.1-74.98	97

<sup>a</sup> Hay diferencias significativas entre las medias geométricas de la concentración de IgG antes y después de la vacunación, entre los grupos A y B y el grupo control ( $p > 0.05$ ).

<sup>b</sup> Hay diferencias significativas entre las medias geométricas de la concentración de IgG dentro de los grupos, antes y después de la vacunación ( $p < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Hay diferencias significativas en las proporciones de seroconversión entre los grupos vacunados con Vaxem-Hib y los vacunados con Quimi-Hib ( $p > 0.05$ ).

#### IV. Resultados y Discusión

Considerando entonces que concentraciones de IgG por encima de 5 µg/mL se asocian con la eliminación del estado de portador nasofaríngeo de Hib (Takala y col., 1991), se procedió a hacer un análisis de los resultados de este ensayo tomando en cuenta tal criterio. En la Tabla 4.9 puede observarse como a pesar de que existen diferencias en las proporciones de seroconversión entre los grupos que recibieron la vacuna Quimi-Hib y el grupo control (vacuna Vaxem-Hib), son similares las diferencias de las proporciones pre-inmunización y post-inmunización de las concentraciones de IgG  $\geq 5$  µg/ml.

**Tabla 4.9. Distribución del número de niños en los diferentes grupos de estudio, atendiendo a los niveles de IgG antes y después de la vacunación.**

	Niveles de IgG µg/mL				Total
	< 0.15	$\geq 0.15$ y < 1	$\geq 1$ y < 5	$\geq 5$	
<b>Antes</b>					
Vaxem-Hib	0	39 (12.5%)	183 (58.65%)	90 (28.85%)	312 (100%)
<b>Después</b>					
Vaxem-Hib	0	0	8 (2.56%)	304 (97.44%)	312 (100)%
<b>Diferencia (%)</b>	0	-12.5	-54.09	<b>68.6</b>	-
<b>Antes</b>					
Quimi-Hib	2 (0.32%)	97 (15.54%)	399 (63.94%)	164 (26.28%)	624 (100%)
<b>Después</b>					
Quimi-Hib	0	1 (0.16%)	54 (8.65%)	607 (97.27%)	624 (100%)
<b>Diferencia (%)</b>	-0.30	-15.38	-55.29	<b>70.99</b>	-

Al inicio del estudio sólo dos niños de los asignados a los grupos que recibirían la vacuna Quimi-Hib (uno en el A y otro en el B) tenían niveles de anticuerpos inferiores a 0.15 µg/mL, pero más del 25% de todos los niños, sin hacer distinción de la vacuna que recibirían, tenían concentraciones por encima de 5 µg/ml. Este resultado se discute con mayor profundidad más adelante (Acápite 4.2.2.c).

Al promediar las proporciones de los niños que 30 días después alcanzan concentraciones superiores a 5 µg/ml, con respecto a los que no llegaban a estos niveles al comenzar el estudio, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos A y B, considerados como uno sólo para el análisis (68.6% y 70.99%, respectivamente).

El hecho de que en un gran número de niños, independientemente de la vacuna recibida, se desarrollaran concentraciones de anticuerpos superiores a este valor, representa el resultado de mayor impacto en el estudio. La vacunación, además de proporcionar un beneficio a los niños voluntarios, podría contribuir a la disminución de la transmisión de Hib entre la población infantil de la comunidad en que se desarrolló el ensayo clínico (Anderson y May, 1985; Anderson, 1992; Makela y col., 1995).

De manera general, los dos lotes evaluados del candidato vacunal mostraron un perfil de inmunogenicidad tan bueno como el de la vacuna control. Como en el ensayo de fase I, los niños estaban protegidos antes de la vacunación y esta actuó como una dosis de refuerzo que reestimuló una respuesta inmune previa contra el antígeno capsular de Hib, induciendo elevados niveles de anticuerpos. Aunque se encontraron diferencias significativas en las MGC de IgG alcanzadas por los grupos luego de la vacunación y en cuanto a los porcentajes de seroconversión, tales resultados no restan méritos a la inmunogenicidad generada por Quimi-Hib, pues todos los niños incrementaron la concentración de anticuerpos, incluso a niveles reportados como capaces de prevenir el estado de portador nasofaríngeo. Esto constituye otra evidencia a favor del empleo del antígeno sintético contra Hib como principio activo de una vacuna contra este agente.

#### **4.2.2.c. Inmunidad naturalmente adquirida y estudio del estado de portador nasal y faríngeo en niños entre 4 y 5 años de edad.**

Luego de que la OMS recomendara la inclusión de una vacuna conjugada contra Hib en los programas de inmunización de los países en los que los recursos lo permitan, son escasos los estudios dirigidos a conocer los niveles de anticuerpos contra este agente, en la

población infantil sin vacunar (Quirós y col., 1996; López-Yap y col., 2001).

En la Tabla 4.10 se presentan los resultados del análisis de las concentraciones de anticuerpos en los sueros obtenidos justamente antes de la vacunación, de todos los niños entre 4 y 5 años de edad incluidos en el estudio de fase II antes descrito. En el 99.7% de los sueros se detectaron niveles protectores de anticuerpos contra Hib ( $> 0.15 \mu\text{g/ml}$ ). Sólo en dos sueros no se demostró protección. En un alto porcentaje de niños se encontraron concentraciones de IgG entre 1 y 5  $\mu\text{g/mL}$  y  $> 5 \mu\text{g/mL}$  (62.17% y 27.137%, respectivamente). Niveles de anticuerpos que correlacionan con protección inmediata, pero de corta duración ( $> 0.15$  y  $< 1 \mu\text{g/mL}$ ), se observaron en el 14.52% de los sueros (Makela, 1977; Eskola y col., 1985 y 1990). La MGC fue de  $2.71 \mu\text{g/mL}$ .

**Table 4.10 Niveles de IgG anti-Hib adquiridos de forma natural en una muestra representativa de la última cohorte de niños no vacunados en Cuba.**

Niveles de IgG anti-Hib ( $\mu\text{g/mL}$ )	Número de niños	%	MGC ( $\mu\text{g/mL}$ )
$< 0.15$	2	0.32	
$> 0.15$ y $< 1$	136	14.52	2.71*
$> 1$ y $< 5$	582	62.17	
$> 5$	254	27.13	

\*  $p < 0.05$ , Intervalo de confianza: 2.54 – 2.78

Los resultados de los exudados nasales y faríngeos tomados a los niños en ambos estudios arrojaron preliminarmente 16 cultivos positivos para *H. influenzae*, pero sólo en un caso se confirmó la identificación para el tipo b. Esto representa un 0.1% de portadores nasales de Hib en el grupo de niños estudiados. El resto de los aislamientos resultaron no tipables serológicamente.

Estudios similares realizados en Finlandia antes de que la vacunación contra Hib se constituyera en una práctica extendida a través de todo el mundo, concluyeron que la mayoría de los niños entre 4 y 5 años de edad portaban niveles protectores de anticuerpos contra Hib. En dichas investigaciones se reportó un 79% de niños con concentraciones superiores a 0.15 µg/mL y un 32% con concentraciones mayores a 1 µg/mL (Kaythy y col., 1991 y 1992). Altos niveles de anticuerpos anti-Hib en más del 80% de los niños de este mismo grupo de edad fue también descrito por Acharya y colaboradores en un estudio realizado en la India en 1997. Sin embargo, la MGC en ambos estudios (0.48 µg/mL en Finlandia y 0.94 µg/mL en la India) es inferior a la demostrada en este, para la última cohorte de niños cubanos entre 4 y 5 años de edad no vacunados contra Hib.

Los altos niveles de anticuerpos contra Hib encontrados en este grupo de niños (MGC = 2.71µg/mL) sugieren que desarrollaron una respuesta inmune de adaptación como consecuencia de la exposición natural a la bacteria. En el período anterior a la vacunación la mayoría de los niños entre 4 y 5 años de edad habían adquirido inmunidad “natural” a través de infecciones asintomáticas por Hib, pero en la medida en que se fue extendiendo el uso de las vacunas conjugadas, la proporción de niños que constituyen portadores nasofaríngeos de la bacteria ha disminuido. Se especula sobre la posibilidad de que la exposición natural a otros microorganismos con estructura antigénica común pueda estimular el desarrollo de anticuerpos contra la cápsula de Hib. Tal es el caso de los anticuerpos inducidos durante la colonización por *E. coli* K-100, otras enterobacterias y *Staphylococcus aureus* (Bradshaw y col., 1971). *E. coli* K-100, por ejemplo, constituye un microorganismos frecuentemente aislado en países en desarrollo y se ha demostrado que su presencia estimula la producción de anticuerpos anti-Hib (Schneerson y Robbins, 1975; Puliyl y col., 2001).

Además de prevenir la infección invasiva, las vacunas conjugadas contra Hib reducen el estado de portador nasofaríngeo debido a que inducen el desarrollo de anticuerpos en las mucosas, lo que previene la colonización (Kayhty, 1998). Como consecuencia de la vacunación, la transmisión de Hib disminuye dentro de la población infantil, resultando

protegidos incluso los niños no vacunados. Esto podría explicar el hallazgo de sólo un portador entre los niños incluidos en el estudio. Otra posible explicación la constituye precisamente el hecho de que en un gran número de ellos (27.13%) se evidenciaron concentraciones de anticuerpos por encima de 5 µg/mL. Aunque la correlación entre los niveles de anticuerpos requeridos para la erradicación del estado de portador nasofaríngeo de Hib no está bien establecida, parecen ser necesarias altas concentraciones de anticuerpos anti-Hib para evitar la colonización, superiores a las requeridas para prevenir la infección invasiva (Takala y col., 1991; Goicochea y col., 2002; Romanin y col., 2007).

Este estudio mostró en un grupo de niños, representativo de la última cohorte no vacunada contra Hib en Cuba, altas concentraciones de anticuerpos anti-Hib, lo que aporta una evidencia adicional de que en muchos países en desarrollo la población infantil adquiere inmunidad natural activa contra este agente desde etapas tempranas de la vida (Tastan y col., 2000; Puliyeel y col., 2001; Clemens y col., 2003). Observaciones como esta son las que toma en consideración la OMS al recomendar que la estrategia de vacunar a todos los niños menores de 5 años de edad debe ser sólo considerada por aquellos países donde pueda ser afrontada sin afectar los recursos destinados a la vacunación de los lactantes (WHO, 1998).

La inmunidad natural para Hib parece ser diferente para los niños de distintos países, lo que está sujeto a la influencia de factores geográficos, genéticos y sociales. Altos niveles de inmunidad natural se asocian a una alta endemicidad de la bacteria en regiones específicas, y al mismo tiempo es posible que en determinadas poblaciones se produzca una respuesta inmune menor que en otras, ante la exposición a la bacteria (Tastan y col., 2000; Gallo y col., 2002).

Teniendo como base los resultados de estudios similares a este, se hace evidente que para evitar gastos innecesarios de recursos, cada país que se proponga la vacunación contra Hib de la población infantil entre 1 y 5 años, debe investigar en este grupo el estado de la inmunidad naturalmente adquirida.

4.2.3. Ensayos clínicos en lactantes

4.2.3a. Resultados del estudio de fase I

Tabla 4.11 Respuesta de anticuerpos en los lactantes incluidos en el estudio de fase I, un mes después de la tercera dosis.

	<b>A</b> (Control)	<b>B</b> (EH 2002 + FA 2001 T)	<b>Grupo C</b> (EH 2003 + FA 2002 T)	<b>D</b> (EH 1025E)	<b>E</b> EH 1026E)
<b>IgG</b> <b>≥ 1 µg/mL*</b>	24/24 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	29/29 (100%)	18/18 (100%)
<b>IgG</b> <b>≥ 5 µg/mL</b>	24/24 (100%)	18/19 (94.7%)	18/23 (78.3%)	28/29 (96.6%)	17/18 (94.4%)
<b>MGC IgG post inmunización</b> (µg/mL)	93.69	107.77	28.22	35.51	46.53
<b>MGC IgM post inmunización</b> (µg/mL)	1.45	1.14	0.97	1.5	1.18
<b>MGC IgA post inmunización</b> (µg/mL)	0.33	0.6	1.22	0.59	0.44
<b>No. voluntarios con anticuerpos bactericidas</b>	22/24 (91.7%)	18/19 (94.7%)	13/22 (59.1%)	24/29 (82.8%)	16/18 (88.9%)

\* El 100% de niños en todos los grupos alcanzaron concentraciones de IgG por encima de 1 µg/mL luego de la tercera dosis de vacunación, lo que les confiere protección a largo plazo.

En el 100% de los sueros pre-inmunes la concentración de IgG anti-Hib fue superior a 0.15 µg/mL y sólo en el 26.78% la concentración fue inferior a 1 µg/mL. La MGC de IgG antes de la vacunación fue de 2.78 µg/mL. Se pudieron comprobar así, niveles de

anticuerpos protectores similares a los reportados para los lactantes a los 2 meses de edad en otros estudios (Ward y col., 1981; Anderson, 1984, Kaythy y Makela, 1984; Kayhty y col., 1991 y 1992). En la Tabla 4.11 se resumen los resultados de la evaluación de la inmunogenicidad un mes después de la tercera dosis, cuando el 100% de los lactantes en todos los grupos tuvieron niveles seroprotectores de IgG anti-Hib, mayores a 1 µg/mL.

En los dos grupos en los que se administró la vacuna Quimi-Hib sin adyuvante (D y E), más del 94% de los lactantes alcanzaron cifras de anticuerpos incluso superiores a 5 µg/mL, mostrando de esta forma una respuesta inmune similar a la observada en los grupos A (grupo control) y B (candidato vacunal con adyuvante), pero mejor a la desarrollada por los lactantes del grupo C, donde la vacuna Quimi-Hib fue administrada también con adyuvante. La MGC de IgG se incrementó en todos los grupos luego de la vacunación. El candidato vacunal sin adyuvante generó un incremento de anticuerpos de 35 a 46 veces sobre el límite seroprotector. La similitud del comportamiento de ambos grupos (D y E) indica la equivalencia de los lotes de vacunas utilizados. En cambio, mientras que uno de los lotes del candidato cubano con adyuvante (grupo B) indujo una MGC de IgG de 107.77 µg/mL (es decir, 100 veces el umbral), el grupo C difirió significativamente en la MGC alcanzada con su empleo (28.22 µg/mL).

La actividad bactericida de los anticuerpos inducidos en los diferentes grupos de estudio correlacionó positivamente con la concentración de IgG anti-Hib. En todos los grupos más del 80% de los lactantes portaron anticuerpos bactericidas, exceptuando nuevamente al grupo C, donde a pesar de administrarse el candidato adyuvado a fosfato de aluminio, sólo se demostraron anticuerpos bactericidas en el 59.1% de los sueros. Al grupo B en cambio, le corresponde la mayor MGC de IgG y la mayor actividad bactericida. El mejor y peor comportamiento a la vez, de uno y otro lote de Quimi-Hib con adyuvante, induce a cuestionar la potencialidad de este en el incremento de la inmunogenicidad del candidato en la formulación probada, o la homogeneidad en la producción de los lotes de vacuna administrados en los grupos B y C; pero esto necesita ser demostrado.

En todos los grupos se detectaron anticuerpos anti-Hib de los isotipos IgM e IgA (Tabla 4.11). La producción de IgA en menor o mayor grado, habla a favor de una maduración de la respuesta inmune y de memoria inmunológica, pero no guarda relación con el incremento de la actividad bactericida dado que este isotipo de anticuerpos es un pobre activador de la vía clásica del complemento. Así puede verse, como al grupo C, el de más baja concentración de IgG y de actividad bactericida, le corresponde la mayor MGC de IgA. Para el resto de los grupos, donde la MGC de IgM es superior, el número de voluntarios con anticuerpos bactericidas es también mayor. Esta relación proporcional parece estar dada por el hecho de que las moléculas de IgM con sus cinco sitios de reconocimiento y de unión al antígeno pueden contribuir mejor a la actividad bactericida mediada por el complemento (Turner, 1996; Goldsby y col., 2000). No obstante, las vacunas conjugadas contra Hib no causan un sustancial incremento de los niveles de IgM en el suero de los individuos vacunados (Reid y col., 1993; Madore y col., 1990b; Baggett y col., 2006).

Los resultados de este estudio condicionaron la ejecución de un ensayo clínico de fase II en lactantes, para la evaluación de la inmunogenicidad del candidato vacunal sin adyuvante y adyuvado a fosfato de aluminio.

#### **4.2.3b. Resultados del estudio de fase II**

En la Tabla 4.12 se exhiben las MGC de IgG y los porcentajes de actividad bactericida para cada grupo de estudio en el segundo ensayo clínico conducido en lactantes. Como puede apreciarse, los grupos B y C, que se corresponden con los que recibieron Quimi-Hib con adyuvante y sin adyuvante, respectivamente, no difieren entre sí en cuanto a las MGC de IgG (grupo B - 24.84  $\mu\text{g/mL}$ , grupo C - 25.53  $\mu\text{g/mL}$ ) un mes después de la tercera dosis. En cambio, la MGC del grupo control (83.14  $\mu\text{g/mL}$ ) sí difiere significativamente. Este resultado no tiene implicaciones a los efectos de la evaluación de la inmunogenicidad de Quimi-Hib, pues con todos los regímenes de vacunas se logra generar seroprotección en la totalidad de los vacunados, independientemente de las diferencias en los niveles de concentración de IgG alcanzados (Tabla 4.13).

De manera general, y retomando los resultados de la fase I en lactantes (Tabla 4.11), las MGC de IgG son más elevadas que las reportadas por la gran mayoría de los ensayos clínicos publicados mundialmente. Sólo son comparables a los obtenidos por Lolekha y col. en el 2001, al evaluar la inmunogenicidad de una vacuna conjugada contra Hib del tipo PRP-T combinada con la DPT (31 - 61 µg/mL), y con los publicados en un estudio en lactantes venezolanos (37.9 µg/mL) también con una vacuna conjugada del tipo PRP-T (Castillo de Febres y col., 1994).

**Tabla 4.12 Respuesta de anticuerpos en los lactantes incluidos en el ensayo clínico de fase II.**

	<b>Grupo</b>		
	<b>A</b> (Control)	<b>B</b> (EH 2011E + FA)	<b>C</b> (EH 2007E)
<b>MGC IgG post-inmunización</b>	83.14 µg/mL*	24.84 µg/mL	25.53 µg/mL
(Rango)	(72.02-95.97)	(21.16-29.15)	(21.93-29.15)
<b>No. voluntarios con anticuerpos bactericidas</b>	219 (93.19%)**	183 (73.49%)	187 (76.01%)

\*  $p > 0.05$ . Difiere significativamente de la de los grupos B y C.

\*\*  $p = 0.00$ . Hay diferencias estadísticamente significativas a favor del grupo control, entre las proporciones de niños con anticuerpos bactericidas.

Por otra parte, la determinación de la funcionalidad de los anticuerpos a través de la detección de la actividad bactericida, permitió demostrar que los grupos B y C se comportan de forma semejante. En el grupo B, el 73.49% de los sueros evaluados mostraron actividad bactericida y en el grupo C se hizo evidente para el 76% de los sueros. En un porcentaje mayor en el grupo A (93.19%) se puso de manifiesto la actividad bactericida de los anticuerpos, por lo que el comportamiento de este difiere

significativamente del observado en los grupos B y C. Sin embargo, este resultado también carece de relevancia a los efectos de la comparación de la inmunogenicidad generada por la vacuna control y el candidato vacunal, pues entre los requisitos exigidos para la producción y control de vacunas conjugadas contra Hib, no se especifican en que cantidad de los voluntarios participantes en los ensayos, deben demostrarse anticuerpos con actividad bactericida (WHO, 2000).

En la Tabla 4.13 se desglosa el porcentaje de lactantes, en los diferentes grupos del estudio, que alcanzaron concentraciones de IgG  $\geq$  0.15, 1 y 5  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 4.13 Porcentajes de lactantes con concentraciones de IgG  $\geq$  0.15, 1 y 5  $\mu\text{g/mL}$ , en el ensayo clínico de fase II en lactantes.**

Grupo	n	IgG $\geq$ 0.15 $\mu\text{g/mL}$ * (%)	IgG $\geq$ 1 $\mu\text{g/mL}$ * (%)	IgG $\geq$ 5 $\mu\text{g/mL}$ (%)
A	235	100	100	99.1 (n = 233)
B	249	100	99.6 (n = 248)	87.6** (n = 218)
C	246	100	99.6 (n = 245)	91.1** (n = 224)

\*  $p > 0.05$ . No hay diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de niños con concentración de IgG  $\geq$  0.15  $\mu\text{g/mL}$  y 1 $\mu\text{g/mL}$ , entre los grupos.

\*\* Hay diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de niños con concentración de IgG  $\geq$  5 $\mu\text{g/mL}$ , a favor del grupo A.

n- Número total de niños en cada grupo y número de niños que alcanzan los niveles de concentración de IgG presentados en la tabla.

Como se aprecia, más del 99.6% de los vacunados quedaron protegidos contra la enfermedad por Hib al alcanzar concentraciones por encima de 1  $\mu\text{g/mL}$ , un mes después

de administrada la tercera dosis de la vacuna, independientemente del grupo de estudio al que fueron asignados. El 87.6% de los vacunados desarrollaron anticuerpos por encima de 5 µg/mL. No se encontraron diferencias significativas en las proporciones de seroprotección entre los grupos.

Los altos niveles de anticuerpos generados por Quimi-Hib contra el polisacárido capsular de Hib podrían entonces resultar suficientes para garantizar la protección contra la enfermedad invasiva durante el primer año de vida y hasta recibir la dosis de refuerzo. Para poder hacer tal aseveración es necesario el análisis de los resultados obtenidos durante el ensayo “booster”, en el acápite siguiente.

#### **4.3. Evaluación de la respuesta inmune tras una dosis de refuerzo de Quimi-Hib.**

En la Tabla 4.14 se resumen los resultados del estudio llevado a cabo para la evaluación de la inmunogenicidad luego de aplicar una dosis de refuerzo de Quimi-Hib. Se presentan en ella la cantidad de voluntarios con concentraciones de IgG  $\geq 1$  y 5 µg/mL y con anticuerpos con actividad bactericida, en el suero post-primo-vacunación (30 días después de la serie inicial de tres dosis de vacuna), en el suero extraído justo antes de la dosis de refuerzo y 30 días después.

En el 100% de los niños antes de recibir la dosis de refuerzo (sección II en la Tabla 4.14) se demostraron concentraciones de anticuerpos anti-Hib por encima de 1 µg/mL, después del refuerzo se mantienen las mismas proporciones. Como esta cifra correlaciona con protección a largo plazo, este es el primer resultado importante del estudio. Permitió poner en evidencia que 12 meses después los niños permanecían protegidos, independientemente de si fueron beneficiados con la vacuna comercial o con Quimi-Hib durante el ensayo clínico de fase I en lactantes. Este resultado se corresponde con lo reportado por otros estudios dirigidos a la evaluación de una dosis de refuerzo de vacunas conjugadas convencionales (Santos y col., 2002; Makela y col., 2003; Huebner y col., 2004).

**Tabla 4.14 Porcentajes de niños con niveles de IgG  $\geq$  1 y 5  $\mu$ g/mL y con anticuerpos bactericidas, durante la evaluación de la dosis de refuerzo.**

Grupo	IgG $\geq$ 1 $\mu$ g/mL			IgG $\geq$ 5 $\mu$ g/mL			Ac bactericidas		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>I</b>									
Número	20	25	31	20	21	29	19	17	28
%	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>84</b>	<b>93.5</b>	<b>95</b>	<b>68</b>	<b>90.3</b>
N*	20	25	31	20	25	31	20	25	31
<b>II</b>									
Número	20	25	31	12	17	21	16	20	23
%	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>48</b>	<b>63</b>	<b>67.7</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>74.2</b>
N*	20	25	31	20	25	31	20	25	31
<b>III</b>									
Número	20	25	31	21	24	31	20	25	31
%	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>96</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
N*	20	25	31	20	25	31	20	25	31

\* Número de sueros en los que se hicieron las determinaciones.

**I**- 30 días después de la primo-vacunación, **II**- antes de la dosis de refuerzo, **III**- 30 días después de la dosis de refuerzo, Grupo **A**: vacuna control en la fase I, **B**: Quimi-Hib con adyuvante, **C**: Quimi-Hib sin adyugar.

Resulta interesante también, que 30 días después de la primo-vacunación, el 100% de los niños del grupo A tiene concentraciones de IgG por encima de 5  $\mu$ g/mL, mientras que para los grupos B y C, los valores son de 84% y 93.5%, respectivamente. Sin embargo, para este mismo criterio, justamente antes de la dosis de refuerzo, las cifras se hacen superiores para los grupos B y C (63% y 67.7%, respectivamente), contra un 48% en el grupo A. Una vez aplicada la dosis de refuerzo, todos los niños (excepto uno en el grupo B) sobrepasan este umbral y en el 100% de los sueros se demostró actividad bactericida de los anticuerpos. Estas observaciones constituyen en conjunto otro importante resultado del estudio, pues

#### IV. Resultados y Discusión

ponen de relieve la positiva respuesta inmune que se produjo tras una dosis de refuerzo de Quimi-Hib.

En la Tabla 4.15 se exhiben las MGC de IgG anti-Hib en los tres tiempos considerados para el análisis de los resultados en el estudio.

**Tabla 4.15 Medias geométricas de la concentración de IgG anti-Hib para cada grupo durante el ensayo para la evaluación de la dosis de refuerzo.**

		<b>Grupo</b>		
		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>30 días después de la primo-vacunación</b>	MGC IgG (µg/mL)	<b>92.83</b>	<b>56.61</b>	<b>34.81</b>
	95% IC	58.55-145.47	28.8-111.1	22.7-53.5
	Mediana	137.1	89.12	39.25
	Min.; Max.	10.78 ; 276.68	1.37 ; 438.78	2.50 ; 174.2
	N*	20	25	31
<b>pre-refuerzo</b>	MGC IgG (µg/mL)	<b>6.45</b>	<b>7.4</b>	<b>5.81</b>
	95% IC	4.61-8.93	5.36-10.2	4.66-7.24
	Mediana	6.98	7.24	6.55
	Min.; Max.	1.88 ; 26.59	1.35 ; 25.98	1.78 ; 21.75
	N*	20	25	31
<b>30 días después de la dosis de refuerzo</b>	MGC IgG (µg/mL)	<b>56.69</b>	<b>62.80</b>	<b>59.14</b>
	95% IC	36.96-85.62	41.26-104.58	41.6-84.8
	Mediana	68.85	57.97	54.8
	Min.; Max.	8.27 ; 196.71	3.78 ; 671.96	7.76 ; 214.6
	N*	20	25	31
<b>Razón</b>				
<b>MGC después / antes</b>				
(95% IC)		8.75 (5.69-13.46)	8.49 (5.52-13.1)	10.2 (7.1-14.3)
<b>Razón de la diferencia de MGC</b>		<b>Grupo A</b>	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>
<b>antes y después del refuerzo</b>		<b>contra el B</b>	<b>contra el C</b>	<b>contra el C</b>
(95% IC)		1.1 (0.52-2.4)	1.09 (0.6-2.1)	1 (0.5-2)

\* Número de sueros en los que se determinó IgG, 30 días después de la primo-vacunación.

Grupo A: Vacuna control en la fase I, B: Quimi-Hib con adyuvante, C: Quimi-Hib sin adyuvante.

Al término de la primo-vacunación es mayor para el grupo A (el que durante el ensayo de fase I en lactantes recibió la vacuna convencional): 92.83 µg/mL, contra 56.61 µg/mL y 34.81 µg/mL para los grupos B y C, respectivamente. Justamente antes de la dosis de refuerzo, la MGC de IgG termina siendo > 1 µg/mL y similar para los tres grupos (6.45, 7.4 y 5.81 µg/mL, respectivamente). Los lactantes que fueron vacunados durante el ensayo de fase I, 12 meses después, tenían niveles de anticuerpos protectores contra la enfermedad por Hib; la respuesta inmune generada por la vacunación durante ese ensayo puede ser calificada de duradera.

Al transcurrir 30 días de administrada la dosis de refuerzo, la MGC de IgG es sólo ligeramente superior en el grupo B (62.80 µg/mL) con respecto a los grupos A (56.69 µg/mL) y C (59.14 µg/mL).

Al culminar este ensayo clínico se pudo afirmar que la respuesta inmune frente a Quimi-Hib reúne los requisitos exigidos por la OMS para la producción y control de vacunas conjugadas contra Hib, atendiendo a lo reportado luego de muchos años de experiencia con el uso de estas (WHO, 2000), y de acuerdo con lo cual se estipula que deben:

- Inducir concentraciones de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib  $\geq 1$  µg/mL en el 70% o más de los lactantes vacunados, un mes después de recibir la serie primaria de inmunizaciones (3 dosis: a los 2, 4 y 6 meses de edad).
- Generar anticuerpos funcionales, demostrados a través de la determinación de la actividad de opsonofagocitosis o de la actividad bactericida (para este parámetro no se definen porcentajes o niveles).
- Producir un incremento de la concentración de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib al ser administrada una dosis de refuerzo (efecto “booster”) a los lactantes que recibieron la serie primaria de inmunización.

#### ***IV. Resultados y Discusión***

---

Un último requisito, no menos importante, está relacionado con la respuesta inmune frente a la proteína empleada como “carrier” (WHO, 2000). En este caso, la concentración de anticuerpos contra la anatoxina tetánica fue medida en el suero de los lactantes vacunados durante los ensayos clínicos y, aunque los resultados de dicha prueba no se incluyen en este documento, se constató que no existe interferencia de relevancia clínica en la respuesta inmune (Dato disponible en los Informes de Ensayo Clínico en lactantes de fase I y II, que formaron parte del Expediente para el Registro de Quimi-Hib, No. Certificado de Inscripción: B-03-150-J07, expedido por el CECMED el 5 de noviembre 2003).

## V. CONCLUSIONES

- 1- La alta precisión y veracidad obtenidas para el ELISA, confirmaron que este cumplía con los requisitos exigidos para su uso en la determinación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib, durante los ensayos clínicos.
- 2- La evaluación de la respuesta inmune en adultos proporcionó las primeras evidencias de la inmunogenicidad frente a Quimi-Hib en humanos, poniendo de relieve valores de seroconversión que no difieren de los inducidos por la vacuna control y que no se modificaron con el empleo del adyuvante.
- 3- Los resultados del estudio de inmunidad natural, fundamentan retrospectivamente, el no haber adoptado la estrategia de actualización inmunitaria en niños mayores, en el momento de la introducción de la vacuna contra Hib en el PNI en Cuba.
- 4- La administración de Quimi-Hib a niños entre 4 y 5 años de edad reestimuló una respuesta previa de anticuerpos contra Hib. Este estudio permitió pasar con mayor seguridad a la evaluación de la inmunogenicidad en la población diana.
- 5- Los ensayos en lactantes consolidaron a Quimi-Hib como la primera vacuna obtenida por síntesis química, con alta eficacia clínica en humanos. La inmunogenicidad inducida por esta no se modificó con el empleo de adyuvante.
6. Se demostró una respuesta inmune protectora y duradera frente a Quimi-Hib y se puso de manifiesto el efecto “booster” al constatarse un incremento de la concentración de anticuerpos funcionales luego de la dosis de refuerzo.
7. La respuesta inmune generada por Quimi-Hib reúne los requisitos exigidos por la OMS para la producción y control de vacunas conjugadas contra Hib.

## VI. RECOMENDACIONES

- Validar el ELISA empleado durante los ensayos clínicos para la evaluación de la inmunogenicidad de Quimi-Hib, luego de la obtención de un juego de reactivos propios, con el objetivo de poder suministrar este servicio durante los estudios que se prevén para la evaluación clínica de diferentes combinaciones de Quimi-Hib con otras vacunas.
- Continuar los estudios de caracterización de la respuesta inmune frente a Quimi-Hib, con la determinación de subtipos de inmunoglobulinas, subclases de IgG y de la funcionalidad y avidéz de los anticuerpos.
- Complementar la caracterización con estudios de cinética de anticuerpos, que permitan definir a partir de qué dosis de Quimi-Hib se induce respuesta en los lactantes.
- Evaluar el efecto del uso de Qumi-Hib en circunstancias especiales para demostrar su utilidad en la inmunización, por ejemplo: de niños con leucemia e infecciones recurrentes, de lactantes prematuros y de individuos infectados con el VIH, entre otros.
- Proyectar estudios de vigilancia para la búsqueda de portadores nasofaríngeos de *H. influenzae* con el objetivo de conocer si se produce el reemplazamiento del tipo capsular b por otros, luego de la introducción de Quimi-Hib en el PNI.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adegbola R. Elimination of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease from the Gambia after the introduction of routine immunization with a Hib Conjugate Vaccine: A Prospective Study. *Lancet* 2005;366:144-150.
- Acharya D, Bhawe S, Joshi V, Baudekam A, Pandit A. *Haemophilus influenzae* type b in India: need and timing, immunogenicity and tolerance. *Indian Pediatric* 1997;34:9-15.
- Adams W, Deaver K, Cochi S. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA* 1993;269:221-226.
- Ambrosino DM, Glode MP, William CL, Siber GR. Antibody response of infants to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide combined with *Bordetella pertusis*. *J Infect Dis* 1985;151:1174.
- Ambrosino DM, Landesman SH, Gorham CC, Siber GR. Passive immunization against disease due to *Haemophilus influenzae* type b: concentrations of antibody to capsular polysaccharide in high-risk children. *J Infect Dis* 1986;153:1-7.
- Ambrosino DM, Schreiber JR, Daum RS, Siber GR. Efficacy of human hyperimmune globulin in prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease in infant rats. *Infect Immun* 1983;39:709-714.
- American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: update. *Pediatrics* 1989;84:386-387.
- Amir J, Scott M, Nahm M, Granoff M. Bactericidal and opsonic activity of IgG1 and IgG2 anticapsular antibodies to *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1990;162:163-171.
- Anderson P. Antibody response to *Haemophilus influenzae* type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of type b capsule with the nontoxic protein CRM197. *Infect Immun* 1983;39:233-238.
- Anderson P. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1984;149:1034.

- Anderson P, Insel RA, Porcelli S, Ward J. Immunochemical variables affecting radioantigen-binding assays of antibody to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide in children's sera. *J Infect Dis* 1987;156:582-590.
- Anderson P, Peter G, Johnston R, Wetterlow L, Smith D. Immunization of human with polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b. *J Clin Invest* 1972;51:39-44.
- Anderson P, Pichicheiro ME, Insel RA. Immunization of two-month old infants with protein-coupled oligosaccharides derived from the capsule of *Haemophilus influenzae* type b. *J Pediatr* 1985a;107:346-351.
- Anderson P, Pichichero ME, Insel RA, Farsad P, Santosham M. Capsular antigens non-covalently or covalently associated with protein as immunogens against *Haemophilus influenzae* type b: comparison in two-year-old children. *J Infect Dis* 1985b;1985:634-636.
- Anderson P, Smith D. Isolation of the capsular polysaccharide from culture supernatant of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 1977;15:472-477.
- Anderson R, May RM. Vaccination and herd immunity to infectious disease. *Nature* 1985;318:323-329.
- Anderson R. The concept of herd immunity and the design of community-based immunization programmes. *Vaccine* 1992;10:928-935.
- Aracil B, Campos J. Reciente incremento de los fallos vacunales por *Haemophilus influenzae* serotipo b. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:384-385.
- Asamblea Médica Internacional. Declaración de Helsinki, Finlandia 1964 (Asamblea General, Tokio 2004). Ethical principles for medical involving human subjects. *Bulletin of the World Health Organization* 2001;79:373-374.
- Avendano A, Ferreccio C, Lagos R. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine does not depress serologic responses to diphtheria, tetanus or pertussis antigens when coadministered in the same syringe with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine at two, four and six months of age. *Pediatr Infect Dis J* 1993;638-643.

- Baggett H, Hennessy T, Bulkow L, Romero-Steiner S, Hurlburt D, Holder P, Parkinson A, Singleton R, Levine O, Carlone G, Butler J. Immunologic Response to *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) Conjugate Vaccine and Risk Factors for Carriage among Hib Carriers and Noncarriers in Southwestern Alaska.. Clin Vaccine Immunol 2006;13(6): 620–626.
- Barington T, Gyhrs A, Kristtensen K, Heilmann C. Opposite effects of actively and passively acquired immunity to the carrier on responses of human infants to a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. Infect Immun 1994;62:9-14.
- Barra A, Bremard-Oury C, Bajart A, Griscelli C, Fritzell B. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and its tetanus toxoid conjugate in patients with recurrent infections or humoral immunodeficiency. Int J Clin Res 1992;21:231-234.
- Bennett J. Vaccines and Biologicals: *Haemophilus influenzae* type b (Hib) Meningitis in the Pre-vaccine Era: A Global Review of Incidence, Age Distributions, and Case-fatality Rates" (Ginebra: OMS, 2002). 20 de enero 2006. <http://www.who.int/vaccines-documents>.
- Bermúdez A, Reyes C, Guzmán F, Vanegas M, Rosas J, Amador R, Rodríguez R, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Synthetic vaccine update: applying lessons learned from recent SPf66 malarial vaccine physicochemical, structural and immunological characterization. Vaccine 2007;25(22):4487-501.
- Bijlmer HA, van Alphen L. A prospective, population-based study of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in the Gambia and the possible consequences. J Infect Dis 1992;165(Suppl1):S29.
- Black S, Shinefield H, Hiatt R, Fireman B. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine. Pediatr Infect Dis 1988;7:149-156.
- Black S, Shinefield H, Lampert D. Safety and immunogenicity of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in infancy. Pediatr Infect Dis 1991a;1092-96.
- Black S, Shinefield HR, Firemen B. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in a United States population of 61 080 children. Pediatr Infect Dis J 1991b;1097-104.

- Black S, Shinefield HR, Ray P. Safety of combined oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) and whole cell diphtheria-tetanus-toxoid-pertussis vaccine in infancy. *Pediatr Infect Dis* 1993;12:981-985.
- Booy R, Hodgson S, Carpenter L, Mayon-White R, Slack M, Macfarlane J, Haworth E, Kiddle M, Shribman S, Clair Roberts J, Moxon E. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine PRP-T. *Lancet* 1994;344:362-366.
- Booy R, Moxon ER, MacFarlane JA, Mayon-White RT, Slack MP. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in Oxford region. *Lancet* 1992a;340:847.
- Booy R, Taylos SA, Dobson SRM. Immunogenicity and safety of PRP-T conjugate vaccine given according to the British accelerated immunization schedule. *Arch Dis Child* 1992b;67:474-478.
- Bradshaw M, Scheerson R, Parke J. Bacterial antigens cross reactive with capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Lancet* 1971;1:1095-1098.
- Breukels MA, Jol-van der Zijde E, van Tol MJ, Rijkers GT. Concentration and avidity of anti-*Haemophilus influenzae* type b antibodies in serum samples obtained from patients for whom Hib vaccination failed. *Clin Infect Dis* 2002;34(2):191-197.
- Bulkow LR, Wainwright RB, Letson GW, Chang SJ, Ward JI. Comparative immunogenicity of four *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in Alaska Native infants. *Pediatr Infect Dis* 1993;12:484-492.
- Campbell H, Byass P, Ahonkhai V, Vella P, Greenwood B. Serologic responses to an *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein conjugate vaccine in very young Gambian infants. *Pediatrics* 1990;86:102-107.
- Carlone GM, Holder PF, Pais LB. ELISA procedure for quantization of total antibody against *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide in human serum. Protocol adopted in March 1991 in the Division of bacterial and

- Mycotic Diseases Branch, Immunology and Methods Development Laboratory at the Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en el LNRH-IPK.
- Carlsson R-M, Claesson BA, Iwarson S, Lagergard T, Kayhty H. Antibodies against *Haemophilus influenzae* type b and tetanus in infants after subcutaneous vaccination with PRP-T/diphtheria, or PRP-OMP/diphtheria-tetanus vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:27-33.
  - Castillo de Febres O, Decker MD, Estopinan M, Bordones G, Edwards KM. Enhanced antibody response in Venezuelan infants immunized with *Haemophilus influenzae* type b- tetanus toxoid conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:635-639.
  - CDC. Children's Vaccine Initiative. Vaccination news. *Newswatch* 1999;1:7-8.
  - CDC. *Haemophilus influenzae*. In: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*, 7th ed. 2003.
  - CDC. Licensure of diphtheria and tetanus toxoids and acellular pertussis adsorbed, inactivated poliovirus, and *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccine and guidance for use in infants and children. *MMWR* 2008a;57(39):1079-1080.
  - CDC. Hib vaccine shortage in US makes surveillance critical. *MMWR* 2008b;57:1252-1255.
  - Challacombe SJ, Rusell MW, Hawkes J. Passage of intact IgG from plasma to the oral cavity via cervical fluid. *Clin Exp Immunol* 1978;34:417-422.
  - Claesson BA, Schneerson R, Robbins JB. Protective levels of serum antibodies stimulated in infants by two injections of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate. *Clin Lab Observations* 1989;114:97-100.
  - Claesson BA, Trollfors B, Ekstrom-Jodal B. Incidence and prognosis of acute epiglottitis in children in a Swedish region. *Pediatr Infect Dis J* 1984;3:534-538.
  - Clemens C, Azevedo T, Homma A. Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4, and 6 months of age. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36(3):109-117.

- Clemens JD, Ferreccio C, Levine MM. Impact of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine on responses to concurrently administered diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. JAMA 1992;267:673-678.
- Clements D, Booy R, Dagan R. Comparison of the epidemiology and cost of *Haemophilus influenzae* type b disease in five western countries. Pediatr Infect Dis J 1993;12:362-367.
- Cochi S, Broome C. Vaccine prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease: past, present and future. Pediatr Infect Dis J 1986;5:12-19.
- Cochi S, Fleming D, Hull H, Preblud S, Orestein W. *Haemophilus influenzae* b polysaccharide vaccine. Am J Dis Child 1986;140:1226-1230.
- Comité Europeo de Normalización. Medicina de laboratorio. Requisitos para los laboratorios de medición de referencia. ISO 15195:2003
- Corn PG, Anders J, Takala AK, Kayhty H, Hoiseth SK. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified. J Infect Dis 1993;167:356-364.
- Coulchan JL. Epidemiology of *H. influenzae* type b disease among Navajo Indians. Public Health Rep 1984;99:404-409.
- Crisel RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b. J Biol Chem 1975;250:4926-4930.
- Cruces P, Donoso A, Camacho J, Llorente H. Infecciones invasoras por *Haemophilus influenzae* tipo b después de la incorporación de la vacuna conjugada al Programa Ampliado de Inmunizaciones en Chile. Rev Chil Infectol 2006;23(1):50-54.
- Dashefsky B, Wald E, Guerra N, Byers C. Safety, tolerability, and immunogenicity of concurrent administration of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate) with either measles-mumps-rubella vaccine or diphtheria-tetanus-pertussis and oral poliovirus vaccines in 14 to 23-month-old infants. Pediatrics 1990;85:682-689.
- Daum R, Siber G, Ballanco G, Sood S. Safety and immunogenicity of a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in a high risk American Indian population. J Infect Dis 1991;164:1154-1159.

- Daum R, Sood S, Ostholm M. Decline in serum antibody to the capsule of *Haemophilus influenzae* type b in the immediate post immunization period. J Pediatr 1989;114:742-747.
- Decker MD, Edwards KM, Bradley R, Palmer P. Comparative trial in infants of four conjugate *Hemophilus influenzae* type b vaccines. J Pediatr 1992;120:184-189.
- Decker MD, Edwards KM, Bradley R, Palmer P. Responses of children to booster immunization with their primary conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine or with polyribosylribitol phosphate conjugated with diphtheria toxoid. J Pediatr 1993;122:410-413.
- Deveikis A, Ward J, Sik Kim K. Functional activities of human antibody induced by the capsular polysaccharide of polysaccharide-conjugate vaccines against *Haemophilus influenzae* type b. Vaccine 1988;6:14-18.
- Dick W, Beurret M. Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens. In Cruse JM, Lewis RE (eds) Conjugate Vaccines. Basel, Karger: Contrib Microbiol Immunol 1989;pp 48-114.
- Dickinson F, Pérez A. Epidemiología de las meningoencefalitis bacterianas en Cuba, 2002. BOLIPK 2003;Vol.13,No.23.
- Dickinson F, Pérez A, Galindo M, Quintana I. Impact of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Cuba. Rev Panam Salud Pública 2001;10:169-173.
- Donnelly JJ, Deck RR, Liu MA. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* polysaccharide-*Neisseria meningitides* outer membrane protein complex conjugate vaccines. J Immunol 1990;145:3071-3079.
- Edwards KM, Decker MD, Palmer P, Porch CR, Sell SH, Wright PF. Lack of comparability between commonly used serological assays of immune response to *Haemophilus influenzae* vaccine. J Infect Dis 1987;155:283-291.
- Einhorn M, Weinberg G, Anderson E, Granoff P, Granoff D. Immunogenicity in infants of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide in a conjugate vaccine with *Neisseria meningitides* outer-membrane protein. Lancet 1986;2:299-302.

- Eskola J, Kayhty H, Peltola H. Antibody levels achieved in infants by course of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide/diphtheria toxoid conjugate vaccine. Lancet 1985;1:1184-1186.
- Eskola J, Kayhty H, Takala A. A randomized prospective field of a conjugate vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. New Engl J Med 1990;323:1381-1387.
- Eskola J, Peltola H, Kayhty H, Takala AK, Makela PH. Finnish efficacy trials with *Haemophilus influenzae* type b vaccines. J Infect Dis 1992;165 (Suppl 1):S137-S138.
- Eskola J, Ward J, Dagan R, Golblatt D, Zepp F, Siegrist C. Combined vaccination of *Haemophilus influenzae* type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis. Lancet 1999;354:2063-2068.
- Espinosa FR. Cinco razones para no utilizar la vacuna pentavalente en México. Rev Mex Pediatr 2001;68(3):112-119.
- Fernández J, Balter S, Feris J, Gómez E, Garib Z, Castellanos P, Sánchez J, Romero-Steiner S. Randomized trial of the immunogenicity of fractional dose regimens of PRP-T *Hemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. Am J Trop Hyg 2000;62(4):485-490.
- Fernández-Santana V, Cardoso F, Rodríguez A, Carmenate T, Peña L, Valdés Y, Hardy E, Mawas F, Heynngnezz L, Rodríguez MC, Figueroa I, Chang J, Toledo M, Musacchio A, Hernández I, Izquierdo M, Cosme K, Roy R, Verez-Bencomo V. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. Infect Immun 2004;72(12):7115-7123.
- Ferreccio C, Clemens J, Avendano A. The clinical and immunologic response of Chilean infants to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine co administered in the same syringe with diphtheria-tetanus toxoid-pertussis vaccine at two, four and six months of age. Pediatr Infect Dis 1991;10:764-771.
- Fortum HM. Hearing impairment after bacterial meningitis: a review. Arch Dis Child 1992;67:1128-1133.

- Frasch CE, Hiner EE, Gross TP. *Haemophilus influenzae* b disease after vaccination with *Haemophilus* b polysaccharide or conjugate vaccine. Am J Dis Child 1991;145:1379-1382.
- Fritzell B, Blotkin S. Efficacy and safety of a *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine. J Pediatr 1992;121:355-362.
- Gabastou JM, Agudelo CI, Brandileone MC, Castañeda E, Lemos AP, Di Fabio JL y Grupo de SIREVA II. Caracterización de aislamientos invasivos de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* en América Latina y el Caribe: SIREVA II, 2000-2005. Rev Panam Salud Publica 2008;24(1): 1-15.
- Gallo G, Ciofi degli Atti ML, Cerquetti M, Piovensan C, Tosí A, Salmaso S. Impacto f regional Hib vaccination programme in Italy. Vaccine 2002;20:993-995.
- Garcia A, Postma M, Galvez AM, Fariñas A, Sierra G. Costo-efectividad de la vacunación contra *Haemophilus influenzae* tipo b: una decisión de análisis para Cuba. VaccinMonitor 2002;11(3).
- Garner D, Weston V. Effectiveness of vaccination for *Haemophilus influenzae* type b. Lancet 2003; 361:395-396.
- Garpenholt O, Hugosson S, Fredlund H, Giesecke J, Olcen P. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* type b during the first six years of general vaccination of Swedish children. Acta Paediatr 2000;89(4):471-474.
- Gilsdorf JR, McDonnell M. Mucosal antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. Pediatr Res 1991;29:420-423.
- Goebel W, Avery OT. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate proteins. The synthesis of p-aminophenol  $\beta$ -glucoside, p-aminophenol  $\beta$ -galactoside and their coupling with serum globulin. J Exp Med 1929;50:521-533.
- Goepf J, Hohenboken M, Almeida-Hill J, Santosham M. Persistent urinary antigen excretion in infants vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugated with outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. Pediatr Infect Dis J 1992;11:2-5.

- Goicochea M, Fullana AM, Momparier P, Redondo MJ, Brines J, Bueno F. Enfermedad invasora por *Hemophilus influenzae* antes y después de la campaña de vacunación en la población infantil de la comunidad valenciana (1996-2000). Rev Espa Salud Publica 2002;76(3):310-324.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Immunoglobulins: structure and function. In: Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (eds.). Kuby immunology, 4th ed. W. H. Freeman and Company, New York, 2000, p.83-113.
- Gordon J. Human B lymphocytes mature. {Review}. Clin Exp Immunol 1991;84:373-375.
- Granoff DM, Anderson EL, Osterholm MT. Differences in the immunogenicity of three *Hemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in infants. J Pediatr 1992;121:187-194.
- Granoff DM, Bojes E, Munson R. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in adults. J Pediatr 1984;105:22-27.
- Granoff DM, Rathore MH, Holmes SJ, Granoff PD, Lucas AH. Effect of immunity to the carrier protein on antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Vaccine 1993a;11:S46-S51.
- Granoff DM, Shackelford P, Holmes S. Variable region expression in the antibody response of infants vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. J Clin Invest 1993b;91:788-796.
- Granoff DM, Suarez BK, Pandey JP, Shackelford PG. Genes associated with the G2m(23) immunoglobulin allotype regulate the IgG subclass responses to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine. J Infect Dis 1988;157:1142-1149.
- Greenberg DP, Vadheim CM, Bordenave N. Protective efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and conjugate vaccines in children 18 months of age and older. JAMA 1991;265:987-992.
- Greenwood BM, Hassan-King M, Whittle HC. Prevention of secondary cases of meningococcal disease in household contacts by vaccination. BMJ 1978;1:1317-1319.

- Griswold WR, Lucas AH, Bastian JF, Garcia G. Functional affinity of antibody to the *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide. J Infect Dis 1989;159:1083-1087.
- Harrison LH, Broome C, Hightower AW. A day care-based study of the efficacy of *Haemophilus* b polysaccharide vaccine. JAMA 1988;260:1413-1418.
- Harrison LH, Broome CV, Hightower AW. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine: an efficacy study. *Haemophilus* Vaccine Efficacy Study Group. Pediatrics 1989;84:255-261.
- Heath PT. *Haemophilus influenzae* type b vaccine-booster camping. BMJ 2003;326(7400):1158-1159.
- Heath PT, Booy R, Azzopardi H, Bowen-Morris J, Griggiths H. Antibody concentration and clinical protection after Hib conjugate vaccination in the United Kingdom. JAMA 2000;284:3234-2340.
- Herva E, Luotonen J, Timonen M, Sibakov M, Karma P, Makela PH. The effect of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine on nasopharyngeal and nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. Scand J Infect Dis 1980;12:97-100.
- Hetherington SV. The intrinsic affinity constant (K) of anticapsular antibody to oligosaccharides of *Haemophilus influenzae* type b. J Immunol 1988;140:3966-3970.
- Hetherington SV, Rutkowski AF. Antibody affinity in infants after immunization with conjugated capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b. J Infect Dis 1990;162:1185-1188.
- Holmes S, Murphy T, Anderson R. Immunogenicity of four *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in 17- to 19-month-old children. J Pediatr 1991;118:364-371.
- Hoogerhout P, Evenberg D, van Boeckel C, Poolman J, Beuvery E, van der Marel C, van Boom J. Synthesis of fragments of the capsular polysaccharide of the *Haemophilus influenzae* type b, comprising two or three repeating units. Tetrahedron Letters 1987;28:1553.

- Howard JG. T cell-independent responses to polysaccharides: their nature and delayed ontogeny. In Bell R, Torrigiani G (eds) Towards Better Carbohydrate Vaccines. Geneva: WHO 1987;pp 221-231.
- Insel R, Anderson P. Oligosaccharide-protein conjugate vaccine induce and prime for oligoclonal IgG antibody responses to *Haemophilus influenzae* b capsular polysaccharide in human infants. J Exp Med 1986;163:262-269.
- Istre GR. Day care attendance and other risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. Am J Epidemiol 1993;138:333–340.
- Istre GR, Connor JS, Broome CV. Risk factors for primary invasive *H. influenzae* disease: increased risk from day care attendance and school aged household members. J Pediatr 1985;106:190–195.
- Jelonek M, Chang S-J, Chiu C-Y, Park M, Nahm M, Ward J. Comparison of naturally acquired and vaccine-induced antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. Infect Immun 1993;61:5345-5350.
- Kauppi M, Saarinen L, Kayhty H. Anti-capsular polysaccharide antibodies reduce nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* type b in infant rats. J Infect Dis 1993;167:365-371.
- Kayhty H. Immunogenicity assay and surrogate markers to predict vaccine efficacy. In F Brown, S Plotkin (eds), Preclinical and Clinical Development of New Vaccines, Dev Biol Stand Basel, Karger 1998 Vol.95,p.175-180.
- Kayhty H, Eskola J, Peltola H. Immunogenicity in infants of a vaccine composed of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide mixed with DPT or conjugated to diphtheria toxoid. J Infect Dis 1987;155:100-106.
- Kayhty H, Eskola J, Peltola H. Antibody response to four *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Am J Dis Child 1991;145:223-227.
- 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 1):S165-S166.
- Kayhty H, Jousimies-Somer H, Peltola H, Makela PH. Antibody response to capsular polysaccharide of groups A and C *Neisseria meningitides* and

- Haemophilus influenzae* type b during bacteremic disease. J Infect Dis 1981;143:32-41.
- Kayhty H, Karanko V, Peltola H, Makela PH. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. Pediatrics 1984;74:857-865.
  - Kayhty H, Makela PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. J Infect Dis 1984;149:1034-1035.
  - Kayhty H, Makela O, Eskola J, Saarinen L, Seppala I. Isotype distribution and bactericidal activity of antibodies after immunization with *Haemophilus influenzae* type b vaccines at 18-24 months of age. J Infect Dis 1988; 158:973-982.
  - Kayhty H, Peltola H, Eskola J. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* oligosaccharide-protein and polysaccharide-protein conjugate vaccination of children at 4, 6, and 14 months of age,. Pediatrics 1989;84:995-999.
  - King SD, Ramlal A, Wynter H. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b vaccine in infants under one year of age. Lancet 1981;2:705-709.
  - Kovel A, Wald E, Guerra N, Serdy C, Meschievitz C. Safety and immunogenicity of acellular diphtheria-tetanus-pertussis and *Haemophilus* conjugate vaccine given in combination or at separate injection sites. J Pediatr 1992;120:84-87.
  - Kroll JS, Loynds BM, Moxon ER. The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon. Mol Microbiol 1991;5:1549-1560.
  - Kuo JS, Monji N, Schwalbe RS, McCoy DW. A radioactive antigen-binding assay for the measurement of antibody to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. J Immunol 1981;43:35-47.
  - Lagergard T, Branefors P. Nature of cross-reactivity between *Haemophilus influenzae* type a and b and *Streptococcus pneumoniae* types 6a and 6b. Acta Path Microb Scandin Sect C, Immunol 1983;91:371-376.

- Lagos R, Valenzuela MT, Levine O, Losonsky G, Erazo A, Wasserman S, Levine M. Economization of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b: a randomized trial of immunogenicity of fractional-dose and two-dose regimens. *The Lancet* 1998;351(16):1472-1476.
- Leino T, Auranen K, Makela PH, Kayhty H, Takala AK. Dynamics of natural immunity caused by sub clinical infections, case study on *Haemophilus influenzae* type b. *Epidemiol Infect* 2000;125(3):583-591.
- Leinonen M, Frasch CE. Class-specific antibody response to group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide: use of polylysine in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 1982;38:1203-1207.
- Lepow M, Samuelson J, Gordon L. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b-polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants 9 to 15 months of age. *J Pediatr* 1984;14:185-189.
- Levine OS, Ortiz E, Contreras R, Lagos R, Vial P, Misraji A, Ferreccio C, Espinoza C, Adlerstein L, Herrera P, Casar C. Cost-benefit analysis for the use of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol* 1993;137:1221-1228.
- Likitnukul S. Systemic *Haemophilus influenzae* disease in Thai children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994;25(4):672-677.
- Lolekha S, Hiranchote A, Simasathin S. Safety and immunogenicity of combined or associated administration of PRP-T vaccine with Diphtheria, Tetanus and Pertussis in Thai children. *J Tropical Pediatrics* 2001;47:24-29.
- López-Yap A, Abdelmour A, Lomonte B, Porrás O. Serum antibody response to polysaccharide in children with recurrent respiratory tract infections. *Clin Diag Lab Immunol* 2001;8(5):1012-1014.
- Losonsky GA. *H. influenzae* in the White Mountain Apaches: molecular epidemiology of a high risk population. *Pediatr Infect Dis J* 1984;3:539-547.
- Loughlin AM, Marcant CD, Lett S, Shapiro ED. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b vaccines in Massachusetts children 18-59 months of age. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:374-379.

- Lozano JM, Patarroyo ME. A rational strategy for a malarial vaccine development. *Microbes Infect* 2007;9(6):751-760.
- Luotonen J, Herva E, Karma P, Timonen M, Leinonen M, Makela PH. The bacteriology of acute otitis in children with special reference to *Streptococcus pneumoniae* a studied by bacteriological and antigen detection methods. *Scand J Infect Dis* 1981;13:177-183.
- Llanes R, Azahares E, Pérez M, Martínez A. Caracterización de cepas de *Haemophilus influenzae* mediante fermentación de azúcares. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49(1):38-42.
- Madore D, Anderson P, Baxter BD, Carlone GM, Edwards KM, Hamilton RG, Holder P, Kayhty H, Phipps DC, Peeters CC, Schneerson R, Siber GR, Ward JL, Frasc CE. Interlaboratory study evaluating quantization to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(1):84-88.
- Madore D, Johnson C, Phipps D, Popejoy L, Eby R, Smith D. Safety and immunologic response to *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-CRM197 conjugate vaccine in 1- to 6 month-old infants. *Pediatrics* 1990a;85:331-337.
- Madore D, Johnson C, Phipps C, Myers G, Eby R, Smith D. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-CRM197 conjugate vaccine in infants aged 15 to 23 months. *Pediatrics* 1990b;86:527-534.
- Madore DM, Quataert SA. Interlaboratory reproducibility of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for quantitation of antibodies for *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 1999;6:446.
- Makela O, Mattila P, Rautonen N, Seppala I, Eskola J, Kayhty H. Isotype concentrations of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide (Hib) in young adults immunized with the polysaccharide as such or conjugated to a protein (diphtheria toxoid). *J Immunol* 1987;139:1999-2004.
- Makela PH, Eskola J, Kayhty H, Takala AK. Vaccines against *Haemophilus influenzae* type b. In *Molecular and Clinical Aspects of Bacterial Vaccine*

- Development. Edited by DAA. Ala Alden and CE Hormaeche 1995 John Wiley and Sons Ltd;pp 42-91.
- Makela PH, Kayhty H, Leino T, Auranen K, Peltola H, Ekstrom N, eskola J. Long-term persistence of immunity after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine* 2003;22(2):287-292.
  - Makela PH, Peltola H, Kayhty H. Polysaccharide vaccines of group A *Neisseria meningitides* and *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1977;136:S43-S50.
  - Makela PH, Takala AK, Peltola H, Eskola J. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *J Infect Dis* 1992;165 (Suppl 1):S2-S6.
  - Mariani M, Luzzi E, Proietti, Mancianti S, Casini D, Constantino P, van Gagoldonk P, Berbers G. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the levels of serum antibody to *Haemophilus influenzae* type b. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(5):667-674.
  - Mark N, Huebner R, Mothupi R, Kaythy H, Mbelle N, Khomo E, Klugman K. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine diluted tenfold in diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine: a randomized trial. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21(2):138-141.
  - McVermont J, Andrews N, Slack MP, Ramsay ME. Risk of vaccine failure after *Haemophilus influenzae* type b combination vaccines with acellular pertussis. *Lancet* 2003;361:1521-1523.
  - McVermont J, Heath J. Re-enforcement of Hib immunization required. *Comm Dis Public Health* 2003;6:2.
  - Meissner HC, Pickering LK. Control of disease attributable to *Haemophilus influenzae* type b and the national immunization program. *Pediatrics*. 2002;110:820-3.
  - Millar VE, O'Brien KL, Watt JP, Lingappa J, Pallipamu, Rosentein N, Hu D, Reid R, Santosham M. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type a disease among Navajo and white mountain Apache children, 1988-2003. *Clin Infect Dis* 2005;40:823-830.

- Milstien JB, Gross T, Kuritsky J. Adverse reactions reported following receipt of *Haemophilus influenzae* type b vaccine: an analysis after 1 year of marketing. *Pediatrics* 1987;80:270-274.
- Ministerio de Salud Pública de Cuba. Dirección Nacional de Epidemiología. Programa de Vacunación contra *Haemophilus influenzae* en la República de Cuba. Ciudad de La Habana; 1998.
- Mohle-Boetani J, Ajello G, Breneman E. Carriage of *Haemophilus influenzae* type b in children after widespread vaccination with conjugate *Haemophilus influenzae*. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:589-593.
- Morgan BP, Walport MJ. Complement deficiency and disease. *Immunol Today* 1991;12:301-306.
- Mosier DE, Subbarao B. Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunology* 1982;3:217-222.
- Moxon ER, Anderson P, Smith DH, Adriazen B, Graham GG, Baker R. Antibody responses to a combination vaccine against *Haemophilus influenzae* type b, diphtheria, pertussis, and tetanus. *Bull WHO* 1975;52:87-90.
- Moxon ER, Rappuoli R. *Haemophilus influenzae* infections and whooping cough. In Moxon ER ed. *Modern vaccines – current practice and new approaches*. Edward Arnold, London, 1990;pp:100–113.
- Mowon ER, Smith AL, Averill DR, Smith DH. *Haemophilus influenzae* meningitis in infant rats after intranasal inoculation. *J Infect Dis* 1974;129:154-162.
- Munson RS, Kabeer MH, Lenoir AA, Granoff DM. Epidemiology and prospects for prevention of disease due to *Haemophilus influenzae* in developing countries. *Rev Infect Dis* 1989;11(Suppl 3):S588-S597.
- Murphy TF. *Haemophilus* infections. In: Braunwald E, et al. (eds) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15th ed. New York: McGraw-Hill, 2001;pp:939–342.
- Murphy TV, Pasor P, Medley F, Osterholm T, Granoff DM. Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *J Pediatr* 1993a;122:517-523.

- Murphy TF, With K, Pastor P. Declining incidence of *Haemophilus influenzae* type b disease since introduction of vaccination. JAMA 1993b;269:246-248.
- Myerowitz RL, Handzel ZT, Schneerson R, Robbins JB. Induction of *Haemophilus influenzae* type b capsular antibody in neonatal rabbits by gastrointestinal colonization with cross-reacting *Escherichia coli*. Infect Immun 1973;7:137-140.
- Nicol M, Huebner R, Mothupi R, Kaythy H, Mbelle N, Khomo E. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine diluted tenfold in diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine: a randomized trial. Pediatr Infect J 2002;21:138-141.
- Nilsson S, Bengtsson M, Norberg T. Solid-phase synthesis of a fragment of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b using the H-phosphonate intermediates. J Carbohydrate Chemistry 1991;10:1-22.
- OMS. Vaccines and Biologicals. 3 de noviembre 2005. <http://www.who.int/vaccines>.
- Otero MR, Piqueras A, Ferre B, Pérez-Tamarit D, Asensi F, Durantez M. Infecciones graves de piel y tejidos blandos por *Haemophilus influenzae* tipo b a lo largo de 30 años. Anales Pediatría 2005;63(1):29-33.
- Parke J, Schneerson R, Reimer C. Clinical and immunologic responses to *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccines in infants injected at 3, 5, 7, and 18 months of age. J Pediatr 1991;118:184-190.
- Patarroyo M. Conferencia magistral. Más allá de las moléculas: el diseño racional de las vacunas. Facultad de Medicina UNAM. Gaceta 25 marzo 2006. [http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/gaceta/mar252k6/g\\_campo.html](http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/gaceta/mar252k6/g_campo.html).
- Peeters CC, Evenberg D, Hoogechout P, Kaythy H, Saarinen L, van Boeckel CA, van der Marel GA, van Boom JH, and Poolman JT. Synthetic trimer and tetramer of 3-B-D-ribose-(1-1)-D-ribitol-phosphate conjugated to protein induce antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide in mice and monkeys. Infect Immun 1992;60:1826-1833.
- Peltola H. Need of *Haemophilus influenzae* type b vaccination in Asia as evidenced by epidemiology of bacterial meningitis. Pediatr Infect Dis J 1999;17(Suppl9):S148-S151.

- Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev 2000;13:302–317.
- Peltola H, Aavitsland P, Hansen K, Jondottir K, Nokleby H, Romanus V. Perspective: a five-country analysis of the impact of four different *Haemophilus influenzae* type b conjugates and vaccination strategies in Scandinavia. J Infect Dis 1999;179:223-229.
- Peltola H, Eskola J, Kayhty H, Takala AK, Makela PM. Clinical comparison of the *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid vs the oligosaccharide CRM197 protein vaccines in infancy. Arch Pediatr Adolesc Med 1994;148:620-625.
- Peltola H, Kayhty H, Sinoven A. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: A double-blind field trial of 100 000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. Pediatrics 1977;60:730-737.
- Perilla MJ, Ajello G, Bopp C, Elliott J, Facklam R, Knapp J, Propovic T, Wells J, Dowells S. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. 2003. WHO/CDC/CSR/RMP/2003.6. Atlanta.
- Phipps DC, West J, Eby R, Madore DV, Quataert SA. An ELISA employing a *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-human serum albumin conjugate correlates with the radioantigen binding assay. J Immunol Methods 1990;135:121-128.
- Pickering LK. Immunization against *Haemophilus influenzae* type b. Infectious Diseases Newsletter 1988;7:84-85.
- Pincus DJ, Morrison D, Andrews C, Lawrence E, Sell SH, Wright PF. Age-related response to two *Haemophilus influenzae* type b vaccines. J Pediatr 1982;100:197-201.

- Plikaytis B, Holder P, Carlone G. Program ELISA for Windows User's Manual, Version 1.00. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1996.
- Puliyeel J, Agarwal K, Abass F. Natural immunity to *Haemophilus influenzae* type b in infancy in Indian children. *Vaccine* 2001;19:4592-4594.
- Pushparajah K, Ramnarayan P, Maniyar A, Paget R, Britto J. Continued threat of *Haemophilus influenzae* type b disease in the UK. *Lancet* 2003;361:390.
- Quirós A, Bachiller P, Tellerín J, Nieto A. Anticuerpos séricos contra *Haemophilus influenzae* en niños de la provincia de Valladolid. *Anales Españoles de Pediatría* 1996;45(5):487-492.
- Reid R, Santosham M, Croll J, Thompson C, Newcomer W, Siber G. Antibody response of Navajo children primed with PRP-OMP vaccine to booster doses of PRP-OMP vs. HbOC vaccine. *Pediatr Infect Dis* 1993;12:812-815.
- Rijkers GT, Roord JJ, Struyve MC, Poolman JT, Zegers B. Development of IgG antipolyribosylribitolphosphate antibodies in the course of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in infants below 2 years of age. In: Dukor P, Hanson LA, Kallos P, Shakib F, Trnka Z, Waksman BH (eds) Monograph in Allergy. Basel: Karger, 1988;pp 282-288.
- Rizzo M. Combined glycoconjugate vaccine can be used to boost protection in toddlers. *Arch Dis Child* 2008;93:963-970.
- Robin E, Mbelle N, Forrest B, Madore D, Klugman K. Long-term antibody levels and booster response in South African children immunized with nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine* 2004;22:2696-2700.
- Robbins JB, Parke JC, Schneerson R, Whisnant JK. Quantitative measurement of "natural" and immunization-induced *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies. *Pediatrics* 1973;7:103-110.
- Rodrigues LP, Schneerson R, Robbins JB. Immunity to *Haemophilus influenzae* type b. The isolation, and some physicochemical, serological and biological properties of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Immunol* 1971;107:1071-1080.

- Romanin V, Chiavetta L, Salvay MC, Chiolo M, Regueira M, Barrios A, Califano G, García S, Gentile A. Vacuna anti-*Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) en el calendario nacional de Argentina: portación nasofaríngea de Hb tras 8 años de su introducción. Arch Argent Pediatr 2007;105(6):20-32.
- Rothstein E, Madore D, Giron J. Comparison of antigenuria after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Pediatr Infect Dis J 1991a;10:311-314.
- Rothstein E, Madore D, Long S. Antibody persistence four years after primary immunization of infants and toddlers with *Haemophilus influenzae* type b CRM197 conjugate vaccine. Clin Lab Observations 1991b;119:656-657.
- Ruben A, Condon R. Hib meningitis immediately after vaccination. Med J Aust 1993;159:831-832.
- Ruuskanen O, Heikkinen T. Otitis media: etiology and diagnosis. Pediatr Infect Dis J 1994;13:S23-S26.
- Santos J, Martin A, De Leon T, Rivera L, Gaitan M, Del Río C, Oselka G, Cervantes Y, Rubio P, Clemens S, De Mendonca J. DTPw-HB and Hib primary and booster vaccination: combined versus separate administration to Latin American children. Vaccine 2002;20(13):1887-1893.
- Santosham M, Reid R, Ambrosino D. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b infections in high-risk infants treated with bacterial polysaccharide immune globulin. New Engl Med 1987;317:923-929.
- Santosham M, Wolff M, Reid R. The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein complex. New Engl J Med 1991;324:1767-1772.
- Sarvas H, Kurikka S, Seppala IJT, Makela PH, Makela O. Maternal antibodies partly inhibit an active antibody response to routine tetanus toxoid immunization in infants. J Infect Dis 1992;165:977-979.
- Sarvas H, Rautonen N, Kayhty H, Kallio M, Makela O. Effect of Gm allotypes on IgG2 antibody response and IgG2 concentrations in children and adults. Int Immunol 1990;2:317-322.

- Sarvas H, Seppala I, Kurikka S, Sieberg R, Makela O. Half-life of the maternal IgG1 allotype in infants. *J Clin Microbiol* 1993;13:145-151.
- Schneerson R, Robbins JB. Induction of serum *Haemophilus influenzae* type b capsular antibodies in adult volunteers fed cross-reacting *Escherichia coli* 075:K100:H5. *New Engl J Med* 1975;292:1093-1096.
- Schneerson R, Robbins JB, Chu C. Serum antibody responses of juvenile and infant rhesus monkeys injected with *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcus type 6a capsular polysaccharide-protein conjugates. *Infect Immun* 1984;45:582-591.
- Schneerson R, Robbins JB, Egan W. Bacterial capsular polysaccharide conjugates. In Robbins J, Hill J, Sadoff J (eds) *Seminars in Infectious Disease: Bacterial Vaccines*. New York: Thieme-Stratton, 1982;pp 311-321.
- Schneerson R, Robbins JB, Parke J, Bell C, Schlesselman J, Sutton A, Wang Z, Schiffman G, Karpas A, Shiloach J. Quantitative and qualitative analysis 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.
- Schneerson R, Rodrigues LP, Parke JC, Robbins M. Immunity to disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. Specific and some biologic characteristics of “natural”, infection acquired , and immunization induced antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Immunology* 1971;108:1551-1562.
- Schlesinger Y, Granoff D. The Vaccine Study Group. Avidity and bactericidal activity of antibody elicited by different *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *JAMA* 1992;267:1489-1494.
- Schneider L, Insel R, Howie G, Madore D, Geha R. Response to a *Haemophilus influenzae* type b diphtheria CRM197 conjugate vaccine in children with a defect of antibody production to *Hemophilus influenzae* type b polysaccharide. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:948-953.

- Schreiber JR, Barrus V, Cates KL, Siber GR. Functional characterization of human IgG, IgM and IgA antibody directed to the capsule of *Haemophilus influenzae* type b. J Infect Dis 1986;153:8-16.
- Seppala IT, Rautonen N, Sarnesto A, Mattila PS, Makela O. The percentages of six immunoglobulin isotypes in human antibodies to tetanus toxoid: standardization of isotype-specific second antibodies in solid-phase assay. Eur J Immunol 1984;14:868-875.
- Shackelford PG, Granoff DM, Nelson SJ, Scott MG, Smith DS, Nahm MH. Subclass distribution of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. J Immunol 1987;138:587-592.
- Shann F. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. Pediatr Infect Dis J 1986;5:247-252.
- Shapiro E, Capobianco L, Berg A, Zitt M. The immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-*Neisseria meningitidis* group b outer membrane protein complex vaccine in infants and young children. J Infect Dis 1989;160:1064-1067.
- Shapiro E, Murphy T, Wald E, Brady C. The protective efficacy of *Haemophilus* b polysaccharide vaccine. JAMA 1988;260:1419-1422.
- Sorva T, Tolppanen EM, Perheentupa J. Variation of growth in length and weight of children. Acta Paediatr Scand 1990;79:490-497.
- Stein KE. Thymus-independent and thymus-dependent response to polysaccharide antigens. J Infect Dis 1992;165(Suppl 1):S49-S52.
- Steinhoff M y Goldblatt D. Conjugated Hib vaccines. Lancet 2003;361:360-361.
- Steinhoff M, Auuerbach B, Nelson K. Antibody response to *Hemophilus influenzae* type b vaccines in men with human immunodeficiency virus infection. New Engl J Med 1991;325:1837-1842.
- Steward MM, Lew AM. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. J Immunol Methods 1985;78:173-190.
- Sutton A, Vann WF, Karpas AB, Stein KE, Schneerson R. An avidin-biotin based ELISA for quantitation of antibody to bacterial polysaccharides. J Immunol Methods 1985;82:215-224.

- Svenson S, Lindberg AA. Immunochemistry of *Salmonella* O-antigen: preparation of an octasaccharide-bovine serum albumin immunogen representative of *Salmonella* serogroup B O-antigen and characterization of the antibody response. *J Immunol* 1978;120:175-177.
- Takala AK. Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:189-195.
- Takala AK, Eskola J, Leinonen M. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1991;164:982-986.
- Takala AK, Eskola J, Peltola H, Makela PH. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease among children in Finland before vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis* 1989;8:297-302.
- Takala AK, Eskola J, van Alphen L. Spectrum of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in adults. *Arch Intern Med* 1990;150:2573-2576.
- Takala AK, Peltola H, Eskola J. Disappearance of epiglottitis during large-scale vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine among children in Finland. *Laryngoscope* 1994a;104:731-735.
- Takala AK, Santosham S, Almeida-Hill BS. Vaccination with *Haemophilus influenzae* type b meningococcal protein conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b among American Indian children. *Pediatr Infect Dis J* 1994b;12:593-599.
- Tamargo I, Toraño G, Fuentes K, Rodríguez O. *Haemophilus influenzae* circulantes en Cuba. Caracterización de cepas aisladas de meningitis. *Rev Cub Medicina Trop* 1999;51:204-205.
- Tamargo I, Fuentes K, Llop A, Oteo J, Campos J. High levels of multiple antibiotic resistance among 938 *Haemophilus influenzae* type b meningitis isolates from Cuba (1990-2002). *J Antimicrob Chemother* 2003;52(4):695-698.

- Tastan Y, Alikasifoglu M, Ilter O, Erginoz, Arvas A, Yuksal D, Turkcu F, Badur S. Natural Immunity to *Haemophilus influenzae* type b among healthy children in Istanbul, Turkey. *Indian Pediatrics* 2000;37:414-417.
- Taylor HG, Mills EL, Ciampi A. The sequel of *Haemophilus influenzae* meningitis in school-age children. *New Engl Med* 1990;323:1657-1663.
- Trollfors B, Lagergard T, Claesson BA, Thornberg E, Martinell J, Schneerson R. Characterization of the serum antibody response to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b in children with invasive infections. *J Infect Dis* 1992;166:1335-1339.
- Trotter CL, McVermont J, Andrews NJ, Burrage M, Ramsay ME. Antibody to *Haemophilus influenzae* type b after routine and match-up vaccination. *Lancet* 2003;361:1523-1524.
- Tsui Fai-P, Eagan W, Summers MF, Byrd AR, Schneerson R, Robbins JB. Determination of the structure of *Escherichia coli* K.100 capsular polysaccharide, cross-reactive with the capsula from type b *Haemophilus influenzae*. In *Carbohydrate Research*. Amsterdam: Elsevier, 1988:pp 65-74.
- Turner M. Antibodies and their receptors. In: Roitt I, Brostoff J, Male D. (eds). *Immunology*, 4th ed. Mosby, Barcelona, 1996, p.4.1-4.12.
- Turner R, Cimino C, Sullivan B. Prospective comparison of the immune response of infants to three *Haemophilus influenzae* type b vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:109-112.
- Xin-Xing G, Rudy S, Chu Ch, McCullagh L, Kim H, Chen J, Li J, Robbins J, van Waes C, Battey J. Phase I study of a lipooligosaccharide conjugate vaccine against nontypable *Haemophilus influenzae*. *Vaccine* 2003;21:2107-2114.
- US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. *Bioanalytical Methods Validation for Human Studies*. 1998.
- Vadheim CM. Risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* type b in Los Angeles County children 18-60 months of age. *Am J Epidemiol* 1992;136:221-235.

- Vadheim CM, Greeberg DP, Marcy SM, Froeschile J, Ward JI. Safety evaluation of PRP-D *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in children immunized at 18 months of age and older: follow-up study of 30 000 children. *Pediatr Infect Dis* 1990;9:555-561.
- Vadheim CM, Greenberg DP, Partridge S. Effectiveness and safety of a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (PRP-T) in young infants. *Pediatrics* 1993;92:272-279.
- van Alphen L, van der Berghe N, Geelen-van del Broek L. Interaction of *Haemophilus influenzae* with human erythrocytes and oropharyngeal epithelial cells is mediated by a common fimbrial epitope. *Infect Immun* 1988;56:1800-1806.
- Verez-Bencomo V and Roy R. August 1999. Oligosaccharides derived from ribose-ribitol-phosphate, and vaccines containing them. Patent Community Treaty WO 01/16146.U.S. patent 6,765,091.
- Ward JL, Brenneman G, Lepow M, Lum M, Burkhart K, Chiu C. *Haemophilus influenzae* type b anticapsular antibody responses to PRP-pertussis and PRP-D vaccines in Alaska Native infants. *J Infect Dis* 1988a;158:719-723.
- Ward JL, Brenneman G, Letson GW, Heyward WL. Limited efficacy of a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Alaska Native infants. The Alaska *H. influenzae* vaccine Study Group. *New Engl J Med* 1990;323:1393-1401.
- Ward JL, Greenberg DP, Anderson PW. Variable quantitation of *Haemophilus influenzae* type b anticapsular antibody by radioantigen binding assay. *J Clin Microbiol* 1988b;26:72-78.
- Ward JL, Lum MK, Hall DB. Invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in Alaska: background epidemiology for a vaccine efficacy trial. *J Infect Dis* 1986;153:17-26.
- Ward JL, Margolis HS, Lum MK, Fraser DW, Bender TR, Anderson P. *Haemophilus influenzae* disease in Alaskan Eskimos: characteristics of a population with an unusual incidence of invasive disease. *Lancet* 1981;1:1281-1284.

- Washburn L, O'Shea M, Gillis D, Block S, Abramson S. Response to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in chronically ill premature infants. *J Pediatr* 1993;123:791-794.
- Watenberg N, Dagan R, Arbelli Y. Safety and immunogenicity of *Haemophilus* type b-tetanus protein conjugate vaccine, mixed in the same syringe with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in young infants. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:758-761.
- Wattanasri S. Practical considerations for *Haemophilus influenzae* type b immunization programs. *JAMA (Southeast Asia Supplement)* 1993;10:24–27.
- Wegner J, Heath P. Epidemiological impact of conjugated vaccines on invasive disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. In *Newer Generation Vaccines*. Eds: Levine M, Woodrow G, Kape J. Published by Marcel Dekker inc.; 1999 pp: 489-502.
- Wegner JD, Pierce R, Deaver KA, Plikaytis BD, Facklam RR, Broome CV. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in US children aged 18-19 months. *Lancet* 1991;338:395-398.
- Weiler PF, Smith DH, Anderson P. Role of immunity in the clearance of bacteremia due to *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1976;136:427-436.
- Weinberg GA, Ghafoor A, Ishaq Z. Clonal analysis of *Haemophilus influenzae* isolated from children from Pakistan with lower respiratory tract infections. *J Infect Dis* 1989;160:634-643.
- WHO. Global Programme for Vaccines and Immunization. The WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccines. *WER* 1998;73:64–71.
- WHO. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series. No. 897. 2000.
- Yash P. Herd immunity and herd protection. *Vaccine* 2004;22:301-302.
- Yogev R, Arditi M, Chadwick EG, Amer MD, Sroka PA. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate): immunogenicity and safety at various doses. *Pediatrics* 1990;85:690-693.

- Zwahlen A, Kroll JS, Rubin LG, Moxon ER. The molecular basis of pathogenicity in *Haemophilus influenzae*: comparative virulence of genetically-related capsular transformants and correlation with changes at the capsulation locus cap. *Microb Pathog* 1989;7:225-235.

**Producción científica de la autora, relacionada con el tema de la tesis**

- **Toraño G.** Toledo ME, Baly A, Fernández Santana V, Rodríguez F, Alvarez Y, Serrano T, Musachio A, Hernández I, Hardy E, Rodríguez A, Hernández H, Aguilar A, Sánchez M, Muzio V, Dfana J, Rodríguez MC, Heynngnezz L, Verez-Bencomo V. Phase I Clinical Evaluation of a Synthetic Oligosaccharide-Protein Conjugate Vaccine against *Haemophilus influenzae* type b in Human Adults Volunteers. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(9):1052-1056.
- **Toraño G.** Hernández I, Baly A, Toledo ME. Validación de un ensayo tipo ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. *Rev Cub Medicina Trop* 2005;57(3).
- **Toraño G.** Hernández I, Toledo ME, Baly A, Tamargo I, Carmenate A. Naturally Acquired Immunity to *Haemophilus influenzae* type b in Healthy Cuban children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(7):687-689.
- Verez V, Fernández V, Hardy E, Toledo ME, Rodríguez MC, Heynngnezz L, Rodríguez A, Baly A, Herrera L, Izquierdo M, Villar A, Valdés Y, Cosme K, Deler M, Montane M, García E, Ramos A, Aguilar A, Medina E, **Toraño G.** Sosa I, Hernández I, Martínez R, Muzachio A, Carmenates A, Costa L, Cardoso F, Campa C, Díaz M, Roy R. A Synthetic Conjugate Polysaccharide Vaccine Against *Haemophilus influenzae* type b. *Science* 2004;35:522-525.
- **Toraño G.** Hernández I, Toledo ME, Baly A, Tamargo I. Natural Immunity to *Haemophilus influenzae* Type b in healthy Cuban children. *Int J Infect Dis* 2004;8(Supp. 1):S190.
- Baly A, Toledo ME, **Toraño G.** Hernández I, Carmenate A, Fernández V, Martínez R, Alemany N, Verez V, Diaz M, Aguilar A, Rodríguez A, Hardy E, Mizio V. Immunogenicity and Safety of the Cuban Vaccine Candidate against

*Haemophilus influenzae* Type b Infection. *Int J Infect Dis* 2004;8(Supp. 1):S19-S20.

- Tamargo I, Fuentes K, **Toraño G**, Quiñones D, Hernández I, Battle MC, Pérez M, Romero J. Nasopharyngeal Carriage and Vaccination of *Haemophilus influenzae* in Healthy Cuban Children. *Int J Infect Dis* 2004;8(Supp.1):S72.
- Registro Sanitario de Medicamentos de la Republica de Cuba para el producto Quimi-Hib (vacuna cubana contra *Haemophilus influenzae* tipo b), que permite su comercialización en Cuba y en otros países. No. Certificado de Inscripción: B-03-150-J07, expedido por el Centro para el Control Estatal de Calidad de los Medicamentos el 5 de noviembre 2003. *Coautora*

### Presentaciones en eventos científicos, relacionadas con el tema

11th International Congress on Infectious Diseases,. Cancún, Mexico, 2004

- Baly A, Toledo ME, **Toraño G**, Hernández I, Carmenate A, Fernández V, Martínez R, Alemany N, Vérez V, Diaz M, Aguilar A, Rodríguez A, Hardy E, Mizio V. Immunogenicity and Safety of the Cuban Vaccine Candidate against *Haemophilus influenzae* type b Infection.
- **Toraño G**, Hernández I, Toledo ME, Baly A, Tamargo I. Natural Immunity to *Haemophilus influenzae* type b in healthy Cuban children.
- Tamargo I, Fuentes K, **Toraño G**, Quiñones D, Hernández I, Battle MC, Pérez M, Romero J. Nasopharyngeal Carriage and Vaccination of *Haemophilus influenzae* in Healthy Cuban Children.

Bioteconología. Habana, 2003

- Veloso R, Fernández V, Cardoso F, Beccati D, **Toraño G**, Toledo M, Kaming H, Vérez V. Characterization of the immune response elicited by QUIMI-HIB in children using surface plasmon resonance.

### Resultados científicos relacionados con el tema

- Resultado Relevante CIGB (2002): Avances en el desarrollo de una vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b. **Autora**
- Resultado Relevante IPK (2003): Evaluación Clínica de un candidato vacunal cubano contra *Haemophilus influenzae* tipo b. **Autora**
- Resultado Relevante IPK (2005): Inmunidad naturalmente adquirida para *Haemophilus influenzae* tipo b entre niños cubanos. **Autora**
- Logro de la ACC y Premio Especial del CITMA (2004): Vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b. Desarrollo de la primera vacuna contra un antígeno sintético. **Autora**
- Logro de la ACC (2006): Demostración de la compatibilidad físico-química e inmunológica de 5 antígenos vacunales administrados en una misma inyección, que permitió la obtención de la vacuna Pentavalente cubana. **Colaboradora**

### Premios

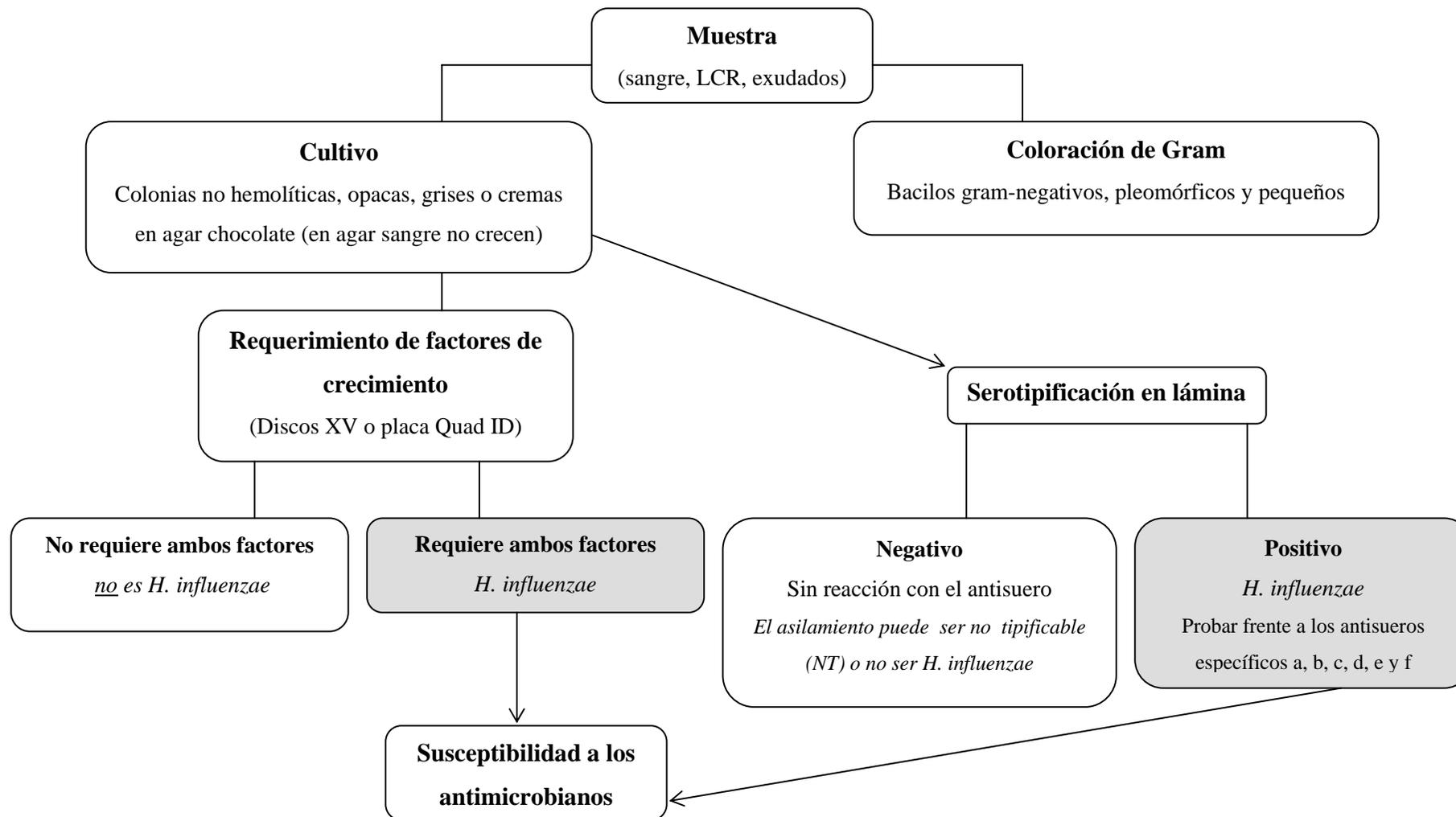
- Premio del Forum Provincial de Ciencia y Técnica (2004) y del XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica (2007): Vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b. Desarrollo de la primera vacuna contra un antígeno sintético. **Autora**
- Distinción Especial en el XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica (2007): Desarrollo, registro y aplicación de la vacuna Pentavalente cubana. **Colaboradora**
- Premio al “Mejor Artículo Científico publicado” otorgado por la Universidad de La Habana, por el trabajo: A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* tipo b (2005). **Coautora**
- Premio otorgado por el Museo de Técnica de San José, California, EUA, al colectivo de autores que desarrolló la vacuna contra *Haemophilus influenzae*

tipo b, por síntesis química, por haber logrado un avance tecnológico que beneficiará a la humanidad de forma significativa (2005).

- Premio al “Mejor resultado de mayor trascendencia y originalidad”, otorgado por la Universidad de La Habana (2004) al trabajo: “Desarrollo de la primera vacuna humana con un antígeno sintético. **Coautora**
- Premio del Ministerio de Educación Superior al trabajo (2004): “Desarrollo de la primera vacuna humana con un antígeno sintético. **Coautora**

## Anexo 1

### Diagrama de flujo para la identificación y confirmación de *H. influenzae*



## Anexo 2

### Protocolo del ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b en suero humano

#### A- Reactivos

- Antígeno HbOHA (NIBSC), polisacárido capsular de Hib conjugado a albúmina de suero humano
- Suero de referencia internacional As Hib Lote 1983 (FDA)  
(IgG = 60.9 µg/mL, IgM = 3.5 µg/mL, IgA = 5.6 µg/mL)
- Conjugado anti-IgG humana obtenida en conejo y conjugada con peroxidasa (DAKO)
- Sustrato: o-fenildiamina (OFD)
- Suero Fetal Bovino (SFB)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-97%
- Tween 20
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%
- NaCl libre de Ca y Mg
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- KCl
- Ácido Cítrico

#### B- Equipos y materiales más importantes

- Computadora con programa ELISA para Windows instalado
- Agitador (Vortex)
- Lector ELISA (filtro de 490 nm) (Reader 230 S, Organon Teknika).
- Lavador de placas de ELISA
- Equipo medidor de pH
- Balanza
- Pipetas multicanal y juego de micropipetas

## Anexo 2 (Continuación)

- Puntas azules y amarillas
- Placas ELISA (TermoLabsystems)
- Placas de dilución de 96 pocillos con capacidad para un volumen de 1.2 mL/pocillo
- Tubos de cristal (100x13) para realizar pre-diluciones
- Volumétricos de 1 L
- Erlenmeyers de 500 mL y 1 L
- Reservorios plásticos estériles (50-100 mL)

### C- Preparación de reactivos

1. Antígeno: Cada vial de Ag HbOHA liofilizado (1 mg) deberá ser almacenado a 4 °C hasta el momento de su reconstitución, en el que se adiciona 1 mL de agua destilada estéril utilizando una jeringuilla. Mezclar bien utilizando un agitador y dejar reposar por 30 min a la temperatura del laboratorio para asegurar la completa disolución. Preparar alícuotas de 50 µL para almacenar a -20 °C. Aquellas que se utilizarán de inmediato podrán ser puestas a 4 °C (máximo de 2 semanas). Evitar los ciclos de congelación y descongelación (son sólo permisibles hasta 4 ciclos).
2. Preparación de 500 mL de SFB al 10%: Por largos períodos deberá ser almacenado a -20 °C hasta el momento de su utilización.
  - Remover un frasco y dejar descongelando durante la noche a 2-8 °C.
  - Colocar 50 mL de SFB en un frasco estéril y completar a 500 mL añadiendo tampón fosfato salina (TFS) 1X estéril (preparado a partir del buffer TFS 10X)
  - Almacenar a 2-8 °C hasta su uso (nunca por más de una semana).
  - Verificar si hay turbidez, sedimento u otra señal de contaminación, antes de usar.

## Anexo 2 (Continuación)

### 3. TFS 10X:

- Pesar las cantidades indicadas de las siguientes sales:

<u>Sales</u>	<u>Cantidad</u>
NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.91g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.97 g
KCl	1.6 g

- Disolver en 800 mL de agua destilada y completar a 1000 mL en un volumétrico.
- Tomar 1 mL, llevar a 10 mL con agua destilada y comprobar pH. Desechar si no se encuentra entre 7.2 y 7.4 y repetir el procedimiento hasta este paso.
- Conservar a temperatura de laboratorio hasta por 3 meses. Añadir para su mejor preservación 2 mg de NaN<sub>3</sub>.

### 4. TFS 1X + Tween 20 (Tampón de lavado):

- Tomar 100 mL del TFS 10X y adicionar 900 mL de agua destilada.
- Comprobar pH (7.2-7.4).
- Añadir 2,5 mL de Tween 20 y mezclar bien.
- Conservar a temperatura de laboratorio hasta su uso.

### 5. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M: Para preparar 1L, añada 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (95-97%) a 900 mL agua estilada.

### 6. Sustrato: El procedimiento que a continuación se describe permite preparar una cantidad de sustrato suficiente para una placa.

- Pesar 6 mg de OFD y disolver en 15 mL de tampón Citrato.
- Adicionar 6 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% justamente en el momento en que corresponde añadir el sustrato a las placas de ELISA.

## Anexo 2 (Continuación)

### 7. Tampón Citrato:

- Solución A: Preparar Ácido Cítrico 0.1 M.
- Solución B:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.02 M

Mezclar 49 mL de A con 51 mL de B. Comprobar que el pH sea igual a 5.

- ### 8. Conjugado: Se prepara utilizando como diluyente SFB al 10%. Atendiendo a las recomendaciones del fabricante y a determinaciones realizadas en el laboratorio se define la dilución óptima del conjugado.

*Ejemplo:* Si se determina que la dilución óptima del conjugado es 1/5000, a 50 mL de SFB 10% se añaden 10 $\mu\text{L}$  de anti-IgG humanan conjugada con peroxidasa.

## **D- Preparación de las muestras de suero**

Las diluciones de los sueros deberán ser preparadas el mismo día en que se realizará el ensayo. Los sueros son añadidos a las placas de acuerdo a la disposición planteada en el esquema de trabajo de una placa ELISA que se muestra más adelante.

- Pre-dilución del suero Hib 1983 (1/250): Poner en un tubo de cristal 1 245  $\mu\text{L}$  de SFB 10% y añadir 5  $\mu\text{L}$  del suero de referencia.
- Pre-dilución del suero Control +: Poner en un tubo de cristal 1 245  $\mu\text{L}$  de SFB 10% y añadir 5  $\mu\text{L}$  del suero control positivo.
- A las columnas 5 y 9 de las placas de dilución añadir 500  $\mu\text{L}$  de SFB 10%, al resto añadir sólo 400  $\mu\text{L}$ .
- A los pocillos A1 y B1 añadir 100  $\mu\text{L}$  de la pre-dilución 1/250 de Hib 1983 para de esta forma lograr una dilución 1/ 1 250.
- A los pocillos C1 y D1 añadir 100  $\mu\text{L}$  de la pre-dilución 1/250 del Control + para de esta forma lograr una dilución 1/ 1 250.

## Anexo 2 (Continuación)

### Esquema de trabajo en una placa de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Hib 1983 <sup>a</sup> 1/1250	1/6250	1/31250	1/156250	Suero 1	1	1	1	Suero 5	5	5	5
<b>B</b>	Hib 1983 1/1250	1/6250	1/31250	1/156250	Suero 1	1	1	1	Suero 5	5	5	5
<b>C</b>	Control + 1/1250	1/6250	1/31250	1/156250	Suero 2	2	2	2	Suero 6	6	6	6
<b>D</b>	1/1250	1/6250	1/31250	1/156250	Suero 2	2	2	2	Suero 6	6	6	6
<b>E</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Suero 3	3	3	3	Suero 7	7	7	7
<b>F</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Suero 3	3	3	3	Suero 7	7	7	7
<b>G</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Suero 4	4	4	4	Suero 8	8	8	8
<b>H</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Suero 4	4	4	4	Suero 8	8	8	8

<sup>a</sup> Hib 1983 - Suero de referencia a partir del cual se construye la curva patrón.

Control + - Suero empleado como control positivo, obtenido a partir de un adulto vacunado

Sueros 1, 2, 3, y 4 - Sueros problemas en los que se quiere determinar la concentración de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib.

## Anexo 2 (Continuación)

- A los pocillos A5 y B5 añadir el suero problema No.1, a los pocillos C5 y D5 añadir el suero No.2....., a los pocillos G8 y H8 añadir el suero No.8, según se indica en el esquema de trabajo.

*Nota:* Se añadirán 2µL de los sueros problema cuando se requiera una dilución 1/250, y 10 µL cuando se requiera una dilución 1/50. Para sueros que necesiten ser diluidos 1/1 250 o más, se prepararan pre-diluciones en tubos de cristal.

- Realizar diluciones dobles (factor de dilución 5): Utilizar una pipeta multicanal para transferir 100 µL de los pocillos de la columna 1 a la 2, de la 2 a la 3, y de la 3 a la 4. Seguir el mismo procedimiento para las columnas 5 a la 8 y 9 a la 12.

### E- Método.

- Preparar la dilución del Ag HbOHA que se determine como óptima para el revestimiento de las placas de ELISA, partiendo de una de las alícuotas de Ag almacenadas a -20 °C.

Ejemplo: Si se determina que la dilución óptima es 1/1000, lo que se corresponde con una concentración de 1µg/mL, se toman 10µL de Ag y se diluyen en 10 mL de TFS 1X. Esto es suficiente para revestir una placa.

- Añadir 100 µL de esta dilución del Ag a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar toda la noche a 37 °C en cámara húmeda.
- Lavar con TFS 1X + Tween 0.05% (4 ciclos de 300 µL/ pocillo, cada uno).
- Añadir a cada pocillo 100 µL de SFB 10% para bloquear reacciones no específicas e incubar por 1 h a 37 °C en cámara húmeda.
- Durante este tiempo preparar las diluciones de los sueros tal y como se indica en el procedimiento D.
- Transcurrida una hora de incubación descartar el SFB 10% volteando firmemente las placas de ELISA y secar estas sobre papel de filtro.
- Transferir a las placas de ELISA 100 µL de cada una de las diluciones de los sueros. Cubrir las placas e incubar por 2 h en las mismas condiciones.

## **Anexo 2 (Continuación)**

- Lavar con TFS 1X + Tween (4 ciclos de 300 µL).
- Añadir a cada pocillo 100 µl de la dilución óptima del conjugado e incubar por 2 h.
- Lavar con TFS 1X + Tween (3 ciclos de 300 µL).
- Añadir a cada pocillo 100 µL del sustrato e incubar a la temperatura del laboratorio (en la oscuridad) durante el tiempo que se determine como óptimo.  
Ejemplo: 15, 20, 25 ó 30 min.
- Añadir 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M a cada pocillo para detener la reacción.
- Leer la DO utilizando un lector ELISA con filtro de 490 nm.

### **F- Cálculo de los Resultados.**

Se utilizará el procedimiento descrito en el Manual del Programa ELISA para Windows Versión 1 del CDC.

### Anexo 3

#### **Cálculo de los límites de concentración aceptables del suero control positivo, en el ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra *H. influenzae b***

Estos cálculos se realizaron para el suero control positivo, proveniente de un adulto vacunado contra *H. influenzae b*. La selección de este se hizo atendiendo a la buena respuesta de anticuerpos del tipo IgG.

- Se listaron los valores de concentración de IgG obtenidos para el suero en 70 ensayos. Se determinó la desviación estándar (DE) y la media aritmética (X). Se calculó además el coeficiente de variación (CV).

$$\text{CV \%} = (\text{DE} / \text{X}) \times 100$$

Procurando que el CV fuera igual a 10 se excluyeron aquellos valores de concentración que se alejaban mucho de la media aritmética calculada y se recalculó la X y la DE.

- Se calcularon los límites de aceptación superior e inferior, empleando las siguientes fórmulas.

$$\text{Límite superior} = (3 \times \text{DE}) + \text{X}$$

$$\text{Límite inferior} = (3 \times -\text{DE}) + \text{X}$$

- Los cálculos se realizaron utilizando el programa de computación Excel.

## **Anexo 4**

### **Evaluación de variantes diferentes en el modo de construir la curva de calibración del ELISA**

#### **A- Metodología**

##### **1. Variantes de la curva**

**Variante 1:** Se denominó así, a la propuesta por el LNRH-IPK. Utiliza factor de dilución igual a cinco y se realizan cuatro diluciones de estándar (1/1 250 a 1/156 250), con dos réplicas cada una.

**Variante 2:** Aplica un factor de dilución igual a dos, se comenzó a diluir el estándar a partir de la dilución 1/600 y se hicieron nueve diluciones de este (1/600 a 1/153 600), con dos réplicas de cada una (Carlone y col. 1991).

##### **2. Sueros**

Sueros provenientes de 65 niños vacunados contra Hib, participantes en un ensayo clínico que no se describe en este documento. Se hicieron en total 130 determinaciones (2 muestras por niño), pues en dicho ensayo se realizaron extracciones de sangre a los 17 y 19 meses de edad.

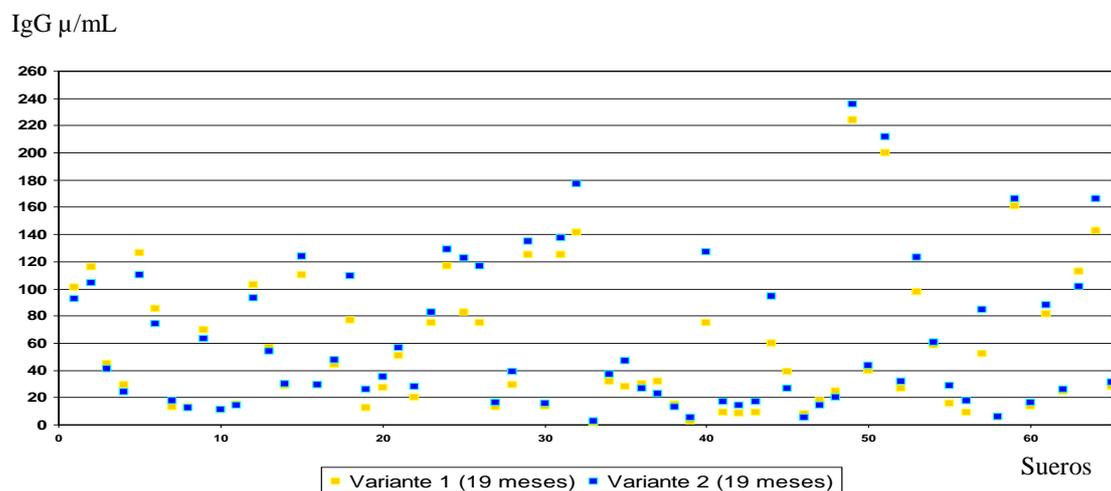
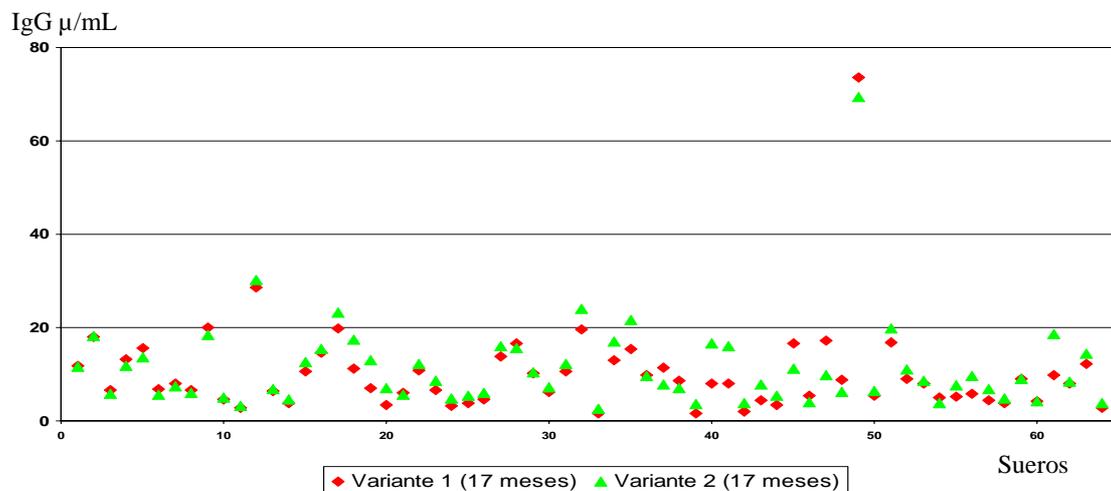
##### **3. Procedimiento**

Bajo las mismas condiciones de trabajo se montaron ambas curvas de calibración y se determinó la concentración de anticuerpos contra Hib para los mismos sueros. Los resultados obtenidos fueron comparados utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

## Anexo 4 (Continuación)

### B- Resultados

Las concentraciones de IgG anti-Hib para cada uno de los sueros se representan esquemáticamente en la figura siguiente. Para conocer en detalle los valores obtenidos en cada caso, puede consultarse la tabla que aparece al final de este anexo.



**Figura. Representación de los valores de IgG anti-Hib obtenidos a través de las dos variantes evaluadas para la construcción de la curva de calibración.**

## Anexo 4 (Continuación)

### C- Discusión

Ambas formas de construir la curva de calibración conducen a resultados de concentración de IgG muy similares para un mismo suero, pues los puntos aparecen superpuestos o muy próximos entre si. Esto se observó para todos los sueros en ambos tiempos de extracción. Al aplicar la prueba U de Mann-Whitney se demostró que los datos provenían de las mismas poblaciones pues tenían las mismas distribuciones, no observándose diferencias significativas en los resultados obtenidos para un mismo suero. Esto permite afirmar que ambas formas de construir la curva patrón arrojan resultados similares y aporta un elemento más en la confirmación del sistema ELISA.

Con esta prueba queda abierta la posibilidad de aplicar en futuros estudios la variante de curva de calibración propuesta por Carlone, si así se estimara necesario; aunque teniendo en cuenta el ahorro que se hace del material de referencia en la variante 1, esta pudiera constituir la opción más conveniente hasta disponer de un material de referencia secundario. Cada laboratorio es responsable de seleccionar las diluciones del suero de referencia a partir del cual se genera la curva de calibración, así como del suero de control de calidad y del conjugado, que resulten más apropiadas para la obtención de una curva útil en sus condiciones específicas (Carlone y col. 1991).

**Anexo 4 (Continuación)**

Voluntario No.	Concentraciones de anticuerpos anti-Hib (µg/mL)			
	Variante 1 Curva LNRH-IPK		Variante 2 Curva Carlone	
	17 meses	19 meses	17 meses	19 meses
2	11.82	101.36	11.73	92.82
3	18.03	115.86	18.31	104.4
4	6.65	45.13	5.81	41.34
5	13.38	29.29	11.99	23.83
8	15.71	126.62	13.71	109.97
9	6.82	85.62	5.66	74.42
10	8.08	13.16	7.46	17.87
13	6.61	13.16	6.1	12.73
14	20.19	69.64	18.49	63.41
24	4.71	11.03	5.02	11.16
25	2.85	15.29	3.32	14.37
27	28.74	103.2	30.22	93.33
28	6.53	56.79	6.92	54.32
29	3.99	28.71	4.7	30.35
30	10.75	110.29	12.68	123.53
31	14.7	29.55	15.42	29.11
33	19.97	44.34	23.27	47.5
35	11.29	76.61	17.41	109.25
36	7	12.39	13.17	25.91
42	3.48	27.5	7.08	35.42
44	6.07	50.76	5.6	56.61
45	10.96	20.32	12.29	27.74
46	6.61	75.06	8.6	83.03

**Anexo 4 (Continuación)**

Voluntario No.	Concentraciones de anticuerpos anti-Hib (µg/mL)			
	Variante 1 Curva LNRH-IPK		Variante 2 Curva Carlone	
	17 meses	19 meses	17 meses	19 meses
53	3.38	116.68	4.87	129
54	3.98	83.04	5.55	122.23
55	4.61	75.14	6.18	116.73
61	13.99	13.08	16.04	16.3
62	16.74	29.51	15.78	39.97
64	10.33	125.35	10.58	135.2
65	6.24	13.7	7.28	15.4
66	10.62	125.43	12.23	137.8
68	19.75	141.13	24.19	177.07
69	1.64	1.69	2.6	2.63
70	13.08	31.79	17.12	37.29
71	15.51	28.12	21.64	46.62
73	9.88	29.88	9.79	26.74
74	11.55	31.9	7.84	22.74
75	8.63	15.07	7.19	12.97
76	1.73	2.3	3.7	5.45
78	8.03	75.04	16.64	127.19
79	8.11	9.1	16.13	17.07
80	2.1	8.49	3.89	14.48
81	4.55	8.81	7.8	16.71
82	3.47	59.82	5.45	94.85
91	16.63	38.94	11.34	27.04
92	5.42	7.59	4	5.03

**Anexo 4 (Continuación)**

Voluntario No.	Concentraciones de anticuerpos anti-Hib (µg/mL)			
	Variante 1 Curva LNRH-IPK		Variante 2 Curva Carlone	
	17 meses	19 meses	17 meses	19 meses
94	17.3	17.93	9.96	14.64
97	8.85	24.91	6.28	20.22
101	73.66	224.44	69.55	236.11
103	5.52	39.68	6.43	43.83
104	16.84	200.33	19.85	211.98
105	9.19	26.74	11.14	32.26
107	8.11	97.54	8.65	123.09
109	5.15	58.67	3.95	60.46
112	5.21	15.41	7.76	28.41
113	5.87	9.07	9.69	17.64
114	4.48	52.42	6.91	84.44
117	3.91	5.91	4.9	6.08
121	9.19	160.74	9.16	166.3
123	4.25	13.8	4.39	16.12
126	9.86	81.44	18.75	87.81
127	8.12	24.94	8.5	26.17
196	12.22	112.97	14.47	101.61
199	2.84	142.71	3.8	166.17
200	4.74	27.71	5.9	31.24

## Anexo 5

### **Estrategia para el estudio del estado de portador nasal y faríngeo de *H. influenzae* b**

#### **A- Obtención de los hisopados nasales y faríngeos**

Se tomó un exudado faríngeo y un exudado nasal a cada niño incluido en el estudio, empleando hisopos de algodón estériles. Para la toma nasal se introdujo el hisopo hacia la zona interna, en ambas fosas, y se rotó hasta una profundidad aproximada de 2 cm. Para la toma faríngea, con el auxilio de un depresor estéril, se tocó con el hisopo las caras posterior y lateral de la faringe, teniendo cuidado de no tocar las caras internas de las mejillas, la lengua u otras zonas de la mucosa bucal.

#### **B- Recuperación de *H. influenzae***

**Cultivo:** En el mismo lugar de la toma de las muestras, se descargaron las secreciones nasales y faríngeas sobre placas de agar chocolate + 300 µg/mL de bacitracina. Los cultivos se incubaron entre 18 y 24 h a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Para comprobar la calidad del medio se cultivó paralelamente la cepa de *H. influenzae* ATCC 49247.

**Lectura:** Se buscaron colonias grandes, aplastadas, opacas, entre incoloras y grises. Se procedió a realizar la coloración de Gram a las colonias sugerentes y se comprobó la presencia de bacilos o cocobacilos gramnegativos.

**Aislamiento:** Las colonias con las características culturales y morfológicas antes descritas se subcultivaron en placas de agar chocolate para su identificación y conservación.

#### **C- Identificación de *H. influenzae***

**1- Prueba de requerimiento de los factores X y X:** Se utilizó el método de los discos de papel impregnados en los factores X y V.

## Anexo 5 (Continuación)

- De cada aislamiento a estudiar se preparó una suspensión densa de células (tubo 1 en la escala de turbidez estándar de Mc Farland).
- Empleando un hisopo se estrió la suspensión sobre la mitad de una placa de agar tristona soya, con estrías en dos direcciones, para asegurar el crecimiento confluyente.
- Se dejó secar el inóculo y se colocaron los discos de papel conteniendo los factores X, V y XV.
- Se procedió de igual forma con la cepa *H. influenzae* ATCC 49247, como control positivo de la prueba.
- Las placas, invertidas, se colocaron en la incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C entre 18 y 24 h.
- Lectura: Se informaron como *H. influenzae* a aquellos aislamientos que sólo crecieron alrededor del disco X+V.

### **2- Prueba de aglutinación en lámina para la serotipificación de los aislamientos sospechosos de *H. influenzae*:** Se emplearon antisueros de la Difco.

- Con asa estéril, se tomó una porción del crecimiento obtenido en el subcultivo y se hizo una suspensión en 10 µL de salina fisiológica, sobre una lámina de vidrio.
- Se agregaron 5-10 µL de antisuero polivalente y de forma paralela se procedió igual, pero añadiendo solución salina (control de salina).
- Se mezcló con la ayuda de un palillo mondadientes y se movió suavemente la lámina hacia atrás y hacia adelante, durante un minuto.
- Como control positivo se procedió de igual manera con la cepa *H. influenzae* ATCC 49247
- Se observaron las reacciones bajo una luz brillante y sobre un fondo negro. Sólo se consideraron positivas las reacciones fuertes, aquellas en las que todas las células se agruparon (aglutinaron) y la suspensión se tornó clara.

## Anexo 5 (Continuación)

- Interpretación:
  - Cuando la reacción frente al antisuero polivalente fue positiva, se informó el aislamiento como *H. influenzae*. Para identificar el serotipo se continuó entonces probando frente al antisuero b y a los restantes antisueros específicos, siguiendo los mismos pasos.
  - Si no se produjo aglutinación con el antisuero polivalente, el aislamiento fue informado como no tipificable (NT).

## Anexo 6

### Protocolo para la determinación de la actividad bactericida de los anticuerpos contra el polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b (Hib)

#### A- Material biológico, medios de cultivo y reactivos más importantes

- Cepa *H. influenzae* ATCC 49247 conservada a -70 °C.
- Complemento: Suero humano obtenido a partir de una pesquisa entre donantes voluntarios de sangre, para el cual se comprobó en el laboratorio la ausencia de anticuerpos bactericidas para Hib (almacenado a -70 °C)
- NaCl
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- KCl
- Medio de cultivo HTM (*Haemophilus test medium*)
- NAD (*Nicotinamide adenine dinucleotide*)
- Hemina

#### B- Equipos y materiales más importantes

- Equipo medidor de pH
- Fotocolímetro
- Balanza
- Pipetas multicanal
- Juego de micropipetas
- Puntas azules y amarillas estériles
- Placas de cultivo celular de 96 pocillos, con tapa, y estériles
- Tubos de cristal (100x13)

## Anexo 6 (Continuación)

### C- Método

#### Preparación de la suspensión celular de Hib

- La cepa *H. influenzae* ATCC 49247 se cultiva en una placa de HTM suplementado con Hemina y NAD, durante 16-18 h a 37 °C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
- Se multiplica el crecimiento en otras dos placas de HTM por 5 h en las mismas condiciones de incubación.
- Recoger toda la biomasa obtenida lavando cada placa con 2 mL de tampón fosfato salina (TFS) y se ajusta el volumen final a 5 mL.
- A 0.5 mL de esta suspensión se añaden 4.5 mL de TFS (dilución 1/10) y se realiza la lectura de la DO a 520 nm.
- Preparar una suspensión intermedia con volumen final de 3 mL. El volumen de suspensión celular de la dilución 1/10 a tomar se calcula dividiendo 3 entre la concentración celular de la suspensión y el resultado se resta al volumen final deseado. Por ejemplo: Si la DO (1/10) = 3.4

$$V \text{ final} = 3 \text{ mL}$$

$$3/3.4 = 0.808 \text{ mL de suspensión bacteriana (1/10)}$$

$$3 - 0.808 = 2.192 \text{ mL de TFS}$$

- A partir de la suspensión intermedia preparada en el paso anterior se hace una dilución 1/5. Para esto, añadir 1 mL de la suspensión a 4 mL de TFS y medir la DO, que debe ser igual a 1. De no ser así, se ajusta añadiendo TFS.
- De la dilución 1/5 preparada en el paso anterior, se toma 1 mL y se resuspende en 9 mL de TFS (1/10). De esta dilución se toman 100 µl y se transfieren a 10 mL de TFS (1/100) y nuevamente otros 100 µL se resuspenden en 10 mL de TFS (1/100 000).

*Este procedimiento obedece a una determinación previa realizada en el laboratorio, de acuerdo con la cual en 12.5 µL de la última dilución se pueden encontrar de 50 a 100 colonias de Hib, concentración recomendada para una adecuada lectura en el ensayo bactericida.*

## Anexo 6 (Continuación)

### Llenado de la placa de ensayo

- Añadir 12.5 µL de TFS en todos los pocillos, excepto en la columna A.
- Añadir 12.5 µL de los sueros a probar (previamente inactivados a 56 °C durante 30 min) en los pocillos correspondientes a la columna A y H (A1 y H1- Suero 1.....A11 y H11- Suero 11, y en A12 y H12 - Control +), según se muestra en el esquema que aparece más adelante.

*El Control + será un suero que se utilizará como control en cada placa de trabajo, para el que se conoce el título de anticuerpos bactericidas, determinado previamente en el laboratorio durante la estandarización del método.*

- Hacer diluciones dobles seriadas de todos los sueros, hasta la columna G, transfiriendo siempre 12.5 µL.
- Adicionar 12.5 µL de TFS a todos los pocillos.
- Añadir 12.5 µL de suspensión bacteriana a cada pocillo.
- Adicionar 12.5 µL de complemento por pocillo, excepto en la columna H.
- Cubrir las placas con tapa estéril e incubar 30 min a 37 °C en atmósfera normal.
- Adicionar 120 µL de medio HTM a cada pocillo.
- Cubrir las placas e incubar toda la noche a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub>.

### Lectura de las placas (es recomendable auxiliarse de una lámpara-lupa)

- Se chequea inicialmente el pocillo control de crecimiento para cada suero, al cual corresponde el 100% de crecimiento celular.
- Se procede entonces al conteo de las colonias crecidas en los pocillos correspondientes a cada una de las diluciones de un mismo suero.
- Se reporta el título bactericida como el recíproco de la mayor dilución del suero en la que se produce  $\geq 50\%$  de muerte celular.

Los resultados de cada placa sólo serán tomados en consideración una vez comprobado el título bactericida para el Suero Control +.

**Anexo 6 (Continuación)**

**Esquema de trabajo en una placa de ensayo**

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b> Control de Crecimiento
<b>1</b>	Suero 1 1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Suero 1
<b>2</b>	Suero 2							Suero 2
<b>3</b>	Suero 3							Suero 3
<b>4</b>	Suero 4							Suero 1
<b>5</b>	Suero 5							Suero 4
<b>6</b>	Suero 6							Suero 5
<b>7</b>	Suero 7							Suero 6
<b>8</b>	Suero 8							Suero 7
<b>9</b>	Suero 9							Suero 8
<b>10</b>	Suero 10							Suero 9
<b>11</b>	Suero 11							Suero 10
<b>12</b>	Control +							Suero Control +