

## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

# Comparación de la respuesta inmunológica frente a cepas de *S. pneumoniae*, evaluada por hemaglutinación, en niños inmunizados con vacuna neumocócica heptavalente (dos primovacunaciones con o sin refuerzo)

*Comparison of the immune response against strains of S. pneumoniae, assessed by hemagglutination, in children immunized with heptavalent conjugated pneumococcal vaccine (two primary vaccinations with or without reinforcement)*

Norma Angélica Silva-Rosales,<sup>1</sup> Carlos Enrique Tene,<sup>2</sup> Víctor Hugo Cervantes-Kardasch,<sup>2</sup> Mario Del-Toro<sup>2</sup>

## RESUMEN

**Introducción.** Diferentes esquemas de inmunización con la vacuna antineumocócica heptavalente han probado su eficacia. Aunque se recomiendan pautas vacunales de dos o tres primovacunaciones con su respectivo refuerzo adicional, aún hay niños con primovacunaciones sin refuerzo. El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta inmunológica contra *S. pneumoniae* en niños bajo distintos esquemas de inmunización (dos o tres dosis) con vacuna antineumocócica heptavalente.

**Métodos.** Se realizó un estudio observacional y transversal para comparar la respuesta inmunológica entre los grupos A (dos primovacunaciones sin refuerzo) y B (dos primovacunaciones con refuerzo). Se analizó la respuesta inmunológica escasa por medio de hemaglutinación positiva (dilución  $\leq 1:2$ ). Se calculó la razón de momios (OR) y se aplicó la prueba exacta de Fisher.

**Resultados.** No se encontraron diferencias clínicas entre los grupos A ( $n = 14$ ) y B ( $n = 15$ ). Hubo mayor proporción de respuesta inmunológica escasa en el grupo A [57% vs 13%; OR 8.7 (IC 95% 1.3–53.8);  $p = 0.017$ ].

**Conclusiones.** La respuesta inmunológica escasa contra *S. pneumoniae* es mayor en los esquemas de dos dosis de primovacunación sin refuerzo que cuando se utilizan dos dosis de primovacunación con refuerzo.

**Palabras clave:** *S. pneumoniae*, vacuna antineumocócica heptavalente, esquema de vacunación, hemaglutinación, respuesta inmunológica, inmunización.

## ABSTRACT

**Background.** Different patterns of heptavalent conjugated pneumococcal vaccine immunization have proven effective. Although three and four doses are recommended, there are still children who are administered schemes of two primary vaccination doses without reinforcement. The aim of this study was to compare the immune response against *S. pneumoniae* in children (group A and group B) submitted to different immunization schemes (two primary vaccination doses with or without reinforcement).

**Methods.** We conducted an observational, cross-sectional study comparing the immune response between group A and group B, analyzing the weak immune response with positive hemagglutination dilution  $\leq 1:2$ . Odds ratio (OR) and Fisher's exact test were used.

**Results.** There were no clinical differences between group A ( $n = 14$ ) and group B ( $n = 15$ ). There was a higher proportion of weak immune response in group A (57% vs. 13%, OR 8.7 (95% CI 1.3–53.8,  $p = 0.017$ ).

**Conclusions.** Weak immune response against *S. pneumoniae* is higher in schemes primed with two doses of heptavalent conjugated pneumococcal vaccine without reinforcement than using the two-dose schedule + a booster of heptavalent conjugated pneumococcal vaccine.

**Key words:** *S. pneumoniae*, heptavalent conjugated pneumococcal vaccine, vaccination, hemagglutination, immune response, immunization.

<sup>1</sup> Unidad de Medicina Preventiva, Clínica Hospital Dr. Miguel Trejo Ochoa  
Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSTE), Colima.

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Colima. Colima, Colima, México

Fecha de recepción: 01-02-12  
Fecha de aceptación: 10-04-12

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* presentan alta incidencia en la población infantil. Los estudios realizados para demostrar la efectividad de la vacuna neumocócica heptavalente están basados en esquemas de dos o

tres dosis de primovacuna más su respectivo refuerzo.<sup>1</sup> Así, la eficacia e inmunogenicidad de un esquema primario de tres dosis de vacuna neumocócica heptavalente más los refuerzos a los 15 y 24 meses de edad son de más de 93.9%, para los serotipos vacunales contra la enfermedad neumocócica infantil.<sup>2</sup> Existen estudios que demuestran la protección contra los serotipos de neumococo incluidos en la vacuna heptavalente al utilizar un esquema primario de dos dosis de primovacuna más un refuerzo a los 13 meses de edad.<sup>3</sup> Este esquema ha sido adoptado en algunos países con limitaciones económicas que pretenden asegurar la protección de la población infantil, pero que tienen limitadas posibilidades de absorber el costo de un esquema de vacunación con cuatro dosis. Aunque en México se han utilizado los esquemas de tres y cuatro dosis, en nuestro medio la mayoría de los niños reciben dos dosis como esquema primario, incluso sin la aplicación de una tercera dosis de refuerzo.

El propósito del presente estudio fue comparar la respuesta inmunológica (RI) contra cepas de *S. pneumoniae* en niños de 2 años sometidos a esquemas de dos dosis de primovacuna con o sin refuerzo.

## MÉTODOS

Mediante un diseño transversal analítico,<sup>4</sup> se incluyeron niños de dos años cumplidos que hubieran sido inmunizados con dos (al segundo y cuarto mes de vida) o tres (al segundo, cuarto y décimo segundo mes de vida) dosis de vacuna neumocócica heptavalente. No se incluyeron en el estudio niños que asistieran a guarderías o que al momento de la entrevista estuvieran cursando alguna enfermedad aguda. Para localizar a los niños con esquemas de vacunación completos y que habían sido inmunizados en el tiempo correspondiente, se utilizaron los censos nominales y el sistema del Programa de Vacunación Universal (PROVAC) de una clínica-hospital de segundo nivel de atención en el área urbana del municipio de Villa de Álvarez, Colima, México. De acuerdo con estos datos, se realizó una visita domiciliar para confirmarlos. Se revisó la Cartilla Nacional de Salud para verificar la concordancia entre las fechas de aplicación registradas en las fuentes referidas. Los padres de familia otorgaron el consentimiento informado para la participación de sus hijos en el estudio.

Se le realizó la historia clínica detallada de cada participante, que incluyó antecedentes patológicos y no

patológicos, la edad gestacional y el peso al nacer. También el tiempo que el niño recibió lactancia materna, la asistencia a la guardería y datos de hacinamiento en hogar. De igual forma se registró el nivel de escolaridad de los padres, la ocupación y si había antecedentes de tabaquismo. Adicionalmente, se realizaron estudios de somatometría que incluyeron mediciones de peso, estatura, perímetro cefálico y perímetro abdominal.

Mediante una punción venosa, se obtuvieron 2 mL de sangre para la obtención de suero (mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos). Las muestras séricas se recolectaron desde mayo hasta agosto del 2010, y fueron centrifugadas y congeladas a -20°C hasta el momento de hacer las mediciones.

La variable de interés fue la respuesta inmunológica que mostraron ambos grupos (esquemas de vacunación de dos dosis de primovacuna con o sin refuerzo).

### Esquemas de vacunación

El primer grupo fue aquel en el que se aplicaron dos dosis de primovacuna, a los dos y a los cuatro meses de edad, sin refuerzo (grupo A). El segundo grupo fue aquel en el que se aplicaron dos dosis de primovacuna, a los dos y cuatro meses, y una dosis de refuerzo a los 12 meses (grupo B).

### Respuesta inmunológica

Se consideró que la respuesta inmunológica era escasa (RIE) si se observaba hemaglutinación positiva a una dilución  $\leq 1:2$  y respuesta inmunológica adecuada si la hemaglutinación fue positiva en una dilución  $\geq 1:4$ . Esta respuesta se midió mediante la técnica de hemaglutinación.

### Técnica de hemaglutinación

Diferentes grados de dilución del suero de cada participante se pusieron en contacto con un reactivo de eritrocitos con antígenos de neumococo. Esto permitió detectar el grado de dilución en el cual se presentaba la reacción antígeno-anticuerpo (anticuerpos del participante contra antígenos del reactivo).

**a) Preparación del reactivo.** Se obtuvo una muestra de 5 mL de sangre venosa de un sujeto sano con sangre tipo O positivo que se depositó en un tubo con etilendiaminotetraacetato (EDTA), para su posterior centrifugación. Enseguida, se separaron 2 mL de los eritrocitos obtenidos y se lavaron con 2 mL de solución salina isotónica (NaCl al 0.9%). La solución fue

centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos en tres ocasiones consecutivas. Posteriormente, se realizó una suspensión de eritrocitos al 50% con NaCl al 0.9% (0.5 mL de eritrocitos en 0.5 mL de NaCl al 0.9%). Una vez lavados, se tomaron 0.1 mL de estos eritrocitos y se mezclaron con 0.6 mL de NaCl al 0.9% más 0.25 mL de NaCl al 0.9%.

De la preparación anterior se tomaron 0.1 mL y se mezclaron con 1.25 mL de vacuna neumocócica de 23 valencias. Esta última había sido conservada a una temperatura de 4 a 8°C en un refrigerador normado para resguardo y conservación de productos biológicos.<sup>5</sup> La preparación se dejó reposar y se procedió a mezclar, centrifugar y eliminar el excedente, para luego ser resuspendida con 0.5 mL de solución de NaCl al 0.9%.

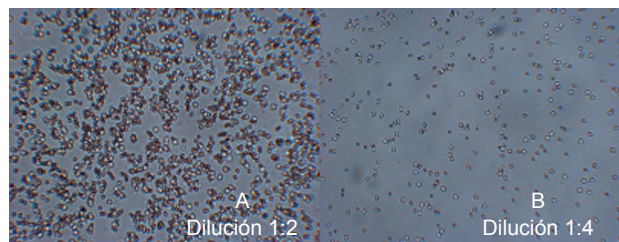
Con lo anterior, se obtuvo un reactivo con eritrocitos sensibilizados con vacuna neumocócica de 23 valencias, mismo que fue utilizado el día en que se analizaron las muestras sanguíneas de los sujetos de estudio. Como control negativo se utilizaron eritrocitos del sujeto sano sin sensibilizar. Se verificó la ausencia de hemaglutinación al exponer este control con el suero de los sujetos del estudio.

**b) Diluciones.** Para observar las diferencias en la titulación de los anticuerpos se realizaron diferentes diluciones. En nueve tubos de ensayo con reactivo de eritrocitos (2.5 µL), se prepararon diluciones progresivamente mayores del suero de cada sujeto de estudio (desde 1:1 hasta 1:256). Cada dilución fue sometida a centrifugación a 3000 rpm por cinco minutos. De cada dilución obtenida, se tomó una gota para depositar en el portaobjetos y observar al microscopio en un campo de 40x.

**c) Evaluación de la respuesta inmune.** La respuesta inmune se evaluó verificando cuál de las diluciones del suero mostraba hemaglutinación con el reactivo de eritrocitos sensibilizados. Se consideró que había respuesta inmunológica escasa (RIE) si la hemaglutinación era positiva a diluciones del suero analizado menores o iguales a 1:2. Se consideró que había respuesta inmunológica adecuada si la hemaglutinación era positiva a diluciones iguales o mayores a 1:4 (Figura 1).

#### Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se calculó mediante la fórmula de medias para muestras independientes<sup>4</sup> con base en un estudio en el que se cuantificaron los títulos de los anti-



**Figura 1.** Evaluación de la respuesta inmunológica de anticuerpos a antígenos de polisacárido de neumococo. a) Presencia de hemaglutinación b) Ausencia de hemaglutinación. En este caso, se consideró que el sujeto tenía escasa respuesta inmunológica por presentar hemaglutinación únicamente hasta la primera dilución (1:2).

cuerpos antineumococo luego de administrar tres dosis de vacuna heptavalente.<sup>6</sup> Se consideró una alfa de 0.05, beta de 0.2 y  $\mu$  1 y  $\mu$  0 de 10.5 y 7, respectivamente, con una sigma de 4.0.

#### Análisis estadístico

La estadística descriptiva incluyó la mediana y recorrido intercuartílico para la descripción general de las características cuantitativas evaluadas dentro de cada grupo de esquema de inmunización, según fuera el caso, previa evaluación del sesgo y curtosis de los valores de cada grupo. Se calcularon las razones, porcentajes y promedios dependiendo de la naturaleza de cada una de las variables de estudio.

La comparación de la proporción de niños con RIE entre ambos grupos de vacunación se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Se utilizó  $\chi^2$  para la evaluación de las variables cualitativas mostradas. Se consideró estadísticamente significativa una  $p < 0.05$  con intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS (versión 17.0).

## RESULTADOS

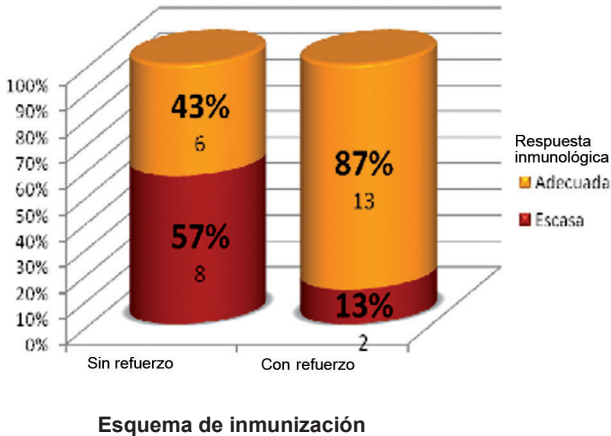
Se incluyeron en el estudio 29 niños (14 de sexo femenino y 15 de sexo masculino). En el Cuadro 1 se presentan sus características clínicas. A 14 se les aplicaron dos dosis de primovacunación sin refuerzo (grupo A) y a 15, dos dosis de primovacunación con refuerzo (grupo B). No se excluyó ningún paciente del estudio. Se obtuvieron los datos de todos los niños. La prevalencia de RIE fue de 34% ( $n=10$ ) en los dos grupos. La proporción de niños con RIE fue menor en el grupo sometido al esquema de dos dosis de primovacunación con refuerzo en com-

paración con el de dos dosis de primovacuna sin refuerzo; es decir, 2 de 15 (13.3%) vs 8 de 14 (57.1%), respectivamente ( $p = 0.017$ ) (Figura 2). El antecedente de haber sido inmunizado con un esquema de dos dosis de vacuna heptavalente antineumocócica sin refuerzo fue un factor de riesgo para RIE en comparación con el antecedente dos dosis de primovacuna con refuerzo (OR= 8.7, IC 95% 1.3-53.8;  $p = 0.017$ ).

No se encontró diferencia significativa con respecto a distribución de género (relación femenino/masculino) entre los diferentes esquemas de inmunización. Tampoco se encontraron diferencias en los grupos A y B con respecto a los siguientes parámetros: peso al nacer ( $p = 0.27$ ), talla al nacer ( $p = 0.62$ ), peso actual ( $p = 0.8$ ), talla actual ( $p = 0.1$ ) (Cuadro 1), edad ( $p = 0.66$ ), duración del embarazo ( $p = 0.11$ ), personas que duermen en la misma habitación ( $p = 0.2$ ) y el tiempo de lactancia al seno materno ( $p = 0.47$ ) (Cuadro 2). La proporción de primogénitos fue mayor en el grupo de niños tratados con tres dosis de inmunización ( $p = 0.48$ ) (Cuadro 1).

# DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten afirmar que la respuesta inmune es mejor en niños que fueron sometidos a esquemas de vacunación antineumocócica de dos dosis de



**Figura 2.** Respuesta inmunológica contra *S. pneumoniae* en niños sometidos a diferentes esquemas de inmunización con vacuna heptavalente.

primovacuna con refuerzo (al segundo, cuarto y décimo segundo mes de vida) en comparación con quienes fueron expuestos a dos dosis sin refuerzo (segundo y cuarto mes de vida).

La variable de interés del presente estudio fue la respuesta inmune ante dos diferentes esquemas de vacunación antineumocócica. El tiempo transcurrido a partir de la última aplicación de vacuna y la medición de los anticuerpos

**Cuadro 1.** Comparación de las características clínicas de niños sometidos a diferentes esquemas de inmunización contra el *Streptococcus pneumoniae* con vacuna neumocócica heptavalente

Características*	Esquema de inmunización (dos dosis de primovacuna)		OR	IC 95%	p
	Sin refuerzo (n = 14)	Con refuerzo (n = 15)			
<b>Género</b> (femenino/masculino)	7/7	7/8	1.14	0.3-4.9	0.858
<b>Vía de nacimiento</b> (cesárea/vaginal)	9/5	11/4	0.65	1.3-3.2	0.599
Primogénito (sí/no)	5/9	11/4	0.20	0.04-0.98	<b>0.048</b>
<b>Peso</b>					
al nacer (g)	3300 (3975-3512)	3400 (3025-3825)			0.27
actual (kg)	11.7 (10.7-13.5)	12 (11.4-13.9)			0.80
<b>Talla</b>					
al nacer (cm)	51 (50-51.7)	51 (49-53)			0.62
actual (cm)	88 (84.5-94.5)	87.5 (82.5-92.5)			0.10

\*Los valores cuantitativos se expresan como mediana (recorrido intercuartílico). La comparación entre ambos grupos se realizó con la prueba U de Mann Whitney con excepción de la vía de nacimiento que se comparó con la prueba exacta de Fisher.

**Cuadro 2.** Comparación de las características clínicas de niños sometidos a diferentes esquemas de inmunización contra el *Streptococcus pneumoniae* con vacuna neumocócica heptavalente

Características*	Esquema de inmunización (dos dosis de primovacuna)		OR	IC 95%	p
	Sin refuerzo (n= 14)	Con refuerzo (n= 15)			
<b>Edad</b> (meses)	26 (26-28)	25 (24-28)			0.66
<b>Duración de embarazo</b> (semanas de gestación)	39 (38-40)	40 (38-40)			0.11
<b>Lactancia al seno materno</b> (meses)	5	4			0.47
<b>Personas que duermen en la misma habitación</b> (n)	2 (1-3)	2 (1-3)			0.20
<b>Respuesta inmunológica</b> (escasa/adecuada)**	8/6	2/13	8.7	(1.3-53.8)	<b>0.017</b>

\*Los valores cuantitativos se expresan como mediana (recorrido intercuartílico). La comparación entre ambos grupos se realizó con la prueba U de Mann Whitney, con excepción de la respuesta inmunológica que se comparó con la prueba exacta de Fisher.

\*\*Se consideró que una respuesta inmunológica fue escasa cuando solo se percibió hemaglutinación hasta la dilución 1:2. En cambio, hemaglutinación adecuada se consideró si se percibía hemaglutinación mayor a 1:2.

permite valorar la utilidad de aplicar una dosis de refuerzo.<sup>3</sup> Como se sabe, una respuesta secundaria mayor puede inducirse al administrar una dosis de refuerzo, porque se genera una respuesta inmunológica más rápida y de mayor intensidad que la que ocurre en la infección primaria, además de producirse una mayor cantidad de células efectoras y de memoria contra un antígeno específico.<sup>7</sup> Así, cuando el organismo ha estado previamente en contacto con un antígeno determinado, aparece la respuesta secundaria o anamnésica, que es mediada por IgG o IgA.<sup>7</sup> Se ha descrito que, en personas adultas, los niveles de anticuerpos antineumococo disminuyen dentro de los 6 años siguientes a la aplicación de las dosis de primovacuna.<sup>8</sup> Por esto se hace necesaria una dosis de refuerzo, sobre todo en pacientes en alto riesgo de infección por neumococo. Tal refuerzo incrementa los niveles de anticuerpos, por al menos 1.4 veces, en cerca de 55% de los casos de adultos que previamente no han sido vacunados y de aquellos que lo fueron 5.5 a 9 años antes.<sup>8</sup>

Un estudio previo menciona que, con esquemas de vacunación de dos dosis de primovacuna sin refuerzo, los niños podrían no alcanzar la protección contra ciertos antígenos específicos del neumococo. Esto los haría susceptibles a la infección por cepas específicas de este microorganismo.<sup>9</sup>

En otro estudio se ha documentado que, tanto en niños prematuros como en los de término, disminuyen los títulos de anticuerpos durante el primer año de vida. Incluso si se

aplican tres dosis como primovacuna.<sup>10</sup> Sin embargo, en el presente estudio, con excepción de un niño que había sido inmunizado con dos dosis, ambos esquemas de vacunación (con o sin refuerzo) continuaron evocando una respuesta inmunológica, aunque en diferente grado; aun cuando no tuvieron la aplicación del refuerzo, como en el caso del grupo de dos dosis.

La efectividad de la vacuna utilizada en los grupos de niños estudiados evidencia también el apego del personal de salud a los estándares de calidad exigidos al momento de la aplicación de esta vacuna y durante el proceso de cadena de frío.<sup>5</sup> Es importante el grado de participación de los padres, no solamente hacia este tipo de estudios sino también hacia los programas de vacunación, cuyo grado de cobertura debiera incrementarse ya que, para el caso de la vacuna conjugada antineumocócica en los menores de 2 años, es de apenas 46.1%.<sup>11,12</sup> En nuestro medio, la participación de padres e hijos es facilitada por el trabajo directo y constante del personal de enfermería, dentro del marco del programa permanente de vacunación universal de las diferentes instituciones de salud y del contexto de las comunidades. Estudios previos han documentado la importancia de la participación comunitaria que se logra a través de la educación en salud, para fomentar cambios en las conductas individuales, junto con políticas públicas que apoyen esquemas de vacunación eficaces.<sup>13</sup>

Por otra parte, se ha demostrado la influencia de otros factores implicados en la respuesta inmunológica



adecuada en diferentes poblaciones.<sup>1</sup> En nuestro estudio no se demostraron diferencias entre ambos grupos con respecto a factores somatométricos o factores de riesgo para la infección por neumococo, como el hacinamiento, los antecedentes de tabaquismo, la prematurez, la ausencia de lactancia, entre otros. Tampoco se encontró que estos factores pudieran influir sobre los resultados de la respuesta inmune. Un hallazgo inesperado fue que hubo una mayor proporción de primogénitos inmunizados con el esquema de tres dosis. Esto deberá explorarse en estudios posteriores.

Aunque la medición de anticuerpos específicos dirigidos contra cada uno de los serotipos incluidos en una vacuna es la forma más aceptada de evaluar su capacidad de evocar una respuesta inmunitaria, la técnica de medición utilizada en el presente estudio posee también un alto grado de sensibilidad.<sup>14</sup> El fenómeno de precipitación fue documentado hace ya algunas décadas y es fundamento de muchas técnicas inmunoquímicas actuales.<sup>14</sup> Estas reacciones permiten detectar antígenos mediante la utilización de partículas recubiertas de antígenos o anticuerpos,<sup>15</sup> y han sido utilizadas en diferentes estados clínicos.<sup>16,17</sup> En la técnica de laboratorio aquí utilizada se provocó una aglutinación directa, una reacción clásica caracterizada por la aglomeración de células —en este caso, eritrocitos— utilizando anticuerpos específicos. Se ha demostrado la utilidad que tienen las pruebas de aglutinación de látex para la serotipificación de cepas de *Streptococcus pneumoniae* en muestras clínicas de pacientes con enfermedad invasiva, ya que tienen una alta capacidad de discriminación (92.5%).<sup>18</sup> La técnica de laboratorio utilizada en el presente estudio es semi-cuantitativa y podría ser considerada cuando los recursos económicos son limitados o cuando los países no pueden contar con los reactivos apropiados para evaluar la respuesta inmune mediante la prueba de ELISA.

Las perspectivas del estudio incluyen evaluar la eficacia de los esquemas de inmunización, dando seguimiento a los títulos alcanzados por uno y otro esquema de inmunización, para cuantificar la duración de la respuesta inmunológica inducida por la vacuna con base en la fecha de la última dosis de aplicación, que no fue considerada en el presente estudio. Por otra parte, se deberán explorar los costos económicos contra los posibles beneficios de cada esquema de inmunización, no solo considerando el contexto clínico ideal sino también los factores externos, como los recursos económicos limitados en el nivel gu-

bernamental. Por último, deberá discutirse la conveniencia de continuar favoreciendo el cumplimiento de coberturas de protección mínimas necesarias contra neumococo, o inclinarse por la búsqueda de una respuesta inmunológica mayor cuando el contexto clínico y económico lo permita. En lo que se refiere a los niños que muestren RIE se deberá valorar la posibilidad de completar el esquema con el refuerzo de la vacuna neumocócica heptavalente a los dos años de edad, para incrementar la respuesta inmunológica y, consecuentemente, la protección a infecciones.

## AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue apoyado por CONACyT mediante beca de estudio de posgrado para la primera autora.

Se agradece el apoyo de la Dra Virginia Nuncio y las enfermeras Berenice Mendoza y Elsa Cuevas.

Autor de correspondencia: Dr. Carlos Enrique Tene Pérez.

Correo electrónico: carlostene1@hotmail.com

## REFERENCIAS

1. Guevara M, Barricarte A, Pérez B, Arriazu M, García Cenoz M, Castilla J. La vacuna neumocócica conjugada heptavalente (Prevenar™). Diferencias en su efectividad en distintas poblaciones. *An Sis Sanit Navar* 2008;31:171-192.
2. Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanent Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:187-195.
3. Käyhty H, Åhman H, Eriksson K, Sörberg M, Nilsson L. Immunogenicity and tolerability of a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine administered at 3, 5 and 12 months of age. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:108-114.
4. Dawson B, Trapp R. Basic and Clinical Biostatistics. USA: McGraw-Hill; 2006.
5. Vesta L, González A, Coronel DL, Aldama O, Gómez CM, Desentis JF, et al. Manual de vacunación 2008-2009. México, DF: Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia; 2008.
6. Lee H, Nahm MH, Burton R, Kim KH. Immune response in infants to the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine against vaccine-related serotypes 6A and 19A. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:376-381.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. Madrid: Elsevier; 2008.
8. Davidson M, Bulkow LR, Grabman J, Parkinson AJ, Chamblee C, Williams WW, et al. Immunogenicity of pneumococcal revaccination in patients with chronic disease. *Arch Intern Med*

- 1994;154:2209-2014.
9. Lockhart SP, Hackell JG, Fritzell B. Pneumococcal conjugate vaccines: emerging clinical information and its implications. *Expert Rev Vaccines* 2006;5:553-564.
10. Ruggeberg JU, Collins C, Clarke P, Johnson N, Sinha R, Everest N, et al. Immunogenicity and induction of immunological memory of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in preterm UK infants. *Vaccine* 2007;25:264-271.
11. Sánchez L, Pérez D, Alfonso L, Castro M, Sánchez LM, Van der Stuyft P, et al. A community education strategy to promote participation in dengue prevention in Cuba. *Rev Panam Salud Publica* 2008;24:61-69.
12. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Cobertura del Esquema de Vacunación 2008.
13. Beltrán L. Comunicación para la salud del pueblo. Una revisión de conceptos básicos. *Estudios sobre las Culturas Contemporáneas* 2010;31:17-65.
14. Henry JB, Todd JC, Sanford AH, Davidsohn I. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. Barcelona: Salvat; 1988.
15. Kabat EA. Antibodies responsible for allergic reactions and the difficulties involved in studying them. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1961;18:1-2.
16. Yoshida R, Igarashi M, Ozaki H, Kishida N, Tomabechi D, Kida H, et al. Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000350.
17. Effler PV, Bogard AK, Domen HY, Katz AR, Higa HY, Sasaki DM. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 2002;40:1464-1469.
18. Sanz JC, Culebras E, Ríos E, Rodríguez-Avial I, Wilhelmi I, Ramos B, et al. Direct serogrouping of *Streptococcus pneumoniae* strains in clinical samples by use of a latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 2010;48:593-595. doi:10.1128/JCM.01651-09.