

II Simposium Nacional de Avances en Vacunas

Vacunas combinadas: una nueva era

J.A. Navarro

Jefe del Servicio de Prevención y Protección de la Salud. Consejería de Sanidad y Consumo. Murcia. España.

Introducción

Una vacuna combinada puede definirse como aquel preparado que incluye 2 o más vacunas físicamente combinadas y administradas al mismo tiempo y en el mismo sitio anatómico¹. Las combinaciones no son una necesidad de estos últimos años, sino que hace ya más de 5 décadas comenzaron a aparecer mezclas de varios microorganismos o de varios serotipos o serogrupos de distintas bacterias o virus. Evidentemente, los requisitos que se les pedía en aquellos momentos eran bien distintos a los de ahora, aunque algunas combinaciones, con pequeñas modificaciones respecto a los componentes individuales, demostraron una gran eficacia e incluso sobreviven actualmente. La primera combinación data de 1949², cuando se mezclaron la vacuna antitosferinosa con la anti-tetánica y, desde entonces y hasta 1983, se registraron 13 compuestos (tabla 1). No obstante, en estas 2 últimas décadas ha crecido el interés por las vacunas combinadas. Los motivos más destacados son los siguientes:

1. Disponemos aproximadamente de 30 vacunas; todas son parenterales, excepto la de la poliomielitis, la fiebre tifoidea y el cólera.

2. Se encuentran en fase de investigación y desarrollo aproximadamente 200 vacunas y se prevé que para el año 2010 estarán en el mercado mundial 25 vacunas infantiles.

3. Los gestores de los programas de vacunación se preguntan si no estamos convirtiendo a los niños en «alfilereros»³:

4. Hasta que no se disponga de vacunas orales para todas o para la mayoría de las enfermedades inmunoprevenibles, sería deseable combinar el mayor número de antígenos en una sola inyección.

Ventajas, beneficios y desventajas teóricas de las vacunas combinadas

Los beneficios derivados de la utilización de las vacunas combinadas son evidentes:

TABLA 1
Evolución de algunas vacunas combinadas

Año de comercialización	Vacuna
1949	Difteria-tos ferina, difteria-tétanos, tétanos-tos ferina
1955	Poliomielitis inactivada, tifoidea a-paratifoidea b
1957	Adenovirus-gripe (1980*)
1959	Difteria-tétanos-tos ferina-poliomielitis inactivada
1967	Sarampión-viruela (1985*)
1970	Parotiditis-rubéola
1971	Sarampión/parotiditis-rubéola
1973	Sarampión-parotiditis
1977	Neumocócica (14 serotipos)
1981	Meningocócica A + C + Y + W135
1991	Difteria-tétanos-tos ferina acelular
1992	Difteria-tétanos-tos ferina-Hib
1995	Hepatitis A-hepatitis B
1996	Difteria-tétanos-tos ferina acelular-Hib, hepatitis B-Hib
1998	Rotavirus tetravalente (1999)
2000	Difteria-tétanos-tos ferina acelular-Hib-poliomielitis inactivada
2001	Difteria-tétanos-tos ferina acelular-Hib-poliomielitis inactivada-hepatitis B

*Año de retirada.

1. Disminución de inoculaciones con menor sufrimiento y ansiedad para el receptor y sus tutores. Este hecho es particularmente notable en países donde no se encuentra muy extendida la utilización de vacunas combinadas debido a las restricciones impuestas por las autoridades que regulan su administración. En Estados Unidos, en las 3 primeras visitas a los puestos de vacunaciones (2, 4 y 6 meses), los niños recibían 2 pinchazos en la década de los ochenta (DTP + Hib), 3 al inicio de los noventa (DTP + Hib + HB), 4 hacia la mitad de esa década (DTP + Hib + HB + VPI) y 5

en el año 2000 (DTP + Hib + HB+ VPI + Pnc7)^{4,5}, siempre que no reciban la vacuna antigripal inactivada a los 6 meses, cuya administración se sugiere desde el año 2002 para todos aquellos que deseen obtener inmunidad⁶, en cuyo caso, y en esa visita, recibirían 6 pinchazos.

En lo sucesivo y en ausencia de vacunas combinadas disponibles, presumiblemente se incrementará el número de inoculaciones a medida que se introduzca la vacuna antimeningocócica conjugada frente al serotipo C, la vacuna frente a la hepatitis A y la vacuna frente al virus respiratorio sincitial⁷. Este aumento del sufrimiento asociado al aumento del número de pinchazos no sólo es un motivo de preocupación para los padres sino también para los sanitarios^{8,9}.

2. Menos visitas al puesto de vacunación, lo que conlleva una disminución de los costes sociales asociados a la vacunación.

3. Mejora de las coberturas asociadas a la mejor aceptabilidad de los programas de vacunación por parte de los padres y los sanitarios¹⁰. En este punto no todos los autores están de acuerdo, ya que las barreras a la recepción de vacunas, en algunos países, no son únicamente las derivadas del número de pinchazos, sino también del índice de pobreza existente y sus factores asociados¹¹.

4. Menores costes asociados al transporte del material inmunizante y al almacenamiento¹².

5. Menores costes por administración, al disminuir los actos sanitarios y el consumo de jeringas y agujas.

Desde la perspectiva del vacunador, en sentido estricto y al menos desde una perspectiva teórica, la existencia de vacunas combinadas también puede tener algunas desventajas¹¹:

Polifarmacia. El uso de vacunas combinadas probablemente conlleve el aumento del número de vacunas en los almacenes, pues habrá que disponer de preparaciones monovalentes (vacuna de hepatitis B para preadolescentes, para adultos de riesgo y para recién nacidos hijos de madres portadoras; vacuna de difteria y tétanos para lactantes en los que esté contraindicada la vacuna frente a la tos ferina; vacuna frente a la enfermedad invasora por *Haemophilus influenzae* tipo b para aquellos que se incorporen tarde al calendario y para niños inmigrantes; vacuna combinada hepatitis A-hepatitis B de uso habitual en poblaciones seleccionadas...). Por consiguiente, las vacunas combinadas no reemplazarán a las monovalentes, sino que se unirán a ellas, por lo que, al menos teóricamente, aumentaría el inventario y las pérdidas.

Errores. Algunas vacunas combinadas, al menos con las fichas técnicas actuales de algunos preparados, no pueden simultanearse entre ellas, y otras no pueden utilizarse en situaciones específicas (vacuna hexavalente con 5 µg de antígeno de superficie de hepatitis B en el caso de hijos de madres portadoras). Por otra parte, la existencia de varias vacunas frente a la difteria, el tétanos y la tos ferina (DTPa, dT, dTpa, DT), por ejemplo, incrementa la posibilidad de que se produzcan errores vacunales a medida que aumente la sopa de letras de las abreviaturas.

Reacciones adversas. El aumento de los antígenos incluidos en una vacuna puede conllevar, en el caso de un efecto adverso presuntamente relacionado con la vacuna, que no se sepa cuál de los antígenos ha sido el causante, lo que a la postre puede conducir al rechazo de las vacunaciones ulteriores por desconocer el agente causal.

Complejidad de registros vacunales y de fichas técnicas. En el caso de disponer de un sistema informatizado de registros de vacunación, surgiría la duda entre introducir uno a uno los antígenos individuales contenidos en una vacuna, en bloque o por nombre comercial. La introducción de códigos de barras en los viales minimizaría los errores en el registro^{13,14}.

Provisión de servicios. En los sistemas sanitarios en los que el vacunador percibe honorarios en función de cada acto vacunal, las combinadas podrían verse penalizadas a no ser que se incrementara el reembolso al proveedor si utilizara estas vacunas en lugar de los antígenos individuales.

Sobrecarga del sistema inmunitario. Al mezclar varios antígenos en una combinación podría existir la preocupación teórica de que sobrecargarían el sistema inmune con una menor inmunogenicidad subsiguiente de uno o varios antígenos. Analizando la sobrecarga de antígenos proteicos o polisacáridos en los últimos 40 años, se comprueba cómo actualmente la carga antigénica por acto vacunal es menor que hace años; así, el número de éstos ha pasado de 3.217 en 1986 a 123-126 en el año 2000⁵, manteniéndose la inmunogenicidad de los preparados.

No obstante, se ha descrito la llamada «supresión epitópica por carrier»¹⁵ al administrar simultánea o concomitantemente antígenos que comparten el mismo transportador proteico, aunque, en general, este hecho no se traduce en una menor efectividad clínica^{16,17}. Otros investigadores han encontrado, por el contrario, que en estas situaciones puede haber un estímulo antigénico con mejores respuestas inmunitarias¹⁸.

Dificultades en el desarrollo de las vacunas combinadas

Una vacuna combinada no es la resultante de una simple unión de dos o más antígenos; es una nueva vacuna y, en este sentido, tiene que someterse a una revisión regulatoria y a una aprobación de comercialización¹⁹. Entre los antígenos puede haber interferencias cuya resultante es la disminución de las potencias de uno o todos sus componentes, así como su estabilidad. Las interferencias pueden ser de tipo físico (temperatura máxima de potencia óptima), de tipo químico entre los distintos adyuvantes, preservantes, inactivadores o estabilizantes²⁰ (incompatibilidad entre las vacunas de DTP y las de VPI por la presencia o ausencia de timorosal)²¹, por interferencia inmunológica y por interferencia biológica entre agentes atenuados²². En estas situaciones la respuesta inmunitaria tras la administración combinada de uno o más de los productos ha sido inferior a la que se obtuvo tras la administración individual.

Por tanto, en el proceso de elaboración de la combinación se deberá prestar especial atención a los siguientes aspectos: *a)* el preservante utilizado, en qué cantidad y qué impacto tendrá en la estabilidad y en la potencia, ya que la mezcla de una vacuna con adyuvante con otra que no lo lleva puede desplazarlo de la primera vacuna con la consiguiente pérdida de potencia; *b)* la compatibilidad de un adyuvante con todos los componentes en relación con la adsorción o a la posible desadsorción; *c)* el «test de potencia» o la capacidad de un producto de obtener un resultado predeterminado en el laboratorio o en la clínica; una vez establecido aquél para un

componente de la vacuna, habrá que reevaluarlo en el contexto de una vacuna combinada para asegurar que los antígenos adicionales, los adyuvantes o los excipientes no modifican los resultados de las pruebas individuales; d) al «test de identidad» mediante el cual se debe distinguir el probando de cualquier otro producto elaborado en el mismo laboratorio; e) la estabilidad una vez reconstituidos los componentes en el caso de que la combinación tenga lugar en el momento de la administración al receptor, y f) la consistencia entre, como mínimo, 3 lotes del producto final²².

Escollos en la comercialización y el uso de las vacunas combinadas

En definitiva, los escollos en el desarrollo de las vacunas combinadas son de una gran magnitud. No sólo hay que tener en cuenta las dificultades que provienen de los aspectos ya mencionados, sino que, aunque aún no han sido probados hasta la fecha, un número significativamente mayor de efectos adversos podrían asociarse con los componentes individuales. Por tanto, los costes económicos y en tiempo van a ser muy importantes para el desarrollo de una vacuna combinada, lo que se traduce en un precio del producto final generalmente superior al de la suma de los componentes individuales.

En Estados Unidos, con una disponibilidad de vacunas combinadas sensiblemente inferior a la del mercado europeo, se plantearon en una reunión internacional patrocinada por el National Institutes of Health, en el año 2000, una serie de retos relacionados con el desarrollo, la comercialización y el uso de las vacunas combinadas²³:

1. ¿Qué estándar inmunológico debe emplearse para evaluar las nuevas vacunas combinadas? Para aquellas enfermedades de las que se conocen los parámetros séricos subrogados de protección, se propuso que los títulos alcanzados por una vacuna combinada se encontraran en el $\pm 10\%$ de los conseguidos tras la administración individual del mismo preparado y no de ese mismo antígeno pero con distinta formulación (p. ej., Hib-PRPT y Hib-PRPCR₁₉₇). El problema surgiría cuando utilizásemos varios antígenos para evitar una enfermedad; además, es incierta la respuesta que se asocia con la protección clínica (tos ferina).

2. ¿Cómo se desarrollan los subrogados serológicos de protección y cómo deben interpretarse? En general, la existencia de un marcador sérico permite la comercialización de una nueva vacuna en función de la inmunogenicidad (media geométrica del título de anticuerpos y actividad bactericida sérica en el caso de la vacuna antimeningocócica conjugada frente al serogrupo C en el Reino Unido), pero últimamente se están considerando otros marcadores, como la inmunidad mucosa, la inmunidad celular, la capacidad de impregnar el sistema inmune con las series primarias de vacunación (*priming*), la medición de las subclases de IgG y la avidéz y la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno.

3. ¿Cuál es el tamaño de la muestra adecuado y realista en los ensayos previos a la comercialización? Evidentemente, variará en función de si se trata de nuevos antígenos o si ya estaban comercializados con anterioridad. Se sugirió que para las fases III un tamaño adecuado sería aquel que detectara un incremento 2 o 3 veces superior de los supuestos efectos adversos con una frecuencia

igual o superior al 1%. El problema radicaría en que si el tamaño de la muestra debe ser muy amplio se originaría un obstáculo para el desarrollo de una vacuna que podría proporcionar un sustancial beneficio en términos de salud pública. Para obviar esta situación se propuso la recogida de datos de seguridad de múltiples estudios, la realización de estudios escalonados en un escaso número de sujetos con posibilidad de efectuar estudios más amplios en caso de registrar efectos adversos y el establecimiento de un «puente» entre la fase III (precomercialización) y la fase IV (poscomercialización), de tal manera que se siguieran recogiendo datos de seguridad una vez comercializada la vacuna pero antes de emitir recomendaciones de uso por los organismos competentes. Aunque sí se llegó a un consenso respecto a los siguientes aspectos: «Cuando se evalúen los riesgos y los beneficios de las vacunas, independientemente del tamaño de la muestra, es necesario elaborar juicios subjetivos del riesgo de la enfermedad, los riesgos conocidos que se deriven de los efectos adversos y las alternativas disponibles de prevención. El beneficio de evaluar la seguridad con más precisión, para que se pueda tomar una decisión con mucha más información, debe contraponerse al riesgo de retrasar o denegar la introducción de una nueva vacuna que resulta efectiva».

4. ¿Debe ser diferente el estándar de seguridad y efectividad de las vacunas combinadas que incluyen antígenos ya comercializados respecto a las vacunas combinadas con antígenos no comercializados? Existió consenso en exigir un tamaño mayor de la muestra para aquellos antígenos no comercializados previamente.

5. ¿Cómo pueden monitorizarse en la fase IV los infrecuentes efectos adversos de una vacuna? Habría que fomentar la utilización de los registros informatizados de vacunación, los sistemas pasivos de declaración, las bases amplias de datos relacionadas y los estudios epidemiológicos.

No menos importante, desde la perspectiva farmacéutica, es la combinación que se debe desarrollar: ¿para una/s enfermedad/es con gran morbimortalidad y altamente prevalente/s en países en vías de desarrollo que tendrían dificultades para adquirirla?, ¿para una/s enfermedad/es con menor mortalidad pero prevalente/s en un país desarrollado?, ¿una vacuna con una vida media larga o de corta vida media pero de gran potencial de ventas?, ¿para qué grupo de edad/es? En cuanto al grupo de edad se pueden diseñar, entre otras, vacunas para recién nacidos (hepatitis B, tos ferina acelular, *Streptococcus agalactiae*), para lactantes (difteria, tétanos, tos ferina acelular, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* b, poliomiéltis, meningococo, neumococo, virus respiratorio sincitial), para niños (difteria, tétanos, tos ferina acelular, sarampión, rubéola, parotiditis y varicela), para adolescentes (difteria, tétanos, tos ferina acelular, hepatitis A y B), para adultos (difteria, tétanos y tos ferina acelular), para ancianos (neumocócica, gripe y virus respiratorio sincitial), para viajeros (hepatitis A, *Escherichia coli*, cólera, *Salmonella*, *Shigella*) o una vacuna para embarazadas (*Streptococcus agalactiae*, citomegalovirus, tétanos, gripe, *H. influenzae* b, tos ferina, neumococo y virus respiratorio sincitial).

Vacunas combinadas: el presente

A pesar de las dificultades en el desarrollo y en la comercialización expuestas anteriormente, en la actualidad en el mercado mundial se encuentra gran cantidad de vacunas combinadas, algunas

de ellas utilizadas con gran profusión. Casi todas ellas tienen el componente difteria, tétanos y tos ferina acelular como integrante básico (tabla 2).

Una de las características más llamativas de las combinaciones que incluyen la vacuna acelular de la tos ferina y la vacuna frente a *H. influenzae* tipo b, ha sido el menor título de anticuerpos frente al PRP capsular respecto de la administración simultánea pero no combinada de ambos. Este hecho, que en principio fue motivo de preocupación –incluso hoy día es el factor limitante para su utilización en las series primarias de vacunación en Estados Unidos²⁴– parece que no se correlaciona con una menor efectividad clínica tal como se ha puesto de manifiesto en países donde forma parte de los calendarios rutinarios de vacunación^{17,25}, ya que lo realmente importante no parece ser las titulaciones de los anticuerpos sino su funcionalidad y la capacidad de la vacuna conjugada frente a *H. influenzae* tipo b de generar memoria inmunológica²⁶.

Vacunas combinadas: el futuro

Las perspectivas respecto de la no muy lejana comercialización de otras vacunas combinadas son muy halagüeñas. Para España y otros países occidentales se exponen a continuación las que pueden ver la luz a corto plazo y que tendrían un gran interés, por ir dirigidas a prevenir enfermedades de alta morbimortalidad:

1. Vacuna combinada antineumocócica conjugada heptavalente (PnC7-CRM₁₉₇) con anti-*H. influenzae* tipo b (HbOC-CRM₁₉₇). En ensayos clínicos en los que los lactantes han recibido, como series primarias (2, 3 y 4 meses), estas vacunas combinadas, o bien separadas pero simultáneas, y se ha comparado la respuesta inmunitaria con controles (DTP-HbOC) que reciben la antineumocócica conjugada a los 5, 6 y 7 meses, se ha observado cómo tras la revacunación en el segundo año de vida con la vacuna antineumocócica polisacárida simple no existían diferencias significativas en los títulos frente a los 7 serotipos neumocócicos entre los 3 grupos. Curiosamente, a los 5 meses, los anticuerpos anti-PRP y antidiftéricos eran superiores en los grupos de vacuna combinada (PnC7-HbOC) y de vacuna separada (PnC7 + HbOC) respecto al grupo control, probablemente por un fenómeno de estimulación epitépica²⁷.

2. Vacuna combinada antineumocócica conjugada nonavalente (PnC9-CRM₁₉₇) con antimeningocócica conjugada C (MencC-

CRM₁₉₇). Los resultados de este ensayo, cuyas características más relevantes se exponen en la tabla 3, demuestran que esta combinación puede ser una realidad, mientras que cuando se le añade HbOC-CRM₁₉₇ descienden significativamente los anticuerpos anti-PRP y anticapsulares del meningococo del serogrupo C²⁸.

3. Vacuna combinada sarampión-rubéola-parotiditis y varicela. Los últimos ensayos clínicos disponibles apuntan a que los títulos de anticuerpos y la inmunidad celular que miden la linfoproliferación y el interferón-gamma que se alcanzan para las cuatro enfermedades son similares a los que se obtienen tras la administración simultánea, en distinto lugar anatómico, de la vacuna triple vírica y la de la varicela^{29,30}, aunque la reactogenicidad sistémica (temperatura rectal superior a 39,5 °C), al menos para uno de los preparados que se encuentran en fase de ensayo clínico, es ligeramente más elevada en la administración combinada respecto a la simultánea³¹.

Vacunas multivalentes

En esta línea, es importante destacar la seguridad y la inmunogenicidad que ha demostrado la obtención de una vacuna conjugada de 4 serogrupos capsulares de *Neisseria meningitidis*, siendo probable su próxima comercialización mundial^{32,33}. Una vez resueltos los interrogantes planteados con su seguridad, es probable que también se comercialice la vacuna antigripal atenuada e intranasal, obtenida por reasortamiento^{34,35}.

Conclusiones

Las vacunas combinadas han prestado hasta hoy un servicio extraordinario, pero es ahora cuando realmente se abre una nueva era con la síntesis de nuevos preparados. Para conseguir la máxima seguridad y efectividad, así como para acortar el tiempo de desarrollo de la nueva combinación, es muy importante la estrecha colaboración entre la industria farmacéutica y las autoridades sanitarias para la búsqueda de fórmulas en el desarrollo de las vacunas combinadas en la pre y la poscomercialización que faciliten su incorpo-

TABLA 2
Vacunas combinadas comercializadas

Vacunas combinadas comercializadas en España	Vacunas combinadas comercializadas fuera de España
Hepatitis A-hepatitis B	Hepatitis B-Hib (PRP-OMP)
DTP-Hib	DTP-Hib-VPI
DTP-HB-Hib	DTP-VPI
DTPa-Hib	DTPa-HB
DTPa-Hib-VPI	DTPa-VPI
DTPa-VPI-HB	dTpa-VPI*
DTPa-Hib-VPI-HB	HA-ViCPS
dTpa	

*Antífóidea inactivada de polisacárido.

TABLA 3
Vacunas combinadas PnC9-MencC-HbOC*

Antígeno	PnC7-HbOC (GMC tras la tercera dosis, µg/ml)	PnC9-MencC-HbOC (GMC tras la tercera dosis, µg/ml)	PnC9-MencC + HbOC (GMC tras la tercera dosis, µg/ml)
Pn4	2,55	2,27	2,14
Pn6B	4,53	6,08	5,03
Pn9V	1,49	1,58	1,36
Pn14	5,65	6,23	5,33
Pn18C	2,36	1,91	1,69
Pn23F	2,03	1,92	1,56
Pn1	0,05	4,14	4,07
Pn5	0,17	1,78	1,88
PRP	15,96	11,97	4,52
MencC	0,06	4,63	3,76

*948 lactantes vacunados a los 2, 4 y 6 meses, coincidiendo con el resto de vacunas rutinarias (DTPa, HB, VPI). Tomada de Rennels et al²⁸.

ración en los calendarios rutinarios, de tal manera que se mantenga la progresión de lo que comenzó con una combinación de 2 antígenos en 1949.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rennels M. Combination vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:255-7.
2. Children's Vaccine Initiative. Combination vaccines- juggling with the options. *CVI Forum* 1998:16.
3. Gorlick G. Are we turning kids into pincushions? *Contemp Ped* 1991;8:23.
4. Decker M. Principles of pediatric combination vaccines and practical issues related to use in clinical practice. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:S10-8.
5. Ofit P, Quarles J, Gerber M, Hackett Ch, Marcuse E, Kollman T, et al. Addressing parents concerns: do multiple vaccines overwhelm or weaken the infant's immune system? *Pediatrics* 2002;109:124-9.
6. Advisory Committee on Immunization Practices. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:1-34.
7. Glodé M. Combination vaccines: practical considerations for public health and private practice. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:S19-22.
8. Woodin K, Rodewald L, Humiston Sh, Carges M, Schaffer S, Szilagy P. Physician and parent opinions. Are children becoming pincushions from immunizations? *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995;149:845-9.
9. Melman Sh, Nguyen T, Ehrlich E, Schorr M, Anbar R. Parental compliance with multiple injections. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999;153:1289-91.
10. American Academy of Pediatrics. Combination vaccines for childhood immunizations: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), the American Academy of Pediatrics (AAP), and the American Academy of Family Physicians (AAFP). *Pediatrics* 1999;103:1064-77.
11. Le Ch. Combination vaccines: choices or chaos? A practitioner's perspective. *Clin Infect Dis* 2001;33:S367-71.
12. Urbitzondo L, Peña A, Boldú M, Taberner J, Batalla J. Implicaciones logísticas de la evolución de los calendarios de vacunación y de las presentaciones de las vacunas. *Vacunas* 2001;2:58-63.
13. Heijbel H. Improving vaccine safety through the use of immunisation registers and bar code labelled vaccines. *Vaccine* 2002;20:S75-7.
14. Maurer W, OMLC Vaccine Nomenclature Drafting Group. Vaccine nomenclature: the three-letter code. *Vaccine* 2000;18:1539-42.
15. Dagan R, Eskola J, Leclerc C, Leroy O. Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants. *Infect Immun* 1998;66:2093-8.
16. Poolman J, Kaufhold A, De Grave D, Goldblatt D. Clinical relevance of lower response in DTPa-based combination vaccines. *Vaccine* 2001;19:2280-5.
17. Schmitt H, Von Kries R, Hassenpflug B, Hermann M, Siedler A, Niessing W, et al. *Haemophilus influenzae* type b disease: impact and effectiveness of diphtheria-tetanus toxoids-acellular pertussis (-inactivated poliovirus)/*H. influenzae* type b combination vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:767-74.
18. Mbelle N, Huebner R, Wasas A, Kimura A, Chang I, Klugman K. Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1999;171:1-6.
19. US Food and Drug administration. Guidance for industry for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: production, testing and clinical studies (April 1997) [consultado 15/12/1998]. Disponible en: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/combvacc.txt>
20. Vose J. Regulatory considerations for developers. En: Ellis RW, editor. *Combination vaccines*. Totowa: Humana Press, 1999; p. 213-33.
21. Insel R. Potential alterations in immunogenicity by combining or simultaneously administering vaccine components. *Ann N Y Acad Sci* 1995;754:35-47.
22. Falk L, Arciniega J, McVittie L. Manufacturing issues with combining different antigens: a regulatory perspective. *Clin Infect Dis* 2001;33:S351-5.
23. Postema A, Myers M, Breiman R. Challenges in the development, licensure, and use of combination vaccines. *Clin Infect Dis* 2001;33:S261-6.
24. Advisory Committee on Immunization Practices, American Academy of Pediatrics, American Academy of Family Physician. Recommended Childhood Immunization Schedule - United States, 2000. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:35-9.
25. Scheifele D, Halperin S. *Haemophilus influenzae* type b disease control using Pentacel, Canada, 1998-1999. *Canada Commun Dis Rep* 2000;26:93-8.
26. Eskola J, Ward J, Dagan R, Goldblatt D, Zepp F, Siegest C. Combined vaccination of *Haemophilus influenzae* type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis. *Lancet* 1999;354:2063-8.
27. Choo S, Seymour L, Morris R, Quataert S, Lockhart S, Cartwright K, et al. Immunogenicity and reactogenicity of a pneumococcal conjugate vaccine administered combined with a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in United Kingdom infants. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:854-62.
28. Rennels M, Reisinger K, Rathore M, Corsaro B, Chang I, Watson W. Safety and immunogenicity of combined conjugate 9-valent S pneumoniae-meningococcal group C (9vPnC-MnCC) and *H. influenzae* b-9vPnC-MnCC (HbOC-9vPnC-MnCC) vaccine. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, December 16-19, 2001. Presentation number 2039.
29. Shinefield H, Black S, Reisinger K, Blatter M, Desrosiers E, Wetzler J, et al. Evaluation of a new formulation of a quadrivalent measles, mumps, rubella and varicella (MMRV) vaccine in healthy infants. 34th National Immunization Conference. Washington DC, July 8, 2000. Presentation number 194.
30. Zepp F, Meyer C, Habermehl P, Koutsoukos M, Steens J, Beckers F. Cellular immune response to varicella in healthy subjects 12 to 22 months old receiving either a combined measles-mumps-rubella-varicella vaccine or separate measles-mumps-rubella and varicella vaccines. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, December 16-19, 2001. Presentation number 1560.
31. Zepp F. MMR V and Beyond. En: Abstract book. Vaccination in progress. Berlin, October 26-27, 2000.
32. Rennels M, King J, Papa T, Wubbel L, Froeschle J. Safety and immunogenicity of tetravalent conjugate meningococcal conjugate vaccine (TetraMenD) in toddlers. 39th Annual Meeting of IDSA. San Francisco, October 25-28, 2001. Presentation number 368.
33. Steens JM. MMRV, progress to date. In: Abstract Book of the 23th International Congress of Pediatric Infectious Diseases. Beijing, September 9-14, 2001.
34. Beyer W, Palache A, De Jong J, Osterhaus A. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy. A meta-analysis. *Vaccine* 2002;20:1340-53.
35. FDA panel does not recommend approval of FluMist. An FDA advisory committee wants more analysis of data before recommending licensure. *Infectious Diseases of Children*, August 2001. Disponible en: <http://www.idinchildren.com/200108/flumist.asp>