



UNIVERSIDAD DE BURGOS

EL DESARROLLO DE LAS VACUNAS EN LA MEJORA DE LA SALUD INFANTIL

TESIS DOCTORAL

D. José Manuel Merino Arriba

DIRECTOR

Dr. D. Juan Arnáez Solís

UNIVERSIDAD DE BURGOS

Doctorado en Avances en Ciencia y Biotecnología Alimentarias

A mi mujer y a mis hijos por su apoyo continuo

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
1. Carga de la mortalidad infantil en el mundo	7
2. La inmunización, una estrategia costo-efectiva	10
3. Historia de las vacunas	12
4. Vacunas. Conceptos generales	16
5. Papel de la industria. Proceso de elaboración de vacunas	17
6. Calendarios de vacunación. Historia de la vacunación en España y Castilla y León	19
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
1. Hipótesis	30
2. Objetivos	30
RESULTADOS	31
1. Optimización del proceso de producción de vacunas: el paradigma de la vacuna antigripal	33
2. Vacunación de la madre y el recién nacido	41
a. Vacunación en el recién nacido	41
b. Vacunación durante la gestación	45
3. Vacunas combinadas: el ejemplo de las vacunas hexavalentes	58
4. Vacunas conjugadas: Neumococo y Meningococo	67
a. Streptococco pneumoniae. Vacunas antineumocócicas conjugadas	69
b. Neisseria meningitidis. Vacunas antimeningocócicas	81
PERSPECTIVAS FUTURAS	96
CONCLUSIONES	106
BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXO	129

INTRODUCCIÓN

1. Carga de la mortalidad infantil en el mundo

Las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. De los 58,7 millones de fallecidos notificados por la OMS en el año 2004, 9,5 millones fueron atribuidas a enfermedades infecciosas o parasitarias (neumonía, meningitis, diarrea, tuberculosis, sarampión e infección por VIH). Según las últimas estimaciones publicadas por el Grupo Interinstitucional de las Naciones Unidas para la Estimación de la Mortalidad Infantil (UN IGME) a lo largo de 2021 unos 5 millones de niños murieron antes de cumplir cinco años (siendo las causas más frecuentes las infecciosas, las complicaciones por parto prematuro y la asfixia perinatal) y otros 2,1 millones de niños y jóvenes de entre 5 y 24 años perdieron la vida. En ese periodo 1,9 millones de bebés nacieron muertos durante el mismo período. Lamentablemente, muchas de estas muertes podrían haberse evitado con un acceso equitativo y una atención de salud materna, neonatal, adolescente e infantil de alta calidad (1, 2). Dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la OMS para el año 2030 (3), el objetivo 3.2 es reducir la tasa de mortalidad infantil al menos al 2,5 % en todos los países para 2030. Esto significaría que más del 97,5 % de todos los recién nacidos sobrevivirían los primeros cinco años de su vida sin importar dónde nacieran.

Actualmente estamos lejos de la meta para 2030. A nivel mundial, el 3,9% de todos los niños mueren antes de cumplir los cinco años, lo que significa que en promedio mueren 15.000 niños cada día. En 2015, de los 5,9 millones de muertes de menores de 5 años, 2,7 millones (45%) ocurrieron en el período neonatal (primeros 28 días de vida) (1). El 99% de las muertes en los niños se dan en países de bajos y medios ingresos. La malnutrición contribuye en el 45% de los casos (4). Las causas principales son complicaciones relacionadas con la prematuridad (1,055 millones), neumonía (0,921 millones) y relacionados con el parto (0,691 millones) (5,6). Se espera que el número de nacimientos en el mundo se estanque entre 2015 y 2030 en alrededor de 140 millones de nacimientos por año. Si asumimos que la tasa mundial de mortalidad infantil se mantiene en el nivel que tenía al comienzo de la era de los ODS (4,5 %), viviríamos en un mundo con 6,3 millones de muertes infantiles cada año, 100 millones de muertes infantiles hasta 2030.

La mayoría de las muertes postneonatales fueron debidas a infecciones y accidentes. Neumonía, diarrea, lesiones y malaria son responsables de aproximadamente el 60% de los casos de muertes postneonatales (7,8).

Estrechamente relacionadas con estas causas se encuentran dos factores, uno la malnutrición y otro, la salud de la madre, especialmente durante el periodo de embarazo, parto y lactancia (4). El binomio madre-hijo/a son inseparables en términos de salud ya que la salud de aquella será clave para que el feto y después recién nacido tenga las máximas oportunidades de un desarrollo óptimo ulterior. La desnutrición, incluida la falta de suficientes macronutrientes (proteínas, calorías), dietas deficientes en micronutrientes (vitamina A, zinc, hierro), y prácticas de lactancia materna subóptimas, contribuye al 45% de todas las muertes infantiles. La desnutrición aumenta la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas y se asocia con secuelas a largo plazo, como retraso cognitivo, retraso escolar y enfermedades no transmisibles en la edad adulta (9).

Las enfermedades infecciosas se dan sobre todo en países con bajos ingresos (10). La vivienda deficiente, la falta de acceso a agua potable y saneamiento y el control inadecuado de los vectores contribuyen a la transmisión eficiente de estas infecciones. Otros determinantes sociales (por ejemplo, desigualdad de género, desempleo, bajo nivel educativo, mala nutrición) agravan aún más el problema.

Desde 1990, la tasa de mortalidad mundial de menores de cinco años ha caído un 53%, de 91 muertes por cada 1.000 nacidos vivos en 1990 a 43 por 1000 nacidos vivos en 2015 (11- 13). En España entre 1980 y 2011 la tasa media de mortalidad por enfermedades infecciosas fue de 48,5 por 100000 habitantes (14). En el año 2010 las causas maternas, neonatales y nutricionales fueron responsables del 24,9% de muertes en el mundo, un 34,1% menos (15.9 millones) que en 1990 (46.5 millones) (15). La mortalidad en los países industrializados ha disminuido considerablemente debido a un conjunto de factores asociados al desarrollo, como un mejor saneamiento, un aumento de la población urbana y disminución de la rural, mejoras en infraestructura, nutrición, y avances biotecnológicos, particularmente en el campo de las vacunas y medicamentos antimicrobianos (16). Esta reducción se refleja principalmente en la disminución de la mortalidad infantil. Sin embargo, existe una variación de la mortalidad año a año (17) y han aparecido otras amenazas para la salud humana relacionadas con la

emergencia de nuevas enfermedades infecciosas, principalmente debido a cambios ambientales y climáticos, viajes y comercio, comportamientos humanos, nuevas tecnologías, adaptación microbiana e inmunidad alterada por el huésped (fiebres hemorrágicas, virus Ebola, Virus Zika, Coronavirus) (1, 6, 18). En países industrializados como Holanda la máxima carga anual de enfermedad infecciosa corresponde a la enfermedad invasora neumocócica y a la gripe con un 16% y un 15% respectivamente (19). Estas continuas amenazas obligan a realizar vigilancia y control de enfermedades infecciosas específicas.

Más de la mitad de las muertes de niños menores de cinco años se deben a enfermedades prevenibles y tratables mediante intervenciones simples y asequibles (20, 21). Estrategias en salud orientadas a fortalecer las medidas preventivas de los niños y de las madres embarazadas, serán claves para mejorar las tasas de mortalidad en los menores de 5 años, sobre todo en áreas rurales u hogares pobres o si sus madres se vieron privadas de educación básica. La educación materna es esencial. La inmunización es mayor en los niños cuyas madres han recibido educación, en parte porque la educación materna conduce a la adquisición de habilidades de alfabetización y una mayor tendencia a la búsqueda de la salud, lo que mejora la aceptación de la inmunización por parte de sus hijos (22). El estatus socioeconómico es un factor adicional, pero con efectos indirectos menos importantes.

Entre los Objetivos de Desarrollo Sostenible (3) que tratan de reducir la mortalidad infantil en menores de 5 años a 25 muertes por 1000 nacidos vivos para el año 2030 se encuentran distintas iniciativas, entre ellas las que buscan reducir las enfermedades infecciosas causantes de alta mortalidad como son el sarampión, poliomielitis, difteria, tétanos, tosferina, la neumonía por *Haemophilus influenzae* tipo b o *Streptococcus pneumoniae* o la diarrea por rotavirus.

Para la consecución de estos objetivos de reducción de la mortalidad infantil, la OMS promueve cuatro estrategias principales:

1. Cuidado domiciliario apropiado y tratamiento oportuno de las complicaciones en los recién nacidos;
2. Atención integrada a las enfermedades infantiles en todos los menores de 5 años;
3. Programa ampliado de inmunización;
4. Alimentación del lactante y del niño pequeño.

Estas estrategias relacionadas con la salud infantil se complementan con intervenciones dirigidas a la salud materna, en particular la atención cualificada durante el embarazo y el parto.

2. La inmunización, una estrategia costo-efectiva

La inmunización es una estrategia clave para prevenir enfermedades, discapacidades y fallecimientos por enfermedades prevenibles tales como el cáncer cervical, la difteria, la hepatitis B, el sarampión, la parotiditis, la tosferina, la neumonía, la poliomielitis, las enfermedades diarreicas por rotavirus, la rubeola y el tétanos.

Es la intervención sanitaria preventiva más costo-efectiva y evita entre 2 y 3 millones de muertes anuales por difteria, tétanos, tosferina y sarampión. Sin embargo, si se mejorara la cobertura vacunal mundial se podrían evitar otros 1,5 millones.

A excepción de la potabilización del agua, ninguna otra medida, ni siquiera los antibióticos, ha contribuido a disminuir la morbilidad y la mortalidad en la especie humana como las vacunaciones. El objetivo final de la inmunización es el control de la transmisión de infecciones, la eliminación de enfermedades y, finalmente, la erradicación del patógeno que causa la infección y la enfermedad. Los programas sistemáticos de vacunación han permitido la erradicación de la viruela, el virus salvaje de la polio tipo 2 y el virus salvaje de la polio tipo 3, la interrupción de la transmisión de la poliomielitis en casi todo el mundo, así como el control de enfermedades como el sarampión, el tétanos, la difteria, la rubeola o la enfermedad invasora por *Haemophilus influenzae* (23).

Las vacunas son útiles para prevenir y controlar muchas enfermedades infecciosas y, cada vez más, varias enfermedades crónicas causadas por agentes infecciosos. Además, permite la consecución de prioridades nacionales como la educación y el desarrollo económico (24). La introducción de las vacunas en los programas nacionales de inmunización ha tenido como consecuencia una reducción sustancial de la incidencia de las enfermedades inmunoprevenibles en el mundo (24).

Por otro lado, las vacunas podrían tener efectos beneficiosos no específicos en

la salud, no relacionados con la prevención de la enfermedad diana (25). En países de bajo nivel socioeconómico se ha demostrado que la vacunación frente al sarampión se asocia a una reducción sustancial (30-86%) de la mortalidad por todas las causas en niños, mayor que la disminución de la mortalidad por sarampión. Estos resultados de efectos beneficiosos no específicos de las vacunas se han demostrado en otras regiones y para otras vacunas: BCG, DTP, OPV (26, 27).

El mecanismo que podría explicar el potencial efecto beneficioso no específico de las vacunas en la supervivencia de los niños incluye efectos en los linfocitos T heterólogos, estimulación de la inmunidad innata y reprogramación genética de los monocitos (25).

En el año 2010 se propuso la iniciativa del “Decenio de las Vacunas”, cuyo objetivo fue que todas las personas disfrutaran de los beneficios de la vacunación en el año 2020 reforzando la inmunización sistemática, acelerando el control de las enfermedades prevenibles mediante vacunación, introduciendo nuevas vacunas y estimulando la investigación y el desarrollo de la próxima generación de vacunas y tecnologías (21). Además, las vacunas pueden contribuir a limitar la propagación de la resistencia a los antibióticos.

No obstante, la cobertura vacunal global es inferior al 90%. Casi 13 millones de niños en todo el mundo, lo que equivale a uno de cada diez, no recibieron ninguna vacuna en 2016, según nuevos datos de UNICEF y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esto significa que los menores no fueron inmunizados con la primera dosis de difteria, tétanos y tosferina y estarían en grave riesgo de sufrir esas enfermedades que son potencialmente mortales. Unos 6.6 millones de niños que sí recibieron esta primera dosis, no completaron la serie de tres inmunizaciones, comprometiendo la efectividad del tratamiento preventivo (28).

Desde 2010, el porcentaje de menores que recibieron vacunación completa se ha estancado en un 86%. La cifra está por debajo de la meta global de cobertura de inmunización que es un 90%. La mayoría de los niños que permanecen sin vacunarse son los mismos que son ignorados por los sistemas de salud. Actualmente, las vacunas previenen entre 2 y 3 millones de muertes cada año a causa de la difteria, el tétanos, la tosferina y el sarampión. Para la OMS, esta es una de las intervenciones de salud pública más exitosa y rentable (28).

3. Historia de las vacunas

Las vacunas son intervenciones preventivas o terapéuticas que reducen la morbimortalidad por enfermedades infecciosas, tienen un papel importante en la lucha contra la resistencia a los antibióticos, constituyen un área en desarrollo en el tratamiento y prevención de otras enfermedades no infecciosas (cáncer, demencia), ofrecen protección a la madre embarazada, al feto y al recién nacido y proporcionan un beneficio a la sociedad además de la protección individual que proporcionan al receptor (21). Los miembros vulnerables de la comunidad cuyos sistemas inmunes son incapaces de responder bien a las vacunas (recién nacidos, personas inmunocomprometidas, adultos mayores) o que no pueden recibir vacunas (debido a una alergia o una contraindicación médica) dependen de la inmunización de los miembros de la comunidad para protegerse contra la enfermedad prevenible por vacunas.

La historia de la vacunación comenzó con el primer reconocimiento de que una persona que sobrevivió a una infección tenía muchas menos probabilidades de sufrir esa enfermedad en el futuro en comparación con una persona que no había tenido la enfermedad previamente. Es decir, la enfermedad infecciosa, si no mataba a la persona, producía un estado de protección (29).

La historia moderna de las vacunas comienza en el siglo XVIII. Desde finales del siglo XIX las vacunas se pudieron desarrollar en el laboratorio. En el siglo XX se desarrollaron vacunas basadas en marcadores inmunológicos. Finalmente, en el siglo XXI la biología molecular permite el desarrollo de vacunas que no sería posible anteriormente (29).

Las primeras vacunas conocidas de las que se tienen registros fueron contra la viruela y se usaron en Asia a principios del segundo milenio. De hecho, no se llamaron "vacunas". La práctica se llamaba variolación e implicaba exponer, generalmente a través de la ruta intranasal, a una persona susceptible a la viruela (no infectada previamente) al material de las costras secas de una persona que había tenido viruela. Si el receptor sobrevivía, él o ella estaban protegidos contra la futura enfermedad de la viruela. Dado que la viruela natural tenía una tasa de mortalidad del 30% y la variolación

tenía una tasa de mortalidad más baja ($\approx 1\%$), esta antigua práctica fue un ejemplo precoz de sopesar la relación riesgo / beneficio para una intervención de salud humana. En 1700, la variolación se empleaba en varias sociedades en África, India y el imperio Otomano, y también en Inglaterra y Francia. La práctica de la variolación no estuvo exenta de riesgos y en ocasiones causó brotes de enfermedad leve (30).

En 1796, un médico inglés estaba buscando una alternativa más segura a la variolación. Este médico llegaría a ser conocido como el padre de la vacunología: Edward Jenner (21, 29, 30). No obstante, la vacunología científica se inició más tarde con Pasteur quien está considerado para algunos el padre de la vacunología, descubriendo en el año 1880 la vacuna frente a la rabia.

Jenner realizó un experimento de vacunación contra la viruela en James Phipps el 14 de mayo de 1796, utilizando como vacuna el pus de viruela de las lesiones en las manos de Sarah Nelmes, una lechera. El Dr. Jenner luego recolectó material de la lesión de un paciente con viruela y lo usó como inóculo viral. El joven Phipps sobrevivió tanto a la vacunación como al inóculo viral, y Jenner informó por primera vez su experimento en 1797 en una breve comunicación a la Royal Society. Después de que el manuscrito inicial de Jenner presentado para su publicación fuera rechazado, agregó algunos casos más de su experimento con la vacuna (incluido uno sobre su propio hijo), y en 1798, informó sus hallazgos en un folleto autoeditado titulado "Una investigación sobre las causas y los efectos de la vacunación antivariólica, una enfermedad descubierta en algunos condados de Inglaterra, particularmente Gloucestershire, y conocida con el nombre de viruela de la vaca" (29).

Este informe autopublicado y el posterior uso de la vacuna contra la viruela bovina por Jenner fueron recibidos con una reacción mixta. El trabajo de Jenner fue considerado controvertido por algunos debido a la introducción de un virus de vaca en humanos. Otros opositores a la vacunación fueron aquellos con intereses financieros en prácticas lucrativas de variolización. Cuando la vacunación en Inglaterra se hizo obligatoria por la Ley de Vacunación de 1853, surgió un movimiento organizado contra la vacunación casi de inmediato de forma similar a lo que ocurre en la actualidad.

La historia de la vacunación entró en su segunda fase en el siglo XIX (29). La teoría que postulaba que las enfermedades infecciosas eran causadas por una forma nociva de

mal aire fue reemplazada gradualmente por el desarrollo de la teoría de los gérmenes según la cual las enfermedades infecciosas eran causadas por microorganismos demasiado pequeños para ser vistos sin aumento. Los experimentos con animales y el cultivo de microbios en laboratorio fueron avances clave relacionados con la teoría de los gérmenes en la segunda mitad del siglo XIX. Robert Koch (1843-1910) y Louis Pasteur (1822-1895) hicieron contribuciones significativas a través de sus numerosas observaciones y experimentos clave en vacunas y enfermedades infecciosas agrícolas y humanas. Los famosos cuatro postulados de Koch establecieron los requisitos para establecer la causalidad de las enfermedades infecciosas por microbios y demostraron que *Bacillus anthracis* era la causa del ántrax. Esto proporcionó la primera prueba de una etiología microbiana de una enfermedad específica.

A través de la atenuación o inactivación de microbios de tipo salvaje, Pasteur produjo vacunas que indujeron protección contra varias enfermedades (26). A principios del siglo XX, se desarrolló la inmunización pasiva como terapia para enfermedades infecciosas. Emil von Bering (1854-1917) realizó experimentos de terapia con suero de animales pequeños que condujeron al desarrollo de terapias con suero humano para la inmunización pasiva y por los que recibió el premio Nobel. En 1900, von Bering utilizó sueros de caballos inmunes para curar y prevenir la difteria causada por *Corynebacterium diphtheriae*.

Durante la segunda mitad del siglo XIX, los científicos descubrieron los mecanismos de defensa del sistema inmunológico (29). En 1924, Gaston Ramon (1886-1963) desarrolló el método de inactivación química de toxinas bacterianas con formaldehído y calor para producir toxoides de las toxinas patógenas de la difteria y el tétanos, produciendo antígenos vacunales más seguros que retuvieron su potencial inmunogénico.

En los años 40, Enders y cols descubrieron métodos para el cultivo de poliovirus mediante cultivo viral en células de cultivo. Esto facilitó, entre otras, el desarrollo de las vacunas antipolio.

El descubrimiento de subestructuras antigénicas y su posterior uso en las vacunas fue otro avance (29). Los estudios de Avery y Lancefield, entre otros, permitieron conocer los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* y la

proteína M de las especies de *Streptococcus* y lograron su caracterización, aislamiento y serotipado de estas estructuras bacterianas y el reconocimiento como antígenos clave en la inmunidad de las enfermedades neumocócicas. Estos hallazgos dieron lugar a la vacunación con componentes (subunidades) de patógenos en oposición a los microbios completos (por ejemplo, los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* o *Neisseria meningitidis* o los antígenos virales de superficie (hemagglutininas) en las vacunas antigripales de subunidades.

Otras vacunas virales vivas atenuadas, como la vacuna contra el sarampión, las paperas y la rubéola (MMR), se desarrollaron en la segunda mitad del siglo XX y se convirtieron en elementos básicos de los programas de vacunación infantil en todo el mundo (29). Más adelante en el siglo XX, el desarrollo de la cepa Oka del virus de la varicela-zóster condujo a vacunas vivas atenuadas tanto para la varicela en los niños como para el herpes zóster en las personas mayores.

La segunda mitad del siglo XX se considera como la edad de oro para la vacunación (29). Se desarrollaron vacunas contra virus como el sarampión, parotiditis y rubeola y otras como hepatitis A, hepatitis B, varicela y *H. influenzae* b. Se desarrollaron vacunas de polisacáridos para la prevención de enfermedades bacterianas causadas por *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*. Sin embargo, estas vacunas no se pudieron utilizar en recién nacidos porque los lactantes no desarrollan una respuesta inmunitaria eficaz contra los antígenos polisacáridos por sí solos. El paso siguiente fue la conjugación mediante unión covalente de la estructura del glucano con una proteína portadora, como los toxoides tetánicos o diftérico. Esta maniobra convirtió las vacunas de polisacáridos independientes de células T en vacunas conjugadas de proteína-polisacárido dependientes de células T, y esto dio como resultado la producción de células B de memoria, lo que permitió su uso en los lactantes produciendo además una reducción en la colonización nasofaríngea (no observada en las vacunas de polisacáridos), creando así inmunidad colectiva. La observación de que la conjugación de proteínas con polisacáridos mejoraba la respuesta inmunitaria fue hecha por primera vez por Avery y Goebel en 1929, pero no se utilizó hasta Robbins y colaboradores conjugaron el polisacárido de *H. influenzae*.

Cada vez más, a finales del siglo XX y principios del siglo XXI, la revolución de la biología molecular y el conocimiento de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa se

aprovechan para producir vacunas de nueva generación (29).

4. Vacunas. Conceptos generales

Las vacunas son productos biológicos que contienen uno o varios antígenos que se administran con el objetivo de producir un estímulo inmunitario específico que pretende simular la infección natural, generando una respuesta inmunitaria específica en el sujeto, con el fin de protegerlo en ulteriores exposiciones al microorganismo (23).

La composición de las vacunas incluye los siguientes componentes:

- Antígeno inmunizante.
- Líquido de suspensión. Solución salina, agua destilada o en ocasiones productos derivados de los cultivos necesarios para la obtención de las vacunas.
- Preservantes, estabilizantes y antibióticos. Son sustancias utilizadas para estabilizar los distintos componentes de la vacuna o para impedir la contaminación por otros microorganismos o la degradación de la vacuna (gelatinas, aminoglucósidos, polimixina B, formaldehído).
- Adyuvantes. Son compuestos incorporados a las vacunas inactivadas para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos contenidos en las mismas o prolongar su efecto estimulador, haciendo posible la disminución de la cantidad de antígeno y el número de inyecciones de la serie vacunal. Los adyuvantes más utilizados en vacunas son: sales de aluminio (DTPa, Hepatitis A, Neumocócica conjugada), MF59 (escualeno)(gripe), AS04 (hepatitis B, VPH), virosomas (gripe). Los nuevos adyuvantes posibilitan fabricar más dosis de vacunas, abaratan el coste, permiten una mejor respuesta a las necesidades de las regiones en vías de desarrollo, especialmente en situaciones de emergencia.

Existen vacunas de microorganismos enteros (vivas atenuadas o inactivadas o muertas), de subunidades (polisacáridicas, conjugadas, acelulares, recombinantes), toxoides, vacunas de ácidos nucleicos (ADN/ARN/plásmidos) y otras (nanopartículas,

vectores) (23).

Las vacunas se pueden administrar por vía oral (rotavirus, fiebre tifoidea atenuada, cólera), intranasal (gripe atenuada), subcutánea (varicela y triple vírica) o intramuscular profunda, en el caso de las restantes. El número de dosis y el intervalo de tiempo entre cada una de ellas, es decir, la pauta vacunal, es importante de cara a lograr una buena respuesta y una mayor eficacia vacunal (23, 31).

Habitualmente las vacunas precisan de varias dosis para generar una respuesta inmunitaria suficiente y duradera en el sujeto, ya que la mayoría no son equiparables completamente a la infección natural. Son muchos los factores que influirán en la calidad de la respuesta generada (edad del individuo, composición de la vacuna, adyuvantes, número de dosis, etc.).

Las vacunas pueden administrarse de forma simultánea. Cuando no se administran de forma simultánea, las vacunas atenuadas parenterales deben separarse, al menos, cuatro semanas. Las inactivadas pueden administrarse juntas o con cualquier intervalo entre ellas.

Existen contraindicaciones a la vacunación entre las que se incluyen: 1) Reacción alérgica anafiláctica a una dosis previa de una vacuna o a algún componente de la misma; 2) Encefalopatía de etiología desconocida aparecida en los 7 días siguientes a la administración de una vacuna con componente frente a la tosferina; 3) Embarazo (contraindicadas las vacunas vivas atenuadas); 4) Inmunodepresión (contraindicadas las vacunas atenuadas); 5) Cualquier enfermedad moderada o grave (crisis asmática, cardiopatía descompensada, diarrea aguda...), con o sin fiebre (23).

No se aconseja intercambiar vacunas de distintos fabricantes para una misma enfermedad salvo en casos excepcionales.

5. Papel de la industria. Proceso de elaboración de vacunas

Las principales compañías farmacéuticas multinacionales tienen un conocimiento apropiado de los procesos de fabricación, el alto nivel tecnológico necesario, las barreras

a los procesos de I + D al inicio y los costos asociados con la producción de vacunas (32).

Existen razones por las que países con bajos ingresos puedan querer establecer su propio suministro de vacunas: seguridad del suministro, control sobre la programación y sostenibilidad de la producción, control de costos, desarrollo socioeconómico y respuesta rápida a las epidemias locales, incluidas las enfermedades infecciosas emergentes (32, 33).

Sin embargo, la fabricación de vacunas es una de las industrias con mayor número de desafíos. Los resultados pueden variar ampliamente debido a las infinitas combinaciones de variabilidad biológica de los materiales de partida básicos, los propios microorganismos, la condición ambiental del cultivo microbiano, el conocimiento y experiencia del técnico de fabricación, y los pasos necesarios en los procesos de purificación (32, 33).

Las autoridades reguladoras autorizan no solo un producto biológico específico sino también los procesos mediante los cuales el producto biológico es producido, testado y liberado para su uso. Cambios sutiles en el proceso de producción pueden alterar el producto final y modificar su pureza, seguridad o eficacia y hacen necesario un ensayo clínico para validar un nuevo proceso y mantener la licencia de un producto (32).

Este riesgo combinado de variabilidad biológica y física hace que la fabricación de vacunas sea más compleja que la fabricación de una pequeña molécula farmacéutica y es la causa principal de la alta proporción de fallos en la fabricación de vacunas y la escasez de suministros.

La mayoría de las vacunas tienen un ciclo de vida largo. Algunas vacunas usadas hoy fueron desarrolladas en los años 1940 y 1950 y permanecen esencialmente sin cambios. El desarrollo de procesos óptimo y eficiente requiere un suministro sostenido de materias primas de calidad por vendedores de confianza. El tiempo para producir un lote de vacunas varía de varios meses (vacuna antigripal) a tres años (pentavalente y vacunas combinadas hexavalentes) (32). La vacuna debe cumplir con especificaciones iniciales para la duración de fabricación y almacenamiento, y la estabilidad del producto debe confirmarse a través de estudios de estabilidad a largo plazo. Una vez obtenida la licencia, varios lotes se prueban para valorar la estabilidad cada año para confirmar que cualquier cambio en el proceso realizado no tiene un efecto perjudicial.

Hay muchas plataformas de producción de vacunas en uso hoy en día y varían ampliamente dependiendo de la complejidad y tipos de vacunas.

Los costes del proceso de fabricación pueden ser muy variables y determinan el precio final de las vacunas. Las principales fuentes de costos incluyen las instalaciones y mantenimiento, materias primas y producción, personal y garantía de calidad. El costo de materias primas, componentes, mano de obra, análisis y documentación del proceso y los resultados del ensayo comprenden los costos directos de la vacuna. Los costos indirectos incluyen la creación y gestión de los sistemas de calidad, planificación de la producción, control de calidad, almacenamiento y distribución, gestión de inventario y funciones generales como regulación, ventas, marketing y administración (32).

Incluyendo la fase de investigación, las estimaciones del tiempo requerido para llevar un producto al mercado internacional oscilan 5 a 18 años. Los costes totales del desarrollo de la vacuna pueden oscilar entre 200 y 500 millones de dólares. Aunque los requisitos reglamentarios para obtener una licencia están bien determinados y son similares en cada producto, las reglas y los requisitos evolucionan continuamente. Ciertos lotes de vacunas pueden hacerse solo para países específicos basados en esas regulaciones, aumentando la complejidad de la logística limitando la flexibilidad (32).

Cambios significativos en el proceso de fabricación, como nuevas instalaciones, equipos de fabricación o cambios en las materias primas, normalmente exigen nuevos requisitos reglamentarios, incluidos los ensayos clínicos. Estos requisitos confirmarán que la vacuna es todavía eficaz y comparable al producto producido por el proceso original de fabricación de la vacuna.

No obstante, el proceso entre los estudios de laboratorio y el desarrollo de terapias efectivas es arriesgado y costoso y, menos de 1 cada 10000 programas de desarrollo tienen éxito final con un coste estimado de mil millones de dólares. La mayoría de los productos en investigación fracasan en la fase preclínica (33, 34).

6. Calendarios de vacunación. Historia de la vacunación en España y

Castilla y León

Para facilitar la correcta aplicación de las vacunas en la infancia todos los países tienen elaborados unos esquemas de vacunación que se denominan calendarios de vacunaciones infantiles. En ellos se definen las vacunas, las dosis y las edades de aplicación. Las vacunaciones no finalizan en la edad pediátrica, sino que los cambios epidemiológicos justifican en muchos casos continuarlas en la edad adulta (31).

Un calendario de vacunación debe ser pertinente, simplificado, adaptado a las necesidades, aceptado por profesionales y la población, unificado y flexible (31).

Los comienzos de la actividad vacunadora en España datan de 1800, con la vacunación frente a la viruela. Posteriormente en 1944 se estableció la obligatoriedad de la vacunación frente a la difteria y la viruela, contribuyendo de manera decisiva al control de ambas enfermedades. El 9 de diciembre de 1979 se declara la erradicación de la viruela y se recomienda la suspensión de la vacunación, que tuvo lugar en 1980 (31).

La vacunación frente a la poliomielitis en España se inició en 1959 utilizando la vacuna Salk de polio inactivada (VPI). En 1963 se inició la vacunación con la vacuna oral atenuada (VPO). Se aplicaban 2 dosis, la primera con VPO monovalente (poliovirus 1) y la segunda con VPO trivalente (poliovirus 1, 2 y 3). En 1965 se inicia una nueva campaña masiva, utilizándose 2 dosis de VPO trivalente. Al mismo tiempo se añadió la vacunación frente a la difteria, el tétanos y la tosferina (DTP). La vacunación se realizaba a los niños entre los 3 meses y los 3 años de vida. En 1968 se llevó a cabo una campaña de vacunación frente al sarampión en 11 provincias españolas, vacunándose a niños con edades comprendidas entre los 9 y los 24 meses. La cepa utilizada era la Beckenham 31. En 1975 se autorizó la vacuna que contenía la cepa Schwarz (23, 31).

En 1977 se acuerda incluir las vacunas del sarampión monocomponente a los 9 meses de edad y de la rubeola monocomponente a los 11 años de edad, pero solo a niñas. Ambas vacunas iniciaron su aplicación en 1978. En 1980 se suprime la vacuna de la viruela. En 1981 se cambió la dosis de sarampión de los 9 meses por una dosis de triple vírica (sarampión, rubeola, parotiditis) a los 15 meses. En 1989 se decide cambiar la

primera dosis de VPO monovalente por trivalente. Se incluye una segunda dosis de vacuna triple vírica a los 11 años, sustituyendo a la vacunación de rubeola en niñas (31).

En cuanto a la hepatitis B (HB), en 1982 se comenzó a realizar la vacunación selectiva a grupos de riesgo. En 1991 se inicia en Cataluña la vacunación sistemática a adolescentes y posteriormente, entre 1992 y 1996, todas las CC. AA. la incorporan a sus calendarios. Además, algunas inician también la vacunación frente al virus de la HB en recién nacidos. Otra modificación consistió en el cambio de la pauta de primovacunación, aceptándose los 2, 4 y 6 meses de edad, además de los 3, 5 y 7 meses (31).

En 1995 el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (CISNS) aprueba para el año siguiente un nuevo calendario de vacunación por bandas. En el año 2000 se incluye la vacuna frente al *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) y se adelanta la segunda dosis de vacuna triple vírica a los 3-6 años de edad, la pauta de primovacunación pasa a los 2, 4 y 6 meses, se modifica la banda de edad para la administración de la quinta dosis de polio y DTPa (o DT), que pasa a los 4-6 años, a la vez que se amplía la franja de aplicación de Td desde los 14 a los 16 años. En 2001, también, se introduce la vacuna antimeningocócica C conjugada en una pauta de 3 dosis a los 2, 4 y 6 meses de edad (31).

En el año 2006 se aprobó la vacunación frente a la varicela para todos los niños que no la hubieran pasado con anterioridad ni hubieran sido previamente vacunados y en una franja de edad comprendida entre los 10 y los 14 años; modificándose también la pauta de primovacunación con la vacuna antimeningocócica C conjugada, que pasó de 3 dosis en el primer año de vida a un esquema de 2+1, con una dosis en el segundo año de vida.

En el año 2007 y dentro del marco de las estrategias de prevención del cáncer de cérvix, se recomienda la vacunación sistemática de las niñas con la vacuna frente al virus del papiloma humano (VPH) en una única cohorte, entre los 11 y 14 años de edad (31).

En el año 2012 se aprueba un nuevo calendario de vacunación con varios cambios: a) La dosis de difteria, tétanos y tosferina de los 4-6 años, se fija solo a los 6 años con Tdpa de baja carga y la dosis de Td a los 14 años. b) La primera dosis de triple vírica se

pauta a los 12 meses, y la segunda entre los 3 y los 4 años (antes 3 a 6 años). c) En cuanto a la hepatitis B en la infancia, se administra con la pauta 0, 2 y 6 meses, con 0, 1 y 6 meses en los hijos de madres portadoras de HBsAg. El rescate de hepatitis B en la adolescencia lo plantean entre 11 y 15 años (antes 10 a 14 años). d) La vacuna frente al meningococo C, las 2 primeras dosis las recomiendan a los 2 y 4 meses, eliminando la opción de los 6 meses y la dosis de refuerzo recomendada entre 12 – 18 meses (31).

En el año 2013 se actualiza la pauta de vacunación de la vacuna frente al meningococo C con 3 dosis: a los 4 meses, 12 meses y 12 años; la vacunación frente a la varicela se indica a los 12 años, y también ocurre lo mismo con la del VPH, a los 14 años. En el año 2015, se incluye la vacuna antineumocócica, con pauta 2+1, a los 2, 4 y 12 meses de edad y el adelanta de la del VPH en las niñas, a los 12 años. En 2016 se implanta la vacunación frente a varicela en niños pequeños con 2 dosis: una a los 15 meses y otra a los 3-4 años de edad. En 2017 se implantó la pauta 2+1 con hexavalentes y con 1 dosis de polio inactivada a los 6 años de edad (31).

En 2019 se aprobó por el CISNS un calendario común para toda la vida. El único cambio en 2019 en la edad infantil introduce la vacuna MenACWY a los 12 años con un rescate hasta los 18 años y añade la vacunación Td, antigripal y antineumocócica (VNP23) en los adultos y la antigripal y la Tdpa en embarazadas (31).

En Castilla y León en el año 2018 se modifica el calendario de vacunación introduciendo varios cambios: a) Se suprime la dosis de vacuna hepatitis B al nacimiento de forma rutinaria proponiendo una pauta de vacunación frente a hepatitis B de 3 dosis a los 2, 4 y 11 meses de edad, con vacuna hexavalente; b) Se mantiene la vacunación con vacuna frente a hepatitis B monovalente en recién nacidos hijos de madre portadora de Ag HBs, junto con inmunoglobulina HB en < 12 horas. En estos niños la pauta será de 4 dosis a los 0, 2, 4 y 11 meses; c) la inmunización frente a sarampión, rubéola, parotiditis y varicela de los 3 años de edad se realizará mediante vacuna tetravírica; d) La vacunación de las niñas frente al VPH se realizará administrando la primera dosis al cumplir los 12 años de edad y la segunda al menos 6 meses después, no realizándose campaña específica como hasta ahora; e) En el caso del meningococo, se vacunarán a los 12 meses y 12 años vacunas conjugadas tetravalentes (frente a serogrupos ACWY);

f) En el caso del virus del papiloma humano, se emplearán para la vacunación de las niñas a los 12 años de edad, vacunas frente a nueve genotipos de este virus (31, 35).

En el año 2019 Castilla y León actualiza su calendario oficial de vacunaciones incluyendo por primera vez vacunas recomendadas a lo largo de toda la vida y no solo en la infancia (35). Los principales cambios introducidos fueron: 1) Se incluye una nueva vacuna contra la meningitis (ACWY) a los 12 meses y 12 años de edad 2) Se recomienda la vacunación con la vacuna frente al virus del papiloma humano (VPH) en niñas de 12 años, para proteger frente a más tipos de este virus; 3) Entre los 15 y los 64 años, se refuerza la vacunación

de sarampión, rubéola, parotiditis y/o varicela en aquellas personas que no hayan pasado estas enfermedades y no estén correctamente vacunadas; 4) A partir de los 65 años se aumenta la protección frente al neumococo con dos tipos de vacuna (conjugada y no conjugada), que deben separarse un año entre ambas dosis.; 5) Además se incluye la vacuna contra la meningitis B, con 3 dosis que se inician a los 3 meses de edad y continúan a los 5 y 12 meses; 6) Todo lo anterior se suma a otras vacunas ya anteriormente recomendadas, tanto en la infancia como en adultos y personas mayores, con especial mención a la vacuna de la gripe que se recomienda cada año a partir de los 60 años de edad y también en las mujeres embarazadas.

En diciembre de 2022 (con efectos a partir del 1 de Enero de 2023) la Junta de Castilla y León modifica el calendario oficial de vacunaciones sistemáticas a lo largo de la vida en Castilla y León (35). Estas modificaciones se centran en las siguientes vacunas: 1) Se incluye la vacunación sistemática frente a rotavirus en lactantes, para todos los nacidos a partir del 1 de enero de 2023; 2) Se modifica la pauta de vacunación frente a meningococo B: adelanto de la edad de administración a los 2 y 4 meses (aplicable a los niños nacidos a partir del 1 de noviembre de 2022); 3) Ampliación de la vacunación frente al VPH a los 12 años a los varones, nacidos a partir del 1 de enero de 2011; 4) Se incluye la vacunación frente a la gripe en población infantil de 6 a 59 meses, a partir de la próxima temporada 2023-2024; 5) Se incluye la vacuna frente al herpes zóster a los 65 años (nacidos a partir del 1 de enero de 1957); 6) Se sustituye la pauta de vacunación secuencial frente a neumococo (VNC13v + VNP23v) por la vacuna neumocócica

conjugada 20 valente (VNC20v) a los 65 años (nacidos a partir del 1 de enero de 1958); 7) Se sustituye la vacuna dTpa por DTPa-VPI a los 6 años; 8) Se recomienda la vacunación frente a COVID-19 durante el embarazo y en mayores de 60 años.

En enero de 2024 la Junta de Castilla y León modifica el Calendario de Vacunaciones e Inmunizaciones Sistemáticas a lo largo de la vida de las personas (aprobado por ORDEN SAN/68/2024, de 31 enero de 2024) introduciendo los siguientes cambios: 1) Sustitución de la vacuna meningocócica conjugada C por ACYW a los 4 meses. Esta modificación se inicia con los nacidos a partir del 1 de enero de 2024 por lo que se aplica a partir del 1 de mayo de 2024 (a los 4 meses de edad); 2) Sustitución de la vacuna neumocócica conjugada 13 valente por la 15 valente en las 3 dosis (2-4-11 meses). Se inicia el cambio con los nacidos a partir del 1 de enero de 2024 por lo que se aplica a partir del 1 de marzo de 2024 (a los 2 meses de edad); 3) Ampliación de la edad de la vacunación frente al Herpes Zóster a los 80 años. Se aplica a la cohorte de personas nacidas en 1944. 4) Se mantiene en el calendario la inmunización con anticuerpo monoclonal (nirsevimab) en menores de 6 meses.

JUSTIFICACIÓN

La vacunación es una de las mejores estrategias para mejorar la supervivencia infantil y reducir la morbilidad. Las vacunas proporcionan beneficios relacionados con la mortalidad y la morbilidad derivados de prevenir enfermedades infecciosas y beneficios económicos al evitar la hospitalización, prevenir la discapacidad a largo plazo y aumentar la productividad (26).

El impacto directo de las vacunas en los niños está bien descrito, pero se subestima el principal impacto en la salud pública de la protección indirecta proporcionada a la comunidad por las vacunas. La protección comunitaria ocurre cuando las personas vacunadas bloquean la cadena de transmisión, protegiendo a los miembros susceptibles de la comunidad que no están vacunados al prevenir la exposición y limitar la propagación del patógeno a través de la comunidad. Poco después de la implementación de nuevas vacunas infantiles, se producen disminuciones sustanciales en la incidencia de enfermedades, incluidas disminuciones entre los niños, adolescentes y adultos no incluidos en la vacunación. La protección de los miembros de la comunidad susceptibles depende de mantener altas tasas de vacunación (23).

Se han sugerido diferentes estrategias como líneas a seguir para mejorar la vacunación en el niño. Entre ellas se incluyen las siguientes y que han sido las que hemos seguido en esta línea de investigación:

- 1.-Optimización del proceso de producción de vacunas. Adaptación a la demanda de vacunas.**
- 2.-Vacunación de la madre y del recién nacido para lograr una protección precoz del niño**
- 3.-Utilización de vacunas combinadas.**
- 4.-Uso y desarrollo de vacunas conjugadas.**

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

- 1.1. Es posible introducir nuevos métodos de producción de vacunas que ayuden a las compañías a fabricar un mayor número de dosis acorde a la demanda.
- 1.2. La vacunación de la mujer embarazada influye en la protección vacunal del lactante en los primeros meses de vida.
- 1.3. La utilización de las vacunas combinadas mantendría su perfil inmunogénico, sin modificar de forma relevante el perfil reactogénico.
- 1.4. La utilización de vacunas conjugadas no altera la inmunogenicidad de las vacunas con menos serotipos, con perfiles de seguridad y reactogenicidad comparables.

2. Objetivos

Los objetivos se enumeran siguiendo el orden de las hipótesis del anterior apartado

- 2.1. Explorar si un nuevo proceso de fabricación de la vacuna gripal que se utiliza en niños y adultos altera su perfil de seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad.
- 2.2. Conocer el impacto de la vacunación de la mujer embarazada con la vacuna tétanos-difteria-pertusis acelular en la inmunización precoz del lactante.
- 2.3. Examinar si la combinación de las vacunas DTPa-HBV-IPV/Hib y PHiD-CV al coadministrarla con MenACWY-TT en lactantes supone variación relevante en la inmunogenicidad y reactogenicidad.
- 2.4. Evaluar el perfil inmunogénico y de seguridad de vacunas conjugadas para el neumococo y el meningococo.

RESULTADOS

1. Optimización del proceso de producción de vacunas: el paradigma de la vacuna antigripal

*Artículo 1 (Anexo): Claeys C, Drame M, García-Sicilia J, Zaman K, Carmona A, Tran PM, Miranda M, Martín-Torres F, Thollot F, Horn M, Schwarz TF, Behre U, **Merino JM**, Sadowska-Krawczenko I, Szymański H, Schu P, Neumeier E, Li P, Jain VK, Innis BL. Assessment of an optimized manufacturing process for inactivated quadrivalent influenza vaccine: a phase III, randomized, double-blind, safety and immunogenicity study in children and adults. BMC Infect Dis. 2018 Apr 18;18(1):186. doi: 10.1186/s12879-018-3079-8. PMID: 29669531; PMCID: PMC5907359*

Los virus de la gripe pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y forman los géneros *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*. En base a sus antígenos de membrana (hemaglutinina [HA] y neuraminidasa [NA]) se clasifican en subtipos (36).

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda febril producida por el virus Influenza que circula a nivel mundial. El virus Influenza ocasiona brotes anuales, con o sin estacionalidad, que están relacionados con el clima u otros factores (37, 38). El virus sufre frecuentes mutaciones antigénicas, conocidas como derivas antigénicas o drift, que contribuyen a su variabilidad año tras año (36, 39) y representan un reto para el diseño y la producción de vacunas anuales. Además, el virus Influenza tiene la capacidad de producir pandemias cuando emerge un nuevo virus por mutaciones mediante recombinación genética o cambio antigénico (salto antigénico o shift), lo que resulta en un virus con glicoproteínas de superficie frente a las cuales no existe inmunidad en la población (36, 39, 40).

El virus de la gripe afecta a individuos de todas las edades y ocasiona enfermedad leve a grave e incluso muerte en algunos casos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las epidemias anuales de gripe producen un número estimado de 3 a 5 millones de casos de gripe grave y unas 250000-500000 muertes en el mundo, aunque

la cocirculación de otros patógenos y la ausencia de test diagnósticos en algunas áreas hace difícil estimar la carga de enfermedad de la gripe. Según las estimaciones más recientes de la OMS y el CDC (38, 41, 42), cada año se producen hasta 650.000 defunciones por enfermedades respiratorias relacionadas con la gripe estacional. Esto revela un aumento respecto de la estimación mundial precedente, de 250.000- 500.000, que data de más de 10 años atrás y abarca todas las defunciones relacionadas con la gripe, incluidas las debidas a enfermedades cardiovasculares o diabetes. Las nuevas cifras de 290.000-650.000 defunciones se basan en datos más recientes, de un grupo más amplio y diverso de países, incluidos países de ingresos bajos y medianos, y excluyen defunciones por enfermedades distintas de las respiratorias. Estas cifras indican la elevada carga de morbilidad por gripe y su sustancial costo social y económico para el mundo (38).

En niños sanos, la gripe es una enfermedad leve-moderada y en la mayoría de los casos, se resuelve sin complicaciones (43). En el niño, la gripe puede cursar de forma subclínica y en ocasiones con extremada gravedad, así como complicarse con sobreinfecciones bacterianas graves.

Las tasas de ataque y la morbilidad por infección por el virus de la gripe varían considerablemente de año en año y entre zonas geográficas. Comparadas con los adultos las tasas de ataque son mayores en niños y pueden alcanzar el 30% o más en determinadas estaciones (43, 44). Los niños pequeños sufren una gripe que suele ser más grave y requiere hospitalización más frecuentemente (45). El uso de antibióticos también aumenta como resultado de la infección por el virus Influenza.

Por otro lado, los niños eliminan el virus Influenza más tiempo y en mayores cantidades que los adultos y esto tiene importancia en la transmisión de la gripe en las familias y la sociedad. La gripe supone una alta carga médica y económica para los niños, sus familias y la comunidad por el absentismo escolar que provoca y la pérdida de días de trabajo y salario de los padres (38, 43, 45).

La vacunación es la estrategia más apropiada para la prevención de la gripe (38, 44, 46). La vacunación de los niños frente a la gripe es una estrategia coste-efectiva cuando se compara con otras vacunas como VPH o varicela (47). El impacto económico de la

vacunación antigripal pediátrica depende de la eficacia vacunal, cobertura, costes e inmunidad de grupo (48). Desde una perspectiva social la vacunación antigripal es coste efectiva para los niños, las mujeres embarazadas y postparto, los grupos de riesgo y los trabajadores del sistema sanitario (47). La efectividad de las vacunas antigripales parenterales es moderada y se produce una pérdida de la protección en los años siguientes (un 31-39%) (49).

Se dispone de varias vacunas antigripales en el mercado que pueden dividirse en dos categorías: 1) Vacunas de administración parenteral sin capacidad de replicación y, 2) Vacunas intranasales atenuadas (43, 50, 51). Las vacunas actuales están todas diseñadas para inducir inmunidad frente a la hemaglutinina y/o neuraminidasa, glicoproteínas de superficie del virus de la gripe. Dado que la hemaglutinina y la neuraminidasa del virus sufren frecuentes derivas antigénicas, la vacuna antigripal estacional se reformula al menos dos veces al año para incluir las cepas que se prevee circulen en la siguiente temporada de gripe (43). Las vacunas antigripales comercializadas para uso no pandémico son trivalentes o cuadrivalentes. Las vacunas trivalentes contienen un total de 3 cepas: 2 cepas influenza A (una H1N1 y otra H3N2) y una cepa de influenza de linaje B; las vacunas cuadrivalentes contienen una cepa adicional de linaje B (38, 51, 52).

Las vacunas antigripales no están autorizadas en ningún país del mundo para niños menores de 6 meses. Para niños de 6 a 23 meses las únicas vacunas disponibles son las vacunas antigripales inactivadas.

Existen varios tipos de vacunas antigripales: de virus fraccionados, de subunidades, de subunidades adyuvadas o de subunidades virosómicas.

Las vacunas antigripales disponibles para uso en niños incluyen (43):

1.- Vacuna atenuada intranasal: Contiene dos cepas A y dos cepas B (linaje Victoria y linaje Yamagata). Su administración es más sencilla que la intramuscular, con mejores datos de eficacia que las inactivadas en niños. Proporciona una media de protección del 80 % frente a la gripe confirmada, en comparación con el placebo, y más que las inactivadas. Estas dos cualidades podrían ser determinantes para

mejorar la aceptabilidad de la vacunación antigripal, tanto en niños como en la población general, así como entre los profesionales sanitarios. No está autorizada para su uso en menores de 2 años, inmunodeprimidos, embarazadas y aquellos que estén en tratamiento con salicilatos y se debe administrar con precaución en asmáticos, sobre todo en niños entre 2 y 4 años. No obstante, parece segura en pacientes con asma leve-moderada.

2.- Vacunas inactivadas trivalentes y tetravalentes de administración parenteral: Contienen dos cepas A y dos cepas B (linaje Victoria y linaje Yamagata). Los datos de inmunogenicidad y seguridad de las vacunas tetravalentes, tanto las inactivadas como la atenuada intranasal, comparados con las trivalentes, son similares, según los ensayos clínicos publicados, incluidos estudios con niños desde 6 meses de edad, así como en adultos.

De forma general, la vacunación antigripal está indicada en los siguientes casos (53):

1. Grupos de riesgo: niños a partir de los 6 meses de edad y adolescentes con las siguientes situaciones o enfermedades subyacentes:

- Enfermedad respiratoria crónica (fibrosis quística, displasia broncopulmonar, bronquiectasias, asma e hiperreactividad bronquial, etc.)
- Enfermedad cardiovascular grave (congénita o adquirida)
- Enfermedad metabólica crónica (diabetes mellitus, errores congénitos del metabolismo, etc.)
- Enfermedad crónica renal (insuficiencia renal, síndrome nefrótico, etc.) o hepática
- Enfermedad inflamatoria intestinal crónica
- Enfermedad celiaca
- Enfermedades reumáticas
- Inmunodeficiencia congénita (se excluye el déficit aislado asintomático de IgA) o adquirida (incluye la administración de corticoides sistémicos a dosis altas y mantenidas, fármacos inmunosupresores, eculizumab y receptores de trasplantes)

- Asplenia funcional o anatómica
- Enfermedad oncológica
- Enfermedad hematológica moderada o grave (p. ej. hemoglobinopatía con repercusión clínica, las que precisen hemoderivados, etc.)
- Enfermedad neuromuscular crónica y encefalopatía moderada o grave
- Implante coclear
- Fístula de líquido cefalorraquídeo
- Malnutrición moderada o grave
- Obesidad mórbida (IMC igual o mayor a 3 desviaciones estándar por encima de la media)
- Prematuridad, preferentemente si edad gestacional menor de 35 semanas o existencia de comorbilidad
- Síndrome de Down y otros trastornos genéticos con factores de riesgo
- Tratamiento continuado con ácido acetilsalicílico (por riesgo de síndrome de Reye en el caso de infección por virus gripal)
- Niños de 6 meses a 5 años institucionalizados, tutelados por la Administración
- Embarazadas

2. Niños sanos a partir de los 6 meses, adolescentes y adultos sanos en contacto estrecho (convivientes y cuidadores) con pacientes de riesgo

En la Comunidad de Castilla y León, en el calendario vacunal para las temporadas 2022- 2023 y 2023-2024, se recomienda la vacunación sistemática frente a la gripe en toda la población infantil de 6 a 59 meses basada en el beneficio directo y el impacto en morbimortalidad individual (54).

Aunque la efectividad frente a la infección observada en la población infantil no previamente vacunada muestra mejores resultados tras la administración de dos dosis en comparación con la administración de una sola dosis, con objeto de facilitar la logística en la vacunación universal y lograr mejores coberturas de vacunación, se recomienda la administración de una sola dosis de vacuna en todas las edades de población infantil sana,

incluyendo los que se vacunan por primera vez. Sin embargo, en la población infantil con condiciones de riesgo se recomienda la administración de dos dosis en su primera vacunación.

Se mantiene la recomendación de vacunación a población infantil superior a 59 meses de edad con condiciones de riesgo, y a sus contactos estrechos. Se recomienda reforzar las estrategias de vacunación infantil frente a la gripe en grupos de alto riesgo y a partir de la temporada 2023-2024 comenzar con la vacunación sistemática infantil entre 6-59 meses, empezando por las cohortes de menor edad si es necesario y completando todo el grupo poblacional progresivamente (54).

Los efectos adversos más frecuentes asociados con las vacunas antigripales inactivadas en todos los grupos de edad son las reacciones en el sitio de la inyección y la fiebre que tienden a ser leves y de corta duración (53).

Los niños menores de 9 años pueden tener una respuesta de anticuerpos menor por lo que necesitan recibir dos dosis de vacuna antigripal inactivada separadas al menos 4 semanas la primera vez que se vacunan frente a la gripe. Cuando los niños han sido primados con dos dosis de vacuna antigripal inactivada se recomienda recibir una sola dosis de vacuna en los años subsiguientes (44, 53).

La vacuna antigripal viva atenuada se administra por vía intranasal como un spray e induce una rápida respuesta inmune en la mucosa del tracto respiratorio superior que depende de la replicación viral y de la activación de las respuestas inmunes locales. Los virus son sensibles a la temperatura y han adquirido la capacidad de adaptarse al frío de tal manera que los virus se replica eficientemente a bajas temperaturas, como en la mucosa de la nasofaringe pero no en el tracto respiratorio inferior (55).

De forma similar a las vacunas antigripales inactivadas, las vacunas antigripales vivas atenuadas pueden ser trivalentes (H1N1, H3N2, B) o cuadrivalentes (H1N1, H3N2, 2 cepas B) de acuerdo a las recomendaciones de inclusión de cepas (55).

La administración de la vacuna antigripal viva atenuada se ha asociado

frecuentemente con reacciones leves en el tracto respiratorio superior como rinorrea, congestión nasal y fiebre en niños menores de 8 años. En estudios clínicos se observa un riesgo aumentado de sibilantes y un aumento de las hospitalizaciones en niños menores de 12 meses (53).

Cuando se compara con la vacuna antigripal inactivada, la vacuna antigripal viva atenuada induce una mayor respuesta de anticuerpos a nivel mucoso y sérico (31,9-54,9% más efectiva) (53).

Las vacunas antigripales deben producirse de forma anual para un elevado número de individuos. En épocas de pandemia puede ser necesaria una producción masiva. Las nuevas tecnologías de producción permiten la producción masiva de vacunas.

Es preciso adaptar el mecanismo de producción con las nuevas tecnologías. La modificación del proceso de producción exige, en muchos casos la realización de un ensayo clínico que demuestre la no inferioridad del producto obtenido mediante la tecnología más moderna frente al producido de forma tradicional.

En nuestro centro participamos en el ensayo clínico que se realizó tras los cambios en el proceso de producción de la vacuna antigripal. Esta modificación del proceso de producción obligó a la compañía a realizar un ensayo clínico para demostrar la no inferioridad en términos de eficacia y seguridad de la vacuna obtenida con los nuevos métodos de producción frente a la vacuna producida por metodología tradicional.

El promotor modificó el proceso de fabricación autorizado para la vacuna antigripal de virus fraccionados cuadrivalente (IIV4) para unificar el proceso entre diferentes cepas, lo que da lugar a un mayor número de dosis de vacuna disponibles y compensa al mismo tiempo el cambio de la vacuna antigripal trivalente inactivada (IIV3) a IIV4. Para confirmar que los cambios de fabricación no alteran el perfil de la vacuna, se realizó un ensayo clínico para comparar la vacuna antigripal cuadrivalente (IIV4) elaborada mediante el proceso actualmente autorizado con una vacuna elaborada mediante el nuevo proceso (en investigación) (vacuna antigripal cuadrivalente inactivada en investigación, (IIV4-I)).

Los objetivos principales fueron comparar la reactogenicidad y seguridad de IIV4-I versus IIV4 en todos los grupos de edad y demostrar la no inferioridad de las respuestas de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (HI) según la relación de los títulos medios geométricos de IIV4-I versus IIV4 en niños.

Se realizó un estudio multinacional en fase III, aleatorizado, doble ciego que incluyó tres cohortes: adultos (18 a 49 años; N = 120), niños (3 a 17 años; N = 821) y lactantes (6 a 35 meses; N = 940). Los sujetos elegibles en cada cohorte fueron aleatorizados 1:1 para recibir IIV4-I ó IIV4. Ambas vacunas contenían 15 µg de antígeno de hemaglutinina por cada una de las cuatro cepas de virus estacionales. Los adultos y los niños vacunados previamente recibieron una dosis de vacuna, y los niños no vacunados recibieron dos dosis de vacuna con 28 días de diferencia. Todos los niños de 9 años o mayores se consideraron vacunados previamente y recibieron una dosis de vacuna.

El objetivo principal de inmunogenicidad del estudio se cumplió al demostrar la no inferioridad inmunogénica de IIV4-I versus IIV4 en niños. La vacuna antigripal cuadrivalente inactivada en investigación (IIV4-I) fue inmunogénica contra las cuatro cepas vacunales en cada cohorte de edad. El perfil de reactogenicidad y seguridad de IIV4-I fue similar al de IIV4 en cada cohorte de edad y no hubo aumento en el riesgo relativo de fiebre (≥ 38 °C) con IIV4-I versus IIV4 dentro del período de 7 días posterior a la vacunación en lactantes.

Los resultados respaldan que el proceso de investigación utilizado para fabricar IIV4-I es adecuado para reemplazar el actual proceso de producción autorizado.

Este nuevo método de producción permite a la compañía la fabricación de un número significativamente mayor de dosis.

2. Vacunación de la madre y el recién nacido

Artículos (Anexo):

Artículo 2. Perrett KP, Halperin SA, Nolan T, Carmona Martínez A, Martínón-Torres F, García-Sicilia J, Virta M, Vanderkooi OG, Zuccotti GV, Manzoni P, Kostanyan L, Meyer N, Ceregido MA, Cheuvart B, Kuriyakose SO, Stranak Z, **Merino Arribas JM**, Cilleruelo Ortega MJ, Miranda-Valdivieso M, Arias Novas B, Ramos Amador JT, Omeñaca F, Baca M, Marchisio PG, Mesaros N. *Impact of tetanus-diphtheria-acellular pertussis immunization during pregnancy on subsequent infant immunization seroresponses: follow-up from a large randomized placebo-controlled trial.* Vaccine. 2020 Feb 18;38(8):2105-2114. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.10.104. Epub 2019 Nov 24. PMID: 31776027.

Artículo 3. Martínón-Torres F, Halperin SA, Nolan T, Tapiéro B, Perrett KP, de la Cueva IS, García-Sicilia J, Stranak Z, Vanderkooi OG, Kosina P, Rumlarova S, Virta M, **Arribas JMM**, Miranda-Valdivieso M, Novas BA, Bozensky J, Ortega MJC, Amador JTR, Baca M, Palomino EE, Zuccotti GV, Janota J, Marchisio PG, Kostanyan L, Meyer N, Ceregido MA, Cheuvart B, Kuriyakose SO, Mesaros N. *Impact of maternal diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccination on pertussis booster immune responses in toddlers: Follow-up of a randomized trial.* Vaccine. 2021 Mar 12;39(11):1598-1608. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.02.001. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33612341.

a. Vacunación en el recién nacido

Casi 700.000 niños menores de 1 mes fallecen por enfermedades infecciosas lo que representa aproximadamente el 28% de las muertes en niños menores de 1 mes (56).

Además, muchos niños recién nacidos, con sistemas inmunes inmaduros presentan morbilidad a largo plazo por infecciones tempranas en la vida. Uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible es la reducción de la mortalidad a menos de 12 por 1000 nacidos vivos (3, 56).

La vacunación es una de las estrategias más coste-efectivas para prevenir la infección.

Vacunas frente a poliomielitis, hepatitis B, tuberculosis, tétanos, pertussis, difteria, Haemophilus influenzae tipo b (Hib), rotavirus, y sarampión se administran a millones de niños previniendo, de forma estimada, unas 2,5 millones de muertes cada año. Los neonatos son especialmente susceptibles a la infección a pesar de su capacidad para responder a la mayoría de las vacunas. Aunque la vacunación ha beneficiado claramente a los niños mayores, es considerablemente menos efectiva en el primer mes de vida (56, 57).

La inmunización del recién nacido representa una estrategia global clave para superar la morbilidad y la mortalidad debidas a infecciones en los primeros años de vida. Sin embargo, las limitaciones potenciales incluyen inmunogenicidad deficiente, problemas de seguridad y el desarrollo de tolerancia o hiporrespuesta al mismo antígeno y / o antígenos concomitantes administrados al nacer o en los meses posteriores (56, 57).

La inmunización neonatal proporcionaría protección temprana para los recién nacidos y los lactantes, reduciendo el período crítico de vulnerabilidad de los esquemas de vacunación de rutina que comienzan más tarde (6-8 semanas). Otras ventajas podrían ser: necesidad de menos dosis de vacuna si se produce una respuesta inmunogénica en esta etapa temprana; efecto inmunomodulador general, aumentando la inmunidad desde el nacimiento antes de la exposición a patógenos virales o bacterianos.

La OMS recomienda la vacunación de los recién nacidos frente a tuberculosis, hepatitis B y polio tan pronto como sea posible tras el nacimiento (en las primeras 24 horas) para primar precozmente los componentes inmunes protectores (27). De la misma manera, la vacunación maternal protege frente a la infección por determinados patógenos a través de la transmisión vertical de la inmunidad (gripe, tosferina).

No obstante, las infecciones neonatales en regiones de bajos y medios ingresos están causados por una gran diversidad de gérmenes (Staphylococcus aureus, Klebsiella,

Escherichia coli spp, *Ureaplasma* spp, *Streptococcus* del grupo B, virus respiratorio sincitial). Ninguno de estos patógenos está cubierto por las vacunas actuales. Por otro lado, el tiempo requerido para inducir una respuesta inmune específica protectora después de la vacunación limita la protección y la utilidad en los primeros días y semanas de vida. Estrategias alternativas incluyen el uso de vacunas capaces de estimular la inmunidad neonatal de forma amplia, global, no patógeno-específica (27) o vacunar a las madres durante el embarazo para inducir anticuerpos protectores que puedan ser transferidos de forma vertical al feto dentro del periodo de vulnerabilidad (27, 56, 58).

Esta protección podría mejorarse integrando ambas estrategias, vacunando al neonato bajo la cobertura de la inmunidad materna transferida verticalmente (59).

Los niños menores de dos años tienen una respuesta de anticuerpos reducida a los antígenos polisacáridos T-independientes de las bacterias patógenas encapsuladas, incluidas Hib y neumococo. No obstante, la conjugación con proteínas activadoras de las células T, da lugar a una respuesta fuerte de anticuerpos, incluso en neonatos. Comparados con niños mayores, los neonatos tienen una respuesta vacunal al menos igual, si no mayor, a las vacunas incluidas en los programas de inmunización neonatal como BCG, polio oral (OPV) y hepatitis B. La respuesta serológica del neonato es también fuerte frente a otras vacunas no autorizadas para administración neonatal, como Rotavirus, Difteria y Tétanos.

Las vacunas vivas tienen un perfil de seguridad aceptable en el recién nacido. La infección diseminada por BCG es excepcional (menos de 1 por millón de niños vacunados) y casi siempre ocurre en niños con inmunodeficiencia. La polio primaria asociada a la vacuna ocurre en poblaciones escasamente inmunizadas lo que facilita la diseminación del virus vacunal de persona a persona, su persistencia y la eventual reversión a un fenotipo más virulento. En conclusión, los neonatos son perfectamente capaces de responder de forma intensa y con seguridad a la mayoría de las vacunas. (27).

Las vacunas actuales administradas a los neonatos no están dirigidas específicamente a los patógenos que producen las infecciones graves en las primeras semanas de vida. La tuberculosis, hepatitis B y polio suelen manifestarse fuera del

periodo neonatal. Las vacunas frente a los patógenos que producen infección en las primeras semanas de vida como RSV, Ureaplasma y varias otras bacterias, no están disponibles o no han sido probadas en neonatos.

Estrategias dirigidas a inducir una respuesta adaptativa pueden incluir el refuerzo de la resistencia a través de un estímulo no patógeno-específico y la transferencia de inmunidad materna patógeno-específica. Las vacunas vivas pueden incrementar de forma amplia la resistencia del huésped frente a la infección, más allá de una respuesta patógeno-específica (25,27).

Los mecanismos por los que las vacunas vivas tienen efectos protectores amplios, no patógeno-específicos, no están bien establecidos y, probablemente, incluyan células T con reactividad cruzada (inmunidad heteróloga) o activación de componentes inmunes innatos (inmunidad entrenada). En niños recién nacidos de bajo peso se observó una reducción del 38% de la mortalidad neonatal en los neonatos vacunados con BCG frente a los no vacunados, más allá de la protección frente a la tuberculosis. En neonatos vacunados con la vacuna de polio oral (OPV) y BCG en los primeros dos días de vida se objetivó una reducción del 40% en la mortalidad neonatal (27).

Este efecto protector no patógeno-específico parece producirse de forma rápida, dado que la reducción sustancial de la mortalidad neonatal se pudo detectar en los primeros 3 días tras la vacunación con BCG, en contraposición con las semanas requeridas para adquirir inmunidad patógeno específica. Los neonatos vacunados con BCG muestran una respuesta serológica aumentada a otras vacunas administradas.

La reducción de la mortalidad asociada a la administración de la vacuna BCG está limitada fundamentalmente a niños vacunados en las primeras cuatro semanas de vida y, de forma más pronunciada, a aquellos vacunados en la primera semana de vida. Aunque estos datos muestran una ventana de oportunidad en el periodo neonatal, la protección no patógeno-específica se ha visto en niños mayores a los que se ha administrado otras vacunas vivas. Reducciones similares de la mortalidad infantil se han asociado la administración de la vacuna antisarampión atenuada después de los cuatro meses de edad. La estrategia de vacunación no patógeno específica tiene el

potencial de conferir protección amplia y rápida al neonato, evitando los inconvenientes de las estrategias actuales de vacunación patógeno específica (27).

b. Vacunación durante la gestación

Una infección durante la gestación puede tener consecuencias desfavorables para la madre, el feto o ambos (57, 60). Las mujeres embarazadas son más vulnerables a infecciones graves por virus influenza o coronavirus con un riesgo aumentado de evolución desfavorable del embarazo (57). La infección por *Bordetella pertussis* asocia complicaciones en el 24,5% de los niños infectados, más frecuentemente en niños menores de 3 meses (58, 61).

El beneficio de la vacunación materna para niños pequeños fue demostrado en 1879 cuando se observó que los niños nacidos de madres vacunadas con el virus vaccinia durante la gestación eran inmunes a la viruela durante los primeros meses de vida. La vacunación durante la gestación ha demostrado ser efectiva frente a varios patógenos importantes. La vacunación antitetánica de la mujer embarazada reduce la mortalidad neonatal por tétanos más del 90% (60). La protección de los niños frente a la infección por el virus influenza oscila entre el 30% y el 63% cuando las madres han sido vacunadas durante el embarazo (57). La eficacia protectora frente a tosferina en los primeros 2-3 meses de vida es de un 90-91% tras la vacunación maternal (57, 58, 61, 62).

Vacunar a la madre durante el embarazo tiene dos beneficios potenciales. En primer lugar, la vacunación protege a la madre de infecciones para las que ella es especialmente susceptible durante la gestación y, además protege al feto de la infección congénita y de otros efectos perniciosos de la infección materna (las infecciones maternas son responsables del 10- 50% de los mortinatos y del 25% de las muertes neonatales) (60). En segundo lugar, la vacunación materna puede utilizarse para proteger al feto o al recién nacido o niño pequeño de la infección durante los primeros meses de vida a través de la transferencia transplacentaria de anticuerpos neutralizantes de tipo IgG y/o anticuerpos de tipo IgA secretora en la leche materna (59, 60, 63).

Sin embargo, la cobertura vacunal frente a tosferina y gripe en las mujeres

embarazadas se sitúa en menos del 50% en la mayoría de los países. Sólo Estados Unidos (57%), Inglaterra (71%) y España (81%) tienen coberturas aceptables (62).

Los anticuerpos maternos transferidos a través de la placenta son casi exclusivamente inmunoglobulinas G (IgG), cuyos niveles aumentan exponencialmente en el feto en las semanas finales de la gestación. La transferencia de la inmunoglobulina G (IgG) a través de la placenta se realiza por la unión con los receptores Fc expresados por células del trofoblasto, macrófagos y células endoteliales. Comienza alrededor de las 17 semanas de gestación y aumenta conforme el embarazo progresa adquiriendo niveles fetales de IgG mayores que los niveles séricos maternos a la 40 semana de gestación (60). La aceleración de la transferencia de los anticuerpos maternos en fases tardías de la gestación indica que la inmunidad adquirida por la vacunación materna es muy diferente en los niños pretérmino (60). Los niveles de IgG están reducidos en niños pequeños para la edad gestacional y en niños nacidos de madres con infecciones crónicas como VIH o malaria. En las mujeres vacunadas con Tdap durante la última etapa del embarazo, los niveles de inmunoglobulina G específica contra la tosferina disminuyeron significativamente entre 9 y 15 meses después del parto (64).

No existe un nivel de anticuerpos protector. Se ha observado que si los niños expuestos a tosferina tenían niveles bajos de anticuerpos frente a pertactina y/o fimbrias 2/3 estaban protegidos un 70%. Por el contrario, los anticuerpos frente a hemaglutinina filamentosa no tenían efecto protector y los anticuerpos en niveles bajos frente a toxina pertúsica ejerció un efecto protector mínimo en niños de 7 a 30 meses (65).

En relación con la protección a los niños menores de 2 meses, pequeñas cantidades de anticuerpos frente a la subunidad A de la Toxina pertúsica (responsable del fallecimiento de los niños y de la hipertensión pulmonar irreversible) podrían prevenir la muerte en los niños aunque no prevengan la infección. Es esperable que la vacunación de las madres frente a tosferina prevenga la mayoría de las muertes en niños menores de 2 meses (65).

Los anticuerpos maternos IgA e IgG son transferidos también a través de la lactancia materna. Niveles elevados de ambos isotipos pueden detectarse en la leche materna tras la vacunación durante la gestación. Si bien el mecanismo de protección

predominante proporcionado por la vacunación materna es la transferencia transplacentaria de IgG, existe la posibilidad de una protección adicional conferida por los anticuerpos en la leche materna. La IgA secretora (sIgA) protege contra los patógenos respiratorios y diarreicos. Se ha demostrado la presencia de IgA específica frente a la vacuna en concentración más elevada en leche de madres vacunadas en comparación con no vacunadas. Estos anticuerpos son de larga duración con IgA elevada en la leche materna medida hasta 7 meses después del parto (60).

Hay varias vacunas autorizadas que proporcionan inmunidad protectora que es beneficiosa para la madre y el niño como la vacuna antitosferina y la vacuna antigripal (58,60). Existen también varias vacunas candidatas en investigación que podrían autorizarse con el propósito de proteger al feto y al niño pequeño frente a la infección como las vacunas frente a citomegalovirus (CMV), virus respiratorio sincitial (VRS) y *Estreptococo del grupo B* (GBS) (57).

Las mujeres embarazadas presentan un riesgo aumentado de enfermedad grave o fallecimiento por infección por el virus influenza en comparación con las mujeres no embarazadas (57, 60). En la pandemia por virus influenza A en 2009 las mujeres embarazadas infectadas por el virus influenza presentaron un 7,2% más de probabilidad de ser hospitalizadas, un aumento desproporcionado del riesgo de mortalidad y mayor incidencia de eventos adversos durante el embarazo que las no infectadas incluyendo pérdidas fetales tardías y disminución del peso de los recién nacidos.

Dado el riesgo aumentado en las mujeres embarazadas, desde 2012 la OMS recomienda la vacunación antigripal a las madres embarazadas (59, 66).

Las vacunas antigripales inactivadas que contienen 3 (vacuna antigripal trivalente) ó 4 (vacuna antigripal cuadrivalente) tipos de virus pueden utilizarse en las madres embarazadas. La vacuna antigripal viva atenuada, de administración intranasal está contraindicada durante la gestación por el riesgo teórico de transmisión transplacentaria del virus al feto.

No hay consenso acerca del momento óptimo de la gestación para la administración de la vacuna antigripal (57, 60). En algunos países se recomienda la

vacunación antigripal previa al inicio de la estación de gripe para las mujeres embarazadas.

Las vacunas antigripales inactivadas son generalmente bien toleradas en las mujeres embarazadas y niños pequeños y generan una respuesta adecuada de anticuerpos con tasas de seroprotección moderadas a altas en madres embarazadas (65-96%) y niños pequeños (50%- 100%) con variaciones según los diferentes tipos y subtipos del virus y según estaciones de la gripe. Varios estudios muestran una efectividad del 50-70% en mujeres embarazadas y del 20- 90% en niños pequeños frente a gripe confirmada en laboratorio.

La tosferina es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa que puede causar una enfermedad grave en niños pequeños, sobre todo lactantes (58, 63).

Las vacunas frente a tosferina están disponibles desde los años 50 y su uso generalizado redujo la incidencia de la tosferina de forma global (58, 67, 68). El aumento de casos graves de tosferina en varios países dio lugar a la introducción de la vacunación antitosferina en madres embarazadas con una efectividad entorno al 90% para reducir la incidencia de la tosferina en niños menores de 3 meses y la hospitalización y hasta un 95% en la reducción de la mortalidad (57, 58, 60, 69). La OMS recomienda la vacunación de las mujeres embarazadas como la estrategia más costo-efectiva para la prevención de la tosferina en el niño pequeño (63, 66, 70).

Aunque los programas de vacunación antitosferina han demostrado ser efectivos en prevenir la tosferina grave en los lactantes, existe incertidumbre acerca del mejor momento durante la gestación para administrar la vacuna y ofrecer una protección óptima para el niño (57, 58, 60, 61). Algunos investigadores han recomendado administrar la vacuna en fases tardías de la gestación para coincidir con la máxima transferencia de anticuerpos, mientras que otros han detectado títulos más altos de anticuerpos en niños nacidos de madres que fueron vacunadas en fases precoces de la gestación. La tasa de tosferina fue un 43% menor entre los niños cuyas madres recibieron Tdap prenatal que los niños cuyas madres no recibieron Tdap prenatal o posparto. Las tasas de tosferina fueron más bajas para los bebés cuyas madres recibieron la vacuna Tdap durante el tercer trimestre y los niños cuyas madres

recibieron Tdap <27 semanas de gestación no experimentaron reducciones en las tasas de tosferina (61). Los hijos de madres inmunizadas antes de la concepción o al inicio del embarazo no tienen suficientes anticuerpos específicos contra la tosferina para protegerlos contra la infección y puede ser necesaria la inmunización materna durante el tercer trimestre, la inmunización de otros contactos infantiles y la revacunación durante embarazos posteriores (71). Los estudios de seguridad de la vacuna Tdap no han identificado eventos adversos graves asociados a la vacunación durante la gestación (69, 72).

La vacunación frente a tosferina en la gestación proporciona títulos altos de anticuerpos en el neonato al nacer y estos anticuerpos persisten al menos 2-3 meses (58, 73). Además, se han detectado títulos altos de anticuerpos IgA antitosferina en el calostro de madres vacunadas durante el embarazo que se mantienen en la leche materna durante más de ocho semanas postparto. Los elevados niveles séricos de anticuerpos en niños nacidos de madres vacunadas frente a tosferina con la vacuna Tdap o Tdap/IPV ocasionan una respuesta inicial reducida a las vacunaciones habituales frente a difteria y tosferina (73). La inmunización materna durante el embarazo ayuda a proteger a los bebés durante el período previo a que completen sus vacunas primarias. Se ha demostrado que es segura y beneficiosa. Sin embargo, los anticuerpos maternos preexistentes pueden influir en las respuestas de los anticuerpos después de la inmunización infantil, un efecto llamado "blunting" (73, 74).

La inmunización materna con Tdpa durante el embarazo se asocia con una reducción de las respuestas de anticuerpos a los antígenos de la vacuna tanto específicos (difteria y tos ferina) como heterólogos (polio y neumococo) (74). Este efecto es más fuerte tras la dosis booster (13 meses) que después de la inmunización primaria a los 7 meses de edad. Por el contrario, para Hib, en los lactantes con inmunización materna con Tdpa, las concentraciones de anticuerpos son más altas, particularmente a los 7 meses de edad. La inmunización materna con vacuna antigripal tetravalente inactivada tiene un efecto mínimo sobre las respuestas infantiles a la vacuna. Como la mayoría de las vacunas inducen respuestas de anticuerpos muy elevadas, pequeñas diferencias en las concentraciones de anticuerpos pueden no tener importancia clínica (74, 75).

Los programas de vacunación comienzan cuando los bebés tienen 2 meses de edad y la vacunación primaria no está completa hasta los 6 meses de edad en la mayoría de los países (57). Por lo tanto, la mayoría de las vacunas infantiles no proporcionan protección adecuada hasta que el niño tiene varios meses de edad. La imposibilidad de usar vacunas para prevenir infecciones en neonatos y niños menores de dos meses produce un periodo de déficit inmunitario que les hace más vulnerables a la hospitalización asociada a infección y a la muerte que los niños mayores (58).

Esta vulnerabilidad de los bebés que son demasiado pequeños para ser vacunados puede abordarse mediante la vacunación materna (57, 58, 73). La vacunación materna tiene el potencial de proteger a la madre, al feto o a ambos. La inmunidad se logra por la transferencia materna de anticuerpos a través de la placenta al feto y a través de la lactancia al neonato hasta que es posible inmunizarle.

La leche humana contiene tres anticuerpos que confieren inmunidad mucosa al niño amamantado: IgA secretora (SIgA), IgM secretora (SIgM) e IgG. Las vacunas frente a la gripe, la tosferina y el SARS-CoV-2 administradas durante la gestación inducen respuestas patógeno- específicas de tipo SIgA e IgG en la leche materna que son protectoras frente a estas enfermedades respiratorias en niños lactados al pecho.

Los anticuerpos específicos de tipo IgG, activamente transportados a través de la placenta durante la gestación, protegen al niño en los primeros meses de vida cuando las respuestas a las vacunas son generalmente débiles y es difícil adquirir protección rápida con la inmunización.

La inmunoglobulina G (IgG) es el único isotipo de anticuerpo que se transfiere activamente a través de la placenta desde alrededor de las 13 semanas de gestación y aumenta exponencialmente durante el tercer trimestre de manera que la concentración de IgG en el recién nacido es similar o superior a la de la madre. La IgG proporciona inmunidad pasiva al bebé en los primeros meses de vida. La concentración de IgG fetal a finales del segundo y principios del tercer trimestre es 25% -50% más baja que la encontrada en los recién nacidos a término. La vacunación en el segundo trimestre proporcionaría una exposición acumulativa más prolongada a la IgG materna y, potencialmente, resultaría en una mayor IgG funcional en el lactante. La vacunación

posterior, alrededor de las 28-32 semanas, coincidiría más estrechamente con el pico de la respuesta a la vacuna con el momento de la máxima transferencia transplacentaria de IgG y, por lo tanto, podría proporcionar una mayor protección al lactante (73).

Las 4 subclases de IgG se transfieren a través de la placenta con diferente eficacia; la IgG1 se encuentra en la concentración más alta en la sangre del cordón umbilical, seguida de IgG4, IgG3 e IgG2. Por lo tanto, la inmunización materna con una vacuna de polisacáridos, que induce predominantemente IgG2, podría ofrecer menos protección al lactante contra la infección en comparación con una proteína o una vacuna conjugada con proteína, que provoca predominantemente IgG1 e IgG3.

La transferencia transplacentaria de anticuerpos maternos afecta sobre todo a los anticuerpos de tipo IgG. La transferencia placentaria de IgG materna es un proceso activo mediado por receptores placentarios de tipo Fc para IgG. Este proceso comienza alrededor de la semana 16-17 de gestación pero la mayoría de IgG es transferida al feto durante el tercer trimestre de la gestación. La eficiencia de la transferencia transplacentaria de los anticuerpos IgG maternos es subclase dependiente con IgG1 e IgG4 transferidos más eficientemente que los IgG3, mientras que IgG2 es la subclase de IgG con un transporte menos eficiente. Esta diferencia en la transferencia entre las distintas subclases de IgG tiene implicaciones significativas para la elección de las vacunas que van a ser administradas durante la gestación. La vacunación con vacunas proteicas induce una respuesta preferente de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG3 mientras que la vacunación con vacunas polisacáridicas como las vacunas antimeningocócicas polisacáridicas produce una respuesta preferente de anticuerpos de tipo IgG2. Por ello, como resultado de este transporte transplacentario preferencial, es esperable que el niño se beneficie más del transporte de anticuerpos maternos inducidos por una vacuna proteica y, con menor intensidad de anticuerpos maternos inducidos por vacunas polisacáridicas. La función de estos anticuerpos es crítica. El mecanismo de protección frente a la enfermedad meningocócica invasora esta mediado por la bacteriólisis inducida por el complemento y las diferentes subclases de IgG difieren en su capacidad para fijar el complemento e iniciar la respuesta bactericida. Los anticuerpos de tipo IgG1 e IgG3 activan el complemento de forma eficiente. Los anticuerpos de tipo IgG2 son más dependientes de la densidad del epítipo en la

superficie bacteriana y son efectivos cuando la densidad es alta. Los anticuerpos de tipo IgG4 no son activadores efectivos de la cascada del complemento. No obstante, la estimulación de la producción de IgG1 a través de la inmunización meningocócica durante la gestación podría ser la mejor respuesta para proteger al niño frente a la enfermedad invasora.

Aunque la vacunación durante el embarazo genera dudas acerca de la seguridad, las vacunas administradas habitualmente a las mujeres embarazadas tienen un perfil de seguridad excelente. De acuerdo con la OMS las vacunas inactivadas (gripe, Covid-19, DTP) pueden administrarse con seguridad a las mujeres embarazadas (76). No hay evidencia de aumento de complicaciones en el embarazo con las vacunas inactivadas o adyuvadas con aluminio (72). Las vacunas vivas (vacuna frente a rubeola, polio oral, fiebre amarilla), sin embargo, no se recomiendan durante la gestación. No obstante, el análisis tras su administración inadvertida sugiere que son seguras durante la gestación.

Se ha demostrado la seguridad de la vacunación para la madre y el niño con las vacunas frente al virus influenza, vacunas polisacáridicas conjugadas meningocócica y neumocócica, toxoide tetánico, tos ferina acelular, virus del papiloma humano, cólera, hepatitis A, encefalitis japonesa, rabia, ántrax, viruela, fiebre amarilla, paperas, sarampión y rubéola combinados, fiebre tifoidea, vacunas antipoliomielíticas inactivadas o atenuadas y vacunas contra *Bacillus Calmette Guérin*.

La tosferina es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa causada por la bacteria *Bordetella pertussis* que sigue siendo endémica en gran parte del mundo. Los lactantes son especialmente vulnerables en los primeros meses de vida antes de la vacunación, una vez que han disminuido los niveles de anticuerpos maternos protectores, pudiendo desarrollar una tosferina grave o fallecer por dicha infección (58, 71).

Varios países han recomendado la vacunación universal de las embarazadas frente a la tosferina y la gripe dada la morbilidad de la tosferina en el lactante pequeño y el riesgo elevado de presentar complicaciones graves por gripe en la madre y el niño (73). La vacunación materna es efectiva para prevenir la enfermedad grave en la mujer embarazada y para proteger a los lactantes menores de 6 meses, es segura y no

aumenta el riesgo de eventos adversos maternos o fetales (59).

Aunque existe una evidencia científica creciente para apoyar la vacunación materna contra tosferina y gripe, existen importantes interrogantes que responder como conocer el mecanismo exacto de la protección, la seguridad e inmunogenicidad de dosis repetidas en embarazos posteriores, la posible interferencia de los anticuerpos maternos con la respuesta a las vacunas del niño, el momento óptimo para la administración de la vacuna, el establecimiento de un nivel sérico de protección o la aplicabilidad del programa de vacunación en países con escasos recursos (71, 73, 74).

La eficacia de las vacunas frente a tosfeina es controvertida debido a la pérdida de inmunidad que se produce, la protección incompleta de los niños menores de 5 años, los cambios genéticos de Bordetella pertussis y la duración limitada de la protección (77).

La vacunación contra la tosferina de células enteras durante el embarazo se inició por primera vez en la década de 1930 (76). En 2012 se incluyó la vacunación acelular contra la tosferina en los programas nacionales de inmunización para todas las mujeres embarazadas (73), en respuesta al aumento significativo de las tasas de tosferina observadas en todos los grupos de edad, pero particularmente en los bebés menores de 3 meses, que tienen mayor riesgo de morbilidad y mortalidad. La mayoría de los países que recomiendan su uso administran una sola dosis de vacuna en el tercer trimestre; sin embargo, el Reino Unido amplió la recomendación para incluir a cualquier mujer a partir de las 16 semanas de gestación. Como actualmente no existe una vacuna monovalente contra la tosferina, la vacuna contra la tosferina se administra en combinación con el tétanos y la difteria, y en algunos países también con la poliomielitis (73). En nuestro país se recomienda la administración de una dosis de vacuna Tdpa durante el tercer trimestre de gestación, preferiblemente entre las semanas 27 y 36, para garantizar un nivel óptimo de anticuerpos a través de la placenta. La vacunación contra la tosferina debe repetirse en cada embarazo, independientemente del intervalo de tiempo transcurrido desde la dosis previa (71). Se han notificado mayores títulos de anticuerpos específicos contra la tosferina en sangre de cordón de bebés nacidos de mujeres inmunizadas a las 28–32 semanas de gestación en comparación con mujeres inmunizadas entre las 33 y 36 semanas de gestación, sugiriendo que la vacunación antes

del tercer trimestre es más efectiva que más tarde en el embarazo (71). La cantidad de anticuerpos maternos transferidos al neonato a través de la placenta y la leche materna depende del momento de la vacunación durante el embarazo, de la función placentaria y de la concentración de anticuerpos de la embarazada. Los anticuerpos maternos disminuyen exponencialmente durante las primeras semanas o meses de vida y la tasa de descenso es constante independientemente de la cantidad de anticuerpos recibidos al nacer. Por lo tanto, los bebés con un mayor nivel de anticuerpos maternos al nacer tendrán una mayor persistencia de estos anticuerpos hasta el comienzo del esquema de inmunización primaria del propio niño.

La inmunización materna con Tdap es segura y eficaz. La efectividad de la vacunación materna para prevenir la tosferina en los lactantes menores de 3 meses es del 91-93%, si esta se administra antes de los 7 días previos al parto (69, 71, 73).

En relación con la seguridad no se objetivaron eventos adversos en la madre ni en el recién nacido con excepción de un ligero aumento de la incidencia de corioamnionitis (6,1% en mujeres vacunadas vs 5,5% en no vacunadas) (72, 78). No se ha observado mayor riesgo de taquipnea transitoria de recién nacido, sepsis neonatal, neumonía neonatal, síndrome de distrés respiratorio o convulsiones neonatales en niños hijos de madres vacunadas con Tdap. La vacuna Tdap es segura y bien tolerada (79). La reactogenicidad local y sistémica es similar a la observada en mujeres no embarazadas y no se han atribuido efectos adversos graves a la vacuna Tdap durante el embarazo (69, 72, 78).

Se sabe que las altas concentraciones de anticuerpos maternos inducidos por vacuna interfieren con la respuesta inmune humoral del lactante con una inhibición de la generación de anticuerpos después de la propia vacunación y con títulos de anticuerpos más bajos en consecuencia (74). Se desconoce si las altas concentraciones de anticuerpos maternos también afectan las respuestas inmunes celulares en los bebés y si este hecho tiene consecuencias clínicas. Este efecto inhibidor de los anticuerpos maternos sobre la generación de anticuerpos por el sistema inmunológico del bebé, que comúnmente se conoce como "blunting" (74), puede afectar la inmunidad neonatal hasta más de un año de edad, dependiendo del nivel de anticuerpos maternos en el

neonato al nacer. La atenuación o la interferencia de la respuesta inmune infantil es actualmente una de las áreas de investigación de la estrategia de vacunación materna contra la tosferina. El fenómeno de atenuación o “fenómeno de blunting” ocurre independientemente del tipo de vacuna aplicada, incluidas las vacunas contra el sarampión, la influenza y la tosferina. Se ha encontrado atenuación de la respuesta inmune humoral del lactante a los mismos antígenos de vacuna que los incluidos en la vacuna Tdap, incluyendo respuesta atenuada a los antígenos vacunales conjugados. Un estudio para valorar el fenómeno de “blunting” en madres vacunadas con la vacuna inactivada frente a la Influenza o Tdap en relación con las respuestas de anticuerpos de los niños a las vacunas de rutina de los primeros años de vida contra la hepatitis B, el tétanos, la difteria, la tos ferina, la poliomielitis, el neumococo, el rotavirus, la MMR y el meningococo mostró que la vacunación contra la influenza materna no afectó las respuestas a las vacunas del bebé, pero la inmunización materna con Tdap produjo respuestas frente a las vacunas significativamente más bajas a antígenos específicos (difteria y tos ferina) y heterólogos (polio y neumococo) en el niño.

La explicación más común para el “fenómeno del blunting” implica un enlace cruzado entre el receptor de células B (BCR) y el receptor Fcγ FcγRIIB, ambos expresados en la superficie de las células B. Cada BCR tiene una afinidad única por un determinado epítipo de patógeno, que también puede ser reconocido por anticuerpos maternos específicos. De nuevo, estos pueden ligarse al FcγRIIB mediante su fragmento Fc. Cuando se vacuna al bebé, los fragmentos de patógenos ingresan a su circulación y pueden unirse tanto a BCR como a anticuerpos maternos al mismo tiempo, lo que conduce a señales contradictorias dentro de la célula B. Mientras que el BCR reconoce el nuevo antígeno y emana señales que conducen a la diferenciación de las células plasmáticas y la producción de anticuerpos, FcγRIIB señala la presencia de un anticuerpo específico para este antígeno en particular e inhibe la producción adicional de anticuerpos. En consecuencia, la señal estimuladora de BCR se inhibe y el sistema inmunológico del bebé no puede iniciar la producción de anticuerpos.

Nosotros estudiamos el fenómeno de “blunting” o la interferencia de los anticuerpos maternos transferidos durante la gestación frente a la respuesta inmune del niño a la primovacunación y a la dosis de refuerzo.

Esta potencial interferencia se evaluó en un ensayo en fase IV, multinacional, abierto, para valorar la inmunogenicidad y la seguridad de la vacunación primaria con DTaP-HepB-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) y la vacuna antineumocócica 13-valente (Prevenar 13®) en niños de 6- 14 semanas de edad.

Se incluyeron niños de 6-14 semanas de edad nacidos de madres que habían sido aleatorizadas para recibir la vacuna antitosferina tricomponente acelular de contenido antigénico reducido (grupo Tdap) o placebo (grupo placebo) durante la gestación, entre la 27+0 y 36+6 semana de gestación, con inmunización cruzada postparto. Todos los niños recibieron 2 ó 3 dosis de DTaP-HepB-IPV/Hib® y Prevenar 13® de acuerdo al programa de inmunización de cada país. La inmunogenicidad se valoró previamente y 1 mes tras la vacunación primaria. El objetivo primario fue valorar los porcentajes de seroprotección ó respuesta vacunal para los antígenos DTaP-HepB-IPV/Hib 1 mes tras la vacunación primaria.

Se vacunaron 601 lactantes (296 en el grupo Tdap y 305 en el grupo placebo). Un mes tras la vacunación primaria los porcentajes de seroprotección fueron del 100% (difteria, tétanos), ≥98,5% (hepatitis B), ≥95,9% (polio) y ≥94,5% (Hib) en ambos grupos. Los porcentajes de respuesta vacunal para los antígenos de tosferina fue significativamente menor en niños cuyas madres habían recibido la vacuna Tdap en la gestación (37,5-77,1%) en comparación con los niños nacidos de madres que habían recibido placebo en la gestación (90.0-99.2%). El número de eventos adversos solicitados o no solicitados fue similar en ambos grupos. Eventos adversos graves ocurrieron en el 2,9% (grupo Tdap) y 5,6% (grupo placebo).

Como conclusión a nuestro estudio podemos decir que los anticuerpos antitosferina transferidos durante la gestación pueden disminuir el riesgo de tosferina en los primeros meses de vida (como se ha observado tras la inclusión de esta estrategia en el programa de vacunación) pero interfieren con la capacidad del lactante para producir anticuerpos antitosferina tras la vacunación primaria. El perfil de seguridad para la vacuna fue excelente.

Posteriormente, como continuación al estudio previo, evaluamos si la interferencia con la respuesta inmune de los lactantes a la vacunación primaria persistía

tras la dosis de refuerzo. Se incluyeron niños del estudio previo que recibieron dosis de refuerzo con DTaP- HepB-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) y vacuna antineumocócica 13-valente (Prevenar 13®) entre los 11 y 18 meses de edad.

Un total de 263 (grupo Tdap) y 277 niños (grupo control) recibieron una dosis de refuerzo con DTaP-HepB-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) y vacuna antineumocócica 13-valente (Prevenar 13®). Previo a la dosis de refuerzo, las concentraciones medias geométricas (GMCs) para los tres antígenos de tosferina y difteria fueron 1.4-1.5 veces mayores en los controles que en el grupo Tdap. No se observaron diferencias para otros antígenos incluidos en la vacuna DTaP-HepB-IPV/Hib (Infanrix Hexa®). Un mes tras la vacunación de refuerzo, los porcentajes de respuesta a la vacunación de refuerzo para los antígenos de tosferina fueron $\geq 92.1\%$ y los porcentajes de seroprotección para los otros antígenos de la vacuna DTaP-HepB-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) fueron $\geq 99.2\%$ en ambos grupos. Se observaron concentraciones medias geométricas (GMCs) tras la dosis de refuerzo más altas en los controles que en el grupo Tdap para hemaglutinina filamentosa (1.2 veces), toxina pertúsica (1.5 veces) y difteria (1.4 veces). Las concentraciones medias geométricas (GMCs) para los demás antígenos de la vacuna DTaP-HepB-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) fueron similares en ambos grupos. Se notificaron 3 eventos adversos graves (grupo control) y una muerte pre-booster (no relacionados con vacunas).

Como consecuencia de la interferencia de los anticuerpos antipertussis con la respuesta a la vacunación primaria frente a tosferina, las concentraciones de anticuerpos antitosferina continuaron siendo bajas en lactantes hijos de madres vacunadas con la vacuna Tdap durante la gestación, previo a la dosis de refuerzo con DTaP-HepB-IPV/Hib (Infanrix Hexa®). Tras la dosis de refuerzo las concentraciones de anticuerpos fueron menores para hemaglutinina filamentosa y para toxina pertúsica, pero no para pertactina. El significado clínico de esta interferencia precisa evaluación posterior.

3. Vacunas combinadas: el ejemplo de las vacunas hexavalentes

*Artículo 4 (Anexo): Merino Arribas JM, Carmona Martínez A, Horn M, Perez Porcuna XM, Otero Reigada MDC, Marès Bermúdez J, Centeno Malfaz F, Miranda M, Mendez M, García Cabezas MA, Christoph W, Bleckmann G, Fischbach T, Kolhe D, Van der Wielen M, Baine Y. Immunogenicity and Reactogenicity of DTPa-HBV-IPV/Hib and PHiD-CV When Coadministered With MenACWY-TT in Infants: Results of an Open, Randomized Trial. *Pediatr Infect Dis J.* 2018 Jul;37(7):704-714. doi: 10.1097/INF.0000000000002061. PMID: 29620722.*

Las vacunas combinadas son preparaciones individuales que incluyen dos o más antígenos de diferentes microorganismos y se administran conjuntamente en una sola inyección. También se consideran vacunas combinadas las que contienen antígenos de dos o más serogrupos o serotipos de un único microorganismo, como la vacuna antineumocócica conjugada tridecavalente (polisacáridos capsulares de 13 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*) (80).

La combinación de antígenos es un procedimiento complejo que requiere grandes esfuerzos en la fabricación e investigación para determinar los efectos sobre la inmunogenicidad, la reactogenicidad y la seguridad. La formulación requiere garantizar la estabilidad física, química y biológica entre sus componentes. Se han observado fenómenos de interferencia por competencia entre los antígenos en algunos casos, fenómenos de supresión cuando se utiliza la misma proteína transportadora en vacunas conjugadas y fenómenos de inducción de interferón entre vacunas de virus vivos, y uno inhibe la replicación del otro.

También hay fenómenos de interferencia química con los conservantes y adyuvantes (sales de aluminio, etc.) que afectan la inmunogenicidad y la estabilidad vacunal (80, 81).

Por estas razones, se requieren ensayos clínicos que comparen la inmunogenicidad, la reactogenicidad y la seguridad de las vacunas combinadas antes de

su comercialización definitiva y, además debe realizarse un seguimiento postcomercialización tras su aplicación a un número elevado de individuos, para detectar posibles reacciones adversas no observadas en los ensayos clínicos. Las vacunas combinadas deben cumplir los mismos estándares de seguridad y eficacia que las vacunas que contienen cuando éstas se administran por separado (80, 81).

Desde que se desarrolló la primera vacuna contra la viruela en 1796, el número de enfermedades prevenibles mediante vacunación ha aumentado rápidamente. Las vacunas combinadas que contienen más de un antígeno microbiano se han utilizado desde 1948, cuando los antígenos de difteria, tétanos y tosferina se agruparon en un solo producto para vacunar a los bebés (82).

La necesidad de vacunas multivalentes se hizo patente en 1995, cuando el término "alfilereros" se utilizó con frecuencia para describir los regímenes de vacunación infantil en los que se requerían múltiples inyecciones de vacunas en visitas únicas. Las vacunas combinadas ahora incluyen una base de toxoide diftérico y tetánico (DT) con tosferina de células completas (DTwP) o acelular (DTaP) a la que se han ido añadiendo varios antígenos, como el de poliomielitis inactivada (IPV) y *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) fabricando vacunas pentavalentes y posteriormente hepatitis B (HepB) para formar una vacuna hexavalente que cubre seis enfermedades diferentes (59, 83).

Con el aumento del número de vacunaciones de rutina, el desarrollo de vacunas combinadas pentavalentes y hexavalentes que se ajustan a los esquemas de vacunación de rutina se convirtió en una necesidad (59, 81, 82, 83).

Cuando se determinan los componentes que debe contener una vacuna combinada hay que considerar varios factores: la epidemiología y el calendario vacunal del área geográfica de aplicación, la disponibilidad y la compatibilidad de los antígenos vacunales, y la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna (80).

Las vacunas combinadas deben reunir una serie de condiciones como:

- a) Estabilidad durante un periodo de tiempo razonable bajo unas adecuadas medidas de conservación (36-48 meses);
- b) inmunogenicidad y eficacia similar a la de sus componentes por separado;
- c) misma edad de administración para cada uno de ellos;

d) mínima reactogenicidad local y general; e) ausencia de interferencia inmunológica entre los antígenos que contienen; f) posibilidad de integración en el calendario de vacunación y g) un volumen para inyectar tolerable y adecuado (80).

La principal ventaja de las vacunas combinadas es que previenen un mayor número de enfermedades con un único preparado. Como consecuencia de ello, se favorece el cumplimiento del calendario de inmunizaciones y aumentan las coberturas vacunales. Estas vacunas tienen mayor aceptación tanto por parte del personal sanitario como de la población en general, y al disminuir el número de inyecciones, proporcionan un mayor bienestar al individuo (81).

Además, su uso simplifica el manejo, el transporte y el almacenamiento en los centros de vacunación, permite reducir el número de visitas y favorece la armonización de los calendarios y la introducción de nuevas vacunas. Otras ventajas incluyen: reducción de los efectos secundarios, disminución de la exposición a excipientes y el ahorro de material y de tiempo de administración (81, 84).

Los inconvenientes de las vacunas combinadas son: 1) La valoración de la reactogenicidad es compleja, ya que las reacciones adversas son más difíciles de atribuir a cada uno de sus componentes; 2) La variabilidad del contenido de los lotes es más grande por su múltiple composición; 3) El coste directo de la vacuna combinada es superior al de las vacunas que contiene, aunque el coste indirecto disminuye al requerir un menor número de visitas y de personal, y menos gasto de material y almacenamiento y 4) La posibilidad de interferencia antigénica entre algunos de sus componentes. La exposición simultánea a múltiples antígenos conjugados podría producir una respuesta inmune aumentada o disminuida (80).

Las vacunas combinadas se han utilizado tanto en adultos como en niños durante más de medio siglo. La primera vacuna combinada fue utilizada en lactantes y niños en 1948 e incluía antígenos de difteria, tétanos y tos ferina. El paradigma de las vacunas combinadas son las vacunas hexavalentes (82).

Las vacunas combinadas actuales contienen una base que incluye los toxoides diftérico y tetánico con pertussis acelular (DTaP) o de célula entera (DTwP). A ellos se

han añadido varios antígenos como virus de la polio inactivados (IPV) y *Haepmophilus influenzae* (Hib) dando lugar a las vacunas pentavalentes. La adición de Hepatitis B (HBV) da lugar a las vacunas hexavalentes que ofrecen protección frente a seis enfermedades diferentes (80, 82).

La vacuna hexavalente proporciona una inmunogenicidad similar a la que originan sus componentes cuando se administran por separado y el perfil de seguridad es comparable al del componente más reactógeno. Desde finales del año 2000, la hexavalente es la vacuna combinada de elección en la primovacunación, en los primeros meses de vida con una alta efectividad (> 96%) (81, 83).

La coadministración de las vacunas hexavalentes con otras vacunas del programa de inmunización (neumocócicas conjugadas, meningocócicas, rotavirus, triple vírica) se asoció con altos porcentajes de niños seroprotegidos, con respuesta vacunal adecuada a todos los antígenos de la vacuna hexavalente (DTaP-HBV-IPV/Hib). Además, la coadministración no se asoció con una interferencia clínicamente significativa en las respuestas inmunes a las vacunas coadministradas y fue bien tolerada. Algunas combinaciones (DTaP-HBV-IPV/Hib + conjugadas neumocócicas o vacunas meningocócicas del serogrupo B) produjeron mayor reactogenicidad sistémica que mejoró con la administración profiláctica de paracetamol (81).

Cuatro vacunas hexavalentes que contienen pertussis acelular se han autorizado, de las cuales tres están disponibles en el mercado en Europa (59, 83). Dos vacunas fueron autorizadas en el año 2000 (Hexavac® [Sanofi Pasteur MSD S.N.C.] and Infanrix hexa® [GSK; DT3aP-HBV-IPV/Hib]) (84).

La autorización de comercialización para Hexavac® fue suspendida en 2005 y finalmente retirada en 2012 por la European Medicines Agency (EMA) debido a problemas acerca de su inmunogenicidad frente a hepatitis B (85). La tercera vacuna fue autorizada en 2012 fuera de la Unión Europea y en 2013 en Europa (DT2aP-HBV-IPV-Hib, Hexaxim® , Hexyon® or Hexacima® , Sanofi Pasteur) (83). La cuarta vacuna fue aprobada en Europa en 2016 (DT5aP-HBV-IPV-Hib, Vaxelis® , MCM Vaccine B.V.) (86).

Los estudios individuales concluyen que las tres vacunas hexavalentes tienen un

perfil de seguridad aceptable, aunque se han observado algunas diferencias significativas en la reactogenicidad. Todas las vacunas son bien toleradas pero Hexyon® es más reactogénica que Infanrix Hexa®. La inmunogenicidad de las vacunas DT2aP-HBV-IPV-Hib (Hexyon®) y DT5aP-HBV-IPV-Hib (Vaxelys®) fue no inferior a la vacuna DT3aP-HBV-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) en los ensayos clínicos realizados. Se observaron algunas diferencias en las respuestas inmunes a antígenos comunes, pero se desconoce su relevancia clínica (86). Las concentraciones de anticuerpos anti-hemaglutinina filamentosa (FHA) frente a B. pertussis y los anticuerpos anti-polyrribosilribitol fosfato (PRP) frente a H. influenzae tendieron a ser más elevados y los anticuerpos anti-HBV frente a hepatitis B y los anticuerpos frente a toxina antipertúsica de B. pertussis menores en niños vacunados con la vacuna DT2aP-HBV-IPV-Hib (Hexyon®) versus los vacunados con la vacuna DT3aP-HBV-IPV/Hib (Infanrix Hexa®). Las concentraciones de anticuerpos anti-toxina pertúsica y las concentraciones de anticuerpos anti-PRP post-dosis primaria tendieron a ser más altas y las concentraciones de anticuerpos anti-HBV, anti-FHA y anti-pertactina de B. pertussis menores en los vacunados con la vacuna DT5aP-HBV-IPV-Hib (Vaxelys®) frente a los vacunados con la vacuna DT3aP-HBV-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) (86). La respuesta inmune post-vacunación primaria fue ligeramente inferior frente a la mayoría de antígenos cuando se utilizó un esquema de vacunación 2 + 1 que cuando se utilizó un esquema 3 + 1 lo que sugiere que los esquemas 2+1 sólo deben aplicarse en países con niveles de cobertura vacunal muy altos (86).

Infanrix-Hexa® necesita reconstituirse ya que el componente Hib se presenta en forma liofilizada. Cada dosis (0.5 mL) de vacuna contiene al menos 30 unidades internacionales (IU) de toxoide diftérico, al menos 40 IU de toxoide tetánico; 25 µg de toxoide pertúsico; 25 µg de hemaglutinina filamentosa; 8 µg de pertactina; 10 µg de antígeno DNA recombinante de superficie de hepatitis B; 40, 8, and 32 unidades de antígeno D de los poliovirus 1,2 y 3, respectivamente y 10 µg de polyribosyl-ribitol-phosphate (PRP) de Hib conjugado con toxoide tetánico (84).

La pauta de administración más habitual ha sido de 2-3 dosis en primovacunación seguido de una dosis de refuerzo a los 12-15 meses. La vacuna también se ha mostrado eficaz y segura en bebés prematuros. En cuanto a la protección a largo plazo en niños de 6 años la respuesta de anticuerpos de los niños fue adecuada para todos sus componentes,

y se obtuvieron niveles de seroprotección para todos los antígenos menos para toxina pertúsica (PT). Se han realizado ensayos de coadministración con otras vacunas pediátricas (neumococo, rotavirus, conjugada meningocócica, sarampión, parotiditis, rubeola y varicela) mostrando una respuesta inmune adecuada (81).

Las vacunas hexavalentes, ya sea como vacunación primaria o como dosis de recuerdo, han sido bien toleradas en general (84). En general, con la excepción de una mayor tasa de fiebre y síntomas locales (leves a moderados y transitorios en los primeros días tras la inyección) en comparación con las vacunas de control, las vacunas hexavalentes no mostraron diferencias significativas en la tolerabilidad.

La seguridad de las vacunas hexavalentes se cuestionó en 2003, con motivo de la comunicación de 5 casos de muerte súbita inesperada, de causa desconocida, en las 24 h posteriores a la vacunación con una hexavalente. La EMEA emitió 2 declaraciones públicas sobre la seguridad de las vacunas hexavalentes en el año 2003, y se reafirmó en que no se encontraba una causa biológica plausible que relacionase las vacunas con las muertes ocurridas en el segundo año de vida, recomendando continuar con la vacunación con hexavalentes. La OMS emitió una nota en el mismo sentido en 2005.

En relación con la inmunogenicidad algunos estudios muestran una pérdida de inmunidad con el tiempo. En niños de 4,3 a 8 años de edad que habían recibido al menos 3 dosis de vacuna hexavalente, los niveles de anticuerpos contra el tétanos estaban en un nivel satisfactorio, pero las tasas de seroprotección frente a difteria y la tosferina fueron bajas.

Un hecho relevante en las vacunas combinadas es la modificación de la respuesta inmune frente a un epítipo específico inducida por la proteína transportadora que consiste en que las respuestas de anticuerpos frente a los haptenos presentados en un transportador son inhibidas o aumentadas por la inmunización previa con el transportador específico. La dosis, vía de administración, selección de la proteína transportadora y presencia de adyuvante contribuyen a determinar si la respuesta inmune al epítipo aumenta o disminuye. La supresión ocurre más frecuentemente cuando se utilizan grandes cantidades de proteína transportadora en primovacuna produciendo altas cantidades de anticuerpos. La coadministración de dos vacunas

conjugadas que utilizan el mismo transportador puede dar lugar a interferencia (81).

El efecto de la administración previa o concomitante de proteínas transportadoras utilizadas en las vacunas conjugadas es impredecible y debe ser evaluado para cada vacuna combinada, lo que ha dado lugar a la evaluación de diferentes proteínas transportadoras (ej proteína D de *H. influenzae* no tipable) (81).

Los adyuvantes como el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio se unen a las vacunas inactivadas por unión iónica no covalente. La combinación de una vacuna que se administra generalmente con adyuvante con otra vacuna que no se administra con adyuvante puede dar lugar al desplazamiento del adyuvante y a una inmunogenicidad reducida de la primera vacuna. Además, el adyuvante podría combinarse con el segundo antígeno y alterar la respuesta inmune a la segunda vacuna también.

Los buffers, estabilizadores, excipientes y componentes similares incluidos en una vacuna pueden interferir con los componentes de otra vacuna (ej el timerosal puede disminuir la potencia de IPV).

Cuando se combinan diferentes cepas virales en una vacuna viva atenuada la competición entre los virus es el problema más frecuente. Puede evitarse aumentando el número de dosis de vacuna o modificando las concentraciones de las cepas virales individuales en la vacuna.

La administración de varias vacunas combinadas puede producir fenómenos de interferencia que modifiquen la inmunogenicidad y reactogenicidad.

Nosotros realizamos un estudio para valorar la inmunogenicidad y reactogenicidad de la coadministración de tres vacunas combinadas (Hexavalente, antineumocócica decavalente y antimeningocócica tetravalente) y la posible interferencia entre ellas.

Se evaluó la inmunogenicidad y reactogenicidad de una vacuna combinada inactivada frente a difteria, tétanos, tosferina acelular, hepatitis B, polio y *Haemophilus influenzae* tipo b (DTPa-HBV-IPV/Hib; Infanrix Hexa®; GSK), una vacuna neumocócica conjugada 10-valente (PHiD-CV; Synflorix®; GSK) administradas conjuntamente con

una vacuna meningocócica conjugada tetravalente (Men ACWY-TT) en lactantes entre 6 y 12 semanas de edad.

Se realizó un estudio de fase III, abierto y controlado (NCT01144663), en el que se incluyeron 2095 lactantes sanos que se aleatorizaron (1:1:1:1) en 4 grupos para recibir MenACWY-TT a los 2, 3, 4 y 12 meses de edad (grupo MenACWY-TT3) o MenACWY-TT (grupo MenACWY-TT2), MenC CRM197 (Menjugate®; GSK; grupo MenC CRM197) o MenC-TT (NeisVac C®; Pfizer; grupo MenC-TT) a los 2, 4 y 12 meses de edad. Todos los participantes recibieron PHiD-CV (Synflorix®; GSK) y DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix Hexa®; GSK) a los 2, 3, 4 y 12 meses de edad. La inmunogenicidad de DTPa-HBV-IPV/Hib se evaluó en un subgrupo del 25% de los participantes de cada grupo después de la vacunación primaria, antes del refuerzo y después de la vacunación de refuerzo, mientras que la inmunogenicidad de PHiD-CV se evaluó en todos los momentos. La reactogenicidad se evaluó sobre el total de vacunados de acuerdo a los datos obtenidos durante los 8 días siguientes a de cada vacunación.

Para cada antígeno DTPa-HBV-IPV/Hib, $\geq 97,2\%$, $\geq 76,5\%$ y $\geq 97,9\%$ de los participantes tenían niveles seropositivos/seroprotectores un mes post-vacunación primaria, antes del refuerzo y 1 mes después de la dosis de refuerzo, respectivamente. Para cada serotipo de neumococo vacunado, $\geq 74,0\%$ de los lactantes presentaron concentraciones de anticuerpos $\geq 0,35$ $\mu\text{g/mL}$ 1 mes después de la vacunación primaria, y se observaron aumentos significativos en las concentraciones medias geométricas de anticuerpos desde antes del refuerzo hasta después del refuerzo. El enrojecimiento en el punto de inyección de las vacunas DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) y PHiD-CV (Synflorix®) fue el más síntoma local más notificado con porcentajes hasta el 47,7% y el 57,0% de las dosis postprimarias y después de la vacunación de refuerzo, respectivamente.

Como conclusión podemos afirmar que en nuestro estudio la vacunación primaria y de refuerzo de lactantes y niños pequeños con DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix Hexa®) y PHiD-CV (Synflorix®) coadministradas con MenACWY-TT (Nimenrix®; Pfizer) fueron inmunogénicas con perfiles de reactogenicidad clínicamente aceptables. Estos resultados respaldan la coadministración de MenACWY-TT con vacunas infantiles de rutina. Esto supone beneficios para el niño (menor número de punciones), padres

(menor número de visitas vacunales) y un ahorro en fungibles. Además, se descarta el potencial problema de interferencia antigénica que puede ocurrir al utilizar vacunas con múltiples antígenos. A continuación se muestra la publicación de este estudio.

4. Vacunas conjugadas: Neumococo y Meningococo

Artículos (Anexo):

Artículo 5. Carmona Martínez A, Prymula R, Miranda Valdivieso M, Otero Reigada MDC, Merino Arribas JM, Brzostek J, Szenborn L, Ruzkova R, Horn MR, Jackowska T, Centeno-Malfaz F, Traskine M, Dobbelaere K, Borys D. Immunogenicity and safety of 11- and 12-valent pneumococcal non-typeable Haemophilus influenzae protein D-conjugate vaccines (11vPHiD-CV, 12vPHiD-CV) in infants: Results from a phase II, randomised, multicentre study. Vaccine. 2019 Jan 3;37(1):176-186. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.07.023. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30054160

Artículo 6: Merino Arribas JM, Carmona Martínez A, Horn M, Perez Porcuna XM, Otero Reigada MD, Marès Bermúdez J, Centeno Malfaz F, Miranda M, Mendez M, Garcia Cabezas MA, Wittermann C, Bleckmann G, Fischbach T, Kolhe D, van der Wielen M, Baine Y. Safety and Immunogenicity of the Quadrivalent Meningococcal Serogroups A, C, W and Y Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Coadministered With Routine Childhood Vaccines in European Infants: An Open, Randomized Trial. Pediatr Infect Dis J. 2017 Apr;36(4):e98-e107. doi: 10.1097/INF.0000000000001484. PMID: 28002359

La conjugación consiste en unir un polisacárido capsular bacteriano (de meningococo, neumococo, Hib o *Salmonella* sp.) con una proteína, ya sea sintética mutante (CRM197), o un toxoide (TT, TD). Esto permite generar una respuesta inmune más completa, timo dependiente, con participación de los linfocitos T y B (de memoria). Las vacunas polisacáridas no son inmunógenas por debajo de los 2 años de edad. Las vacunas conjugadas, sin embargo, inducen protección duradera desde las 6-8 semanas de vida y tienen la capacidad de erradicar las bacterias de la nasofaringe, influyendo sobre el estado de portador y contribuyendo a la inmunidad de grupo (87, 88).

El tracto respiratorio superior alberga una serie de bacterias potencialmente patógenas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* y *Staphylococcus aureus*) que habitualmente colonizan la

nasofaringe sin producir enfermedad, pero ocasionalmente pueden extenderse desde la nasofaringe a los pulmones o sangre y causar infecciones graves como neumonía, septicemia y meningitis.

Las bacterias encapsuladas son responsables de la mayoría de las bacteriemias y meningitis en niños. En niños mayores de 3 meses, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), *Neisseria meningitidis* (meningococo) y *Haemophilus influenzae* han sido los patógenos predominantes (89). La enfermedad es más común en niños pequeños <5 años y adultos mayores de 65 años.

Estos organismos tienen la característica común de estar rodeados por una cápsula de polisacárido, que es un factor de virulencia clave porque ayuda a las bacterias a evadir la acción del complemento y la posterior fagocitosis y muerte. Estos polisacáridos también han sido la base para las vacunas porque las respuestas inmunes contra la cápsula de polisacáridos son el mecanismo principal de protección para el huésped humano. Hasta ahora existen dos tipos de vacunas frente al neumococo: las que contienen los polisacáridos puros y las que contienen los polisacáridos capsulares conjugados a un transportador proteico (87).

Por ser antígenos T-independientes, las vacunas que contienen polisacáridos puros no inducen memoria inmunológica ni respuestas secundarias de anticuerpos, además de ser poco inmunógenas por debajo de los 2 años de edad. Por otra parte, la administración repetida de estas vacunas induce cada nueva administración un título menor de anticuerpos

(tolerancia). Las vacunas conjugadas contienen antígenos T-dependientes, inducen memoria inmunológica y dan lugar a respuestas secundarias de anticuerpos (mucho más rápidas, con títulos mucho más elevados y con mayor avidéz y afinidad por el antígeno). Además, son inmunógenas desde los primeros meses de vida y generan inmunidad en las mucosas, disminuyendo el estado de portador nasofaríngeo (87).

La OMS ha definido los siguientes criterios serológicos de protección conjunta para todos los serotipos frente a ENI: un título $\geq 0,35$ $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos IgG frente al polisacárido capsular del neumococo y una actividad opsonofagocítica (OPA) del suero

$\geq 1/8$ un mes después de la primovacunación. Los títulos protectores frente a neumonía y frente a OMA están peor definidos, pero es probable que para la primera se necesiten títulos 3-4 veces superiores a los de la enfermedad neumocócica invasora (ENI), mientras que para la segunda son necesarios títulos más de 10 veces superiores (87).

a. *Streptococcus pneumoniae*. Vacunas antineumocócicas conjugadas

Streptococcus pneumoniae es un diplococo gran positivo con cápsula polisacárida que se presenta como cocos individuales o en cadenas. Se han identificado más de 95 serotipos en función del polisacárido capsular (87).

La virulencia está relacionada en parte con el tamaño capsular aunque puede variar ampliamente. Los anticuerpos específicos contra los polisacáridos capsulares confieren protección al huésped, promoviendo la opsonización y la fagocitosis por los neutrófilos.

Streptococcus pneumoniae es una de las principales causas de otitis media (OM), neumonía, sepsis y meningitis a nivel mundial. En 2015 se estima que se produjeron unos 3.7 millones de casos de enfermedad neumocócica grave y 294000 muertes (87, 90). *S. pneumoniae* constituye una causa fundamental de muerte en niños menores de 5 años con una morbilidad sustancial en el mundo.

Por ejemplo, en África, la incidencia acumulada de ENI fue de 62,6 por 100.000 personas-año, incluida la meningitis, que tuvo una incidencia acumulada de 24,7 por 100.000 personas-año. La prevalencia agrupada de susceptibilidad a la penicilina fue del 78,1% (IC del 95%: 61,9; 89,2). En conjunto, las vacunas PCV10 y PCV13 incluyeron el 66,9 y el 80,6 % de los serotipos de ENI, respectivamente (91, 92). La bacteria coloniza la nasofaringe desde los primeros meses de vida. La máxima tasa de colonización se alcanza a los 3 años (entre el 25% y el 80%) (87, 93).

La colonización nasofaríngea (NP) es un paso previo necesario en la progresión hacia la enfermedad neumocócica. Sin embargo, no todas las cepas neumocócicas que expresan diferentes serotipos capsulares son igualmente virulentas ni causan

enfermedad con la misma probabilidad (93).

En las poblaciones vacunadas con PCV, los serotipos no vacunales que colonizan la nasofaringe como comensales tienden a adquirir determinantes de virulencia y resistencia a los antibióticos y emergen como nuevas cepas que causan la enfermedad neumocócica.

Los factores de riesgo para la colonización nasofaríngea por neumococo son: edad menor de 2 años, exposición al humo del tabaco, agrupamiento de los niños, asistencia a guardería, estación de invierno y ausencia de lactancia materna (93).

La colonización inicial por neumococo ocurre antes en los países de bajos ingresos (primer mes de vida) en comparación con los países de altos ingresos y alcanza su punto máximo entre los 2 y 3 años de edad. Entre los niños en edad escolar, entre el 20% y el 60% pueden estar colonizados, mientras que sólo entre el 5% y el 10% de los adultos lo están. La duración de la colonización también varía y generalmente es más prolongada en niños que en adultos. La prevalencia de la colonización nasofaríngea disminuye con el tiempo, lo que sugiere que la colonización provoca protección (93).

La colonización nasofaríngea constituye el único reservorio del neumococo, contribuye a la diseminación comunitaria e intrafamiliar del microorganismo y juega un papel esencial en la selección de resistencias frente a antibióticos. La capacidad invasiva de *S. pneumoniae* difiere entre los serotipos y probablemente según la edad del sujeto. La mayoría de los serotipos de *S. pneumoniae* pueden causar enfermedad grave, pero de los 92 serotipos conocidos, 10 serotipos representan el 62% de la enfermedad invasora en el mundo (93).

Antes de que se introdujeran las vacunas neumocócicas conjugadas, los serotipos 1, 5, 6A, 6B, 14, 19 F y 23 F eran los serotipos más comunes causantes de enfermedad neumocócica invasora a nivel mundial en niños <5 años (94).

La distribución por edades de la enfermedad neumocócica invasora ha cambiado con la inmunización universal de lactantes y niños pequeños con vacuna conjugada. Antes del año 2000, la enfermedad neumocócica invasora se observaba con mayor

frecuencia en niños menores de 5 años con un segundo pico después de los 65 años. Actualmente, las tasas más altas de enfermedad neumocócica invasora se observan en personas mayores de 65 años con un pico más pequeño en niños menores de 5 años y una proporción cada vez mayor de casos pediátricos en el grupo de edad de 5 a 18 años. Los anticuerpos específicos de serotipo se transfieren pasivamente de la madre y protegen durante los primeros meses de vida en los bebés nacidos a término. La incidencia máxima de enfermedad neumocócica invasora en niños ocurre entre los 6 y 11 meses de edad, cuando los anticuerpos maternos disminuyen. En las infecciones neumocócicas neonatales, el organismo generalmente se adquiere del tracto genital materno y se han identificado enfermedad de aparición temprana y tardía. La bacteriemia de origen no conocido es la presentación más común de enfermedad neumocócica invasora en niños hasta 2 años de edad, y representa aproximadamente el 70% de la enfermedad invasora en este grupo de edad, mientras que la neumonía bacteriémica representa del 12% al 16% de los casos (93).

Los niños con riesgo elevado de infección neumocócica invasiva incluyen (87):

- 1) Niños inmunocompetentes con enfermedad cardíaca o pulmonar crónica, diabetes mellitus, fistulas de LCR o implantes cocleares.
- 2) Niños con asplenia anatómica o funcional: drepanocitosis y otras hemoglobinopatías, asplenia congénita o adquirida o disfunción esplénica, infección por VIH, enfermedad crónica renal y síndrome nefrótico
- 3) Niños con inmunodepresión: enfermedades asociadas con tratamientos con fármacos inmunosupresores o tratamiento radioterápico, incluidas neoplasias malignas, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, trasplante de órganos sólidos o de progenitores hematopoyéticos e inmunodeficiencias congénitas.

Streptococcus pneumoniae causa dos formas de enfermedad: invasora (meningitis, bacteriemia, sepsis, neumonía bacteriémica y otras) y no invasora (neumonía, otitis media y sinusitis) (87). La carga de enfermedad neumocócica es enorme. Una de cada cinco muertes en niños menores de 5 años en el mundo se produce por neumonía. *Streptococcus pneumoniae* es la causa principal de fallecimiento por

enfermedades prevenibles por vacunas en niños menores de 5 años en el mundo (87).

Cada año se producen más de 5 millones de casos de otitis media aguda (OMA) en niños de Estados Unidos, lo que origina más de 10 millones de prescripciones de antibióticos y aproximadamente 30 millones de visitas médica con unos costes directos e indirectos de alrededor de 4 a 6 mil millones de dólares al año (95).

La enfermedad neumocócica invasiva se produce sobre todo en niños menores de 2 años y en mayores de 65 años. Los niños con factores de riesgo tienen tasas de incidencia de enfermedad neumocócica invasora 50 veces mayores.

La bacteriemia de origen desconocido por *Streptococcus pneumoniae* es una forma de presentación frecuente. Además, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) causa aproximadamente el 28-55 % de los casos de OMA (93). En países en los que no están incluidas las vacunas antineumocócicas conjugadas en el programa nacional de inmunización *Streptococcus pneumoniae* causa entre el 30% y el 60% de las OMA (95). Los niños que asisten a guardería tienen un riesgo dos o tres veces mayor de otitis media o enfermedad neumocócica invasora.

Las vacunas antineumocócicas conjugadas de polisacárido-proteína desarrolladas para lactantes han tenido un gran éxito en el control de la enfermedad causada por serotipos virulentos específicos de la vacuna. Han demostrado ser muy eficaces para reducir la enfermedad neumocócica invasora, la neumonía en niños pequeños y la resistencia a los antibióticos (94, 96).

Las vacunas antineumocócicas de polisacáridos conjugados han dado lugar a una disminución marcada de las infecciones neumocócicas producidas por los serotipos vacunales (SV) y a una disminución de las resistencias bacterianas, la mayoría asociadas a los serotipos contenidos en la vacuna (94, 97). De forma paralela, se ha producido un incremento de los serotipos no vacunales (fenómeno de reemplazo). La OMS ha destacado la resistencia neumocócica a los antimicrobianos como un importante problema de salud pública, y los serotipos emergentes muestran en ocasiones resistencia a múltiples antibióticos (90).

El impacto del uso generalizado de la vacuna conjugada neumocócica en niños sobre la enfermedad neumocócica invasora se ha observado en todos los grupos de edad (87). La enfermedad neumocócica invasora asociada a los serotipos vacunales disminuyó más del 99% en niños menores de 5 años (97). Tras la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas, la incidencia general de enfermedad neumocócica invasora en niños durante el primer año después de la vacunación fue menor que en el período previo a la vacunación y se mantuvo estable durante 7 años. Siete años después de la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas, la incidencia de enfermedad neumocócica invasora por serotipos incluidos en la vacuna disminuyó cada año, mientras que la incidencia de enfermedad neumocócica invasora por serotipos no vacunales aumentó notablemente (94).

La incidencia de enfermedad asociada a cepas resistentes a penicilina se redujo un 35%. Tras una década de uso de la vacuna 7-valente se observó un aumento de la incidencia de enfermedad neumocócica invasora causada por serotipos no incluidos en la vacuna (enfermedad por reemplazamiento), especialmente por los serotipos 19A, 7F, 15B/C, 12F, 22F y 24F (94). El aumento de serotipos no vacunales se observó también en casos de empiema, mastoiditis, otitis media y síndrome hemolítico urémico neumocócico.

Las vacunas antineumocócicas de valencia ampliada, PCV10 y PCV13 (que añadía los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A a la vacuna inicial), han dado lugar a una reducción significativa de los casos ENI por los serotipos vacunales (93%), neumonía por todas las causas, empiema, mastoiditis, otitis media aguda y otitis media complicada, no solo en los niños vacunados sino también en los no vacunados y los adultos, incluidos los mayores de 65 años de edad (protección de rebaño) (87, 96, 97).

La disminución de los serotipos vacunales se ha acompañado de un aumento de los casos de ENI por serotipos no vacunales, siendo los más frecuentes el 22F, el 12F, el 33F, el 24F, el 15C, el 15B, el 23B, el 10A y el 8 (87, 98). La resistencia a los antimicrobianos entre *S. pneumoniae* sigue siendo un problema de salud serio, especialmente para los β -lactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas. La introducción de la vacuna conjugada neumocócica 13- valente (PCV13) ha conseguido erradicar los

serotipos más comunes asociados a resistencia a penicilina (6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F y 23F) (97).

La resistencia a antibióticos en los aislados de *S. pneumoniae* se notificó por primera vez en los años 60 en Estados Unidos, con resistencia intermedia a penicilina. En los 70 y 80, neumococos resistentes a la penicilina se notificaron de forma global. La primera cepa de neumococo multirresistente (MDR) fue identificada en Sudáfrica en 1977. Posteriormente numerosos linajes de neumococos MDR con resistencia a tres o más antimicrobianos fueron detectados circulando a lo largo del mundo. Las infecciones por neumococos resistentes a antimicrobianos suponen una carga sustancial en términos de gasto sanitario y se asocian a una peor evolución de los pacientes con un aumento de la mortalidad intrahospitalaria por neumonía. La introducción de las vacunas conjugadas antineumocócicas en los programas de vacunación de más de 140 países en las últimas dos décadas se ha asociado a un descenso global de las infecciones por neumococos resistentes a antimicrobianos. Esto se debe a la reducción de la incidencia de los serotipos incluidos en la vacuna, que constituían la mayoría de los serotipos resistentes a los antimicrobianos previos a la introducción de las vacunas conjugadas. No obstante, tras la vacunación ha habido un aumento de cepas con resistencia a antibióticos entre ciertos serotipos no incluidos en la vacuna (90) y, como consecuencia, la proporción de aislados no susceptibles a determinados antibióticos (macrólidos o tetraciclina) permanecen sin variación tras la implementación de la vacunación con vacunas conjugadas neumocócicas (90). Además, algunos países que han introducido las vacunas conjugadas antineumocócicas en sus programas de vacunación han observado un aumento en la proporción de neumococos que muestran resistencia a uno o más antibióticos, como 8, 15A, 33F y 35B (90).

Las vacunas conjugadas neumocócicas (PCVs) se han utilizado desde el año 2000. El efecto acumulativo en 20 años en la incidencia de ENI (enfermedad neumocócica invasora) en niños menores de 5 años es enorme (87, 93, 98). Se estima que en Estados Unidos, las PCVs han evitado >282000 casos de ENI, incluyendo unas 16000 meningitis, 172000 bacteriemias, y 55000 casos de neumonía bacteriémica. Además, la vacunación ha evitado 97 millones de visitas médicas por otitis media, 706345 hospitalizaciones por neumonía y un total de 2780 muertes. Los casos de ENI disminuyeron un 91% desde

15,707 en 1997 a 1,382 en 2019. Las visitas anuales por otitis media disminuyeron un 41%, desde 78 visitas /100 niños antes de la introducción de la PCV a 46 visitas/100 niños tras la introducción de PCV13 (99). Las hospitalizaciones anuales por neumonía se redujeron un 66%-79%, desde 110000-175000 en 1997 a 37000 en 2019.

En España, el uso de las PCVs dio lugar a un descenso en la incidencia de los serotipos causantes de enfermedad invasora o no invasora incluidos en la vacuna en niños vacunados, no vacunados y adultos. Además, la cobertura de los serotipos más resistentes incluidos en la vacuna dio lugar a un descenso global en la resistencia a antibióticos. Como efecto indeseable se observó un aumento en los serotipos no incluidos en la vacuna, especialmente los serotipos 1, 7F and 19A tras la vacunación con PCV7 y del serotipo 8 tras la vacunación con PCV13, haciendo los efectos beneficiosos de la vacunación menos aparentes (87, 90, 98).

La presión de la vacuna y la resistencia a los antibióticos impulsan el reemplazo de los serotipos vacunales por no vacunales, lo que reduce la eficacia neta de las vacunas neumocócicas conjugadas. Debido a que la transmisión neumocócica ocurre con mayor frecuencia a través del contacto con bebés y niños pequeños, la vacunación generalizada de estos grupos tiene el potencial de reducir sustancialmente la enfermedad en todas las cohortes de edad al reducir el transporte nasofaríngeo y la transmisión de los serotipos vacunales.

Una reducción en el número de portadores puede disminuir la transmisión de serotipos vacunales y la incidencia de enfermedades en todas las edades mediante una combinación de protección directa e indirecta (100).

El conocimiento de los de los serotipos no vacunales prevalentes que colonizan la nasofaringe en un país identifica los serotipos neumocócicos con mayor probabilidad de surgir como patógenos (90,95).

La inclusión de las PCVs en los programas de vacunación infantil, su aprobación para uso en adultos y el aumento del número de serotipos cubiertos por las vacunas en desarrollo son estrategias potentes en la lucha contra la enfermedad neumocócica (96, 98).

Existe una disparidad entre los serotipos que causan enfermedad neumocócica invasiva (ENI), menos frecuente pero potencialmente mortal, y los serotipos productores de infecciones de las mucosas, más frecuentes y costosas (neumonía adquirida en la comunidad no bacteriémica y otitis media aguda. Esto complica las decisiones sobre las vacunas antineumocócicas incluidas en los programas de inmunización (95). Después de la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas en los programas de inmunización pediátricos, la carga general de enfermedad neumocócica invasora en los niños es residual y se mantiene en niveles bajos entre los países con una alta cobertura de vacunación, independientemente de las diferencias en los programas de inmunización y de la epidemiología del neumococo. Los efectos sobre la enfermedad neumocócica invasora general fueron más variables en el anciano. Mientras que la enfermedad neumocócica invasora se debía principalmente a los serotipos vacunales antes de la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas, los serotipos no vacunales son los principales agentes causales hoy en día en niños y adultos (101).

Las PCVs de Merck (PCV15) y Pfizer (PCV20) fueron autorizadas en Europa y Estados Unidos en el año 2021 para uso en adultos. La autorización de la vacuna PCV15 para niños se produjo en 2022 y para la vacuna PCV20 en 2023 (95). Los serotipos prevalentes en Bélgica, Alemania, Francia, Italia, España, Suecia y Estados Unidos son similares pero existen diferencias importantes (102). Los serotipos incluidos en PCV20 representan actualmente la mayoría de los casos de enfermedad neumocócica invasora en Europa en todas las edades (71,4%), de los cuales el 39,2% fueron causados por serotipos PCV20 distintos de PCV13.

En Europa si la efectividad de los serotipos incluidos fuera del 100% para ambas vacunas, y si la cobertura cruzada del serotipo 15C por la vacunación con el serotipo 15B fuera del 100%, se estima que un 28% y un 48% de los casos de otitis media aguda podrían prevenirse en niños vacunados en el primer año tras la introducción de la vacuna PCV15 y PCV20, respectivamente.

Las vacunas antineumocócicas conjugadas han producido un impacto importante en la reducción de la otitis media neumocócica y en la colonización nasofaríngea

asintomática proporcionando efecto inmunitario de rebaño y modificando significativamente la epidemiología de la infección neumocócica (96, 99). La efectividad de la vacuna en la prevención de la OM varía según el tipo de vacuna. En niños menores de 24 meses la eficacia vacunal osciló entre 8% y 42,7% (PCV7), 5,6% a 84% (PCV10) y 2,2% a 68% (PCV13). En niños menores de 60 meses, la efectividad vacunal osciló entre 13,2% y 39% para PCV7, 11% al 39% para PCV10 y del 39% al 41% (PCV13). La vacunación tiene un efecto significativo en la disminución de OM en niños menores de cinco años (103).

En relación con la prevención de la infección neumocócica existen dos tipos de vacunas: las que contienen los polisacáridos puros y las que contienen los polisacáridos capsulares conjugados a una proteína transportadora (87).

La vacuna polisacáridica disponible es una vacuna 23-valente (PPSV23, Pneumovax®) (104) que contiene polisacáridos purificados (25 mcg de cada uno) de 23 serotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F) que representan el 90% de los serotipos productores de enfermedad neumocócica invasora. Por ser antígenos T-independientes, las vacunas que contienen polisacáridos puros no inducen memoria inmunológica y no tienen capacidad booster con la reexposición tras la primovacunación, además de ser poco inmunógenas por debajo de los 2 años de edad. Los niveles de anticuerpos serotipo-específicos disminuyen rápidamente tras la vacunación en 3-5 años. La inmunización no reduce la colonización nasofaríngea y la eficacia frente a la infección mucosa como la neumonía no bacteriémica y la otitis media es limitada. Por otra parte, la administración repetida de estas vacunas induce cada nueva administración un título menor de anticuerpos (tolerancia) (87).

A pesar de estas limitaciones, el uso de Pneumovax 23 se recomienda para niños con riesgo elevado de enfermedad neumocócica invasora, como los niños con drepanocitosis o con infección por VIH, tras completar la vacunación con la vacuna conjugada.

Las vacunas conjugadas contienen antígenos T-dependientes, inducen memoria inmunológica y dan lugar a respuestas secundarias de anticuerpos (mucho más rápidas, con títulos mucho más elevados y con mayor avidéz y afinidad por el antígeno) (87).

Además, son inmunógenas desde los primeros meses de vida y generan inmunidad en las mucosas, disminuyendo el estado de portador nasofaríngeo. En el momento actual están disponibles en España las siguientes vacunas antineumocócicas conjugadas (87):

1)Synflorix®: compuesta por polisacáridos capsulares conjugados a proteínas transportadoras. Contiene 1 mcg de los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F y 3 mcg de los polisacáridos capsulares de los serotipos 4, 18C y 19F. Todos los serotipos, excepto los serotipos 18C y 19F están conjugados con la proteína D recombinante de H. influenzae no tipable. El serotipo 18C está combinado con toxoide tetánico y el 19F con el toxoide diftérico. Contiene fosfato de aluminio, cloruro sódico y agua estéril. Se presenta en jeringa precargada con 0,5 ml de solución inyectable, turbia, de color blanco. No precisa reconstitución. Debe conservarse refrigerada entre +2°C y +8°C (105).

2)Prevenar13®: compuesta por polisacáridos capsulares conjugados con la proteína transportadora CRM197. Contiene 2,2 mcg de los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 4,4 mcg del polisacárido capsular del serotipo 6B. Contiene cloruro sódico, fosfato de aluminio, ácido succínico y polisorbato 80. 1 dosis de 0,5 ml contiene aproximadamente 32 mcg de proteína transportadora CRM197 (106).

Actualmente se recomienda la inmunización con PCV13 para todos los lactantes en un programa de inmunización primaria, en lactantes no vacunados previamente con un esquema 2+1 (2, 4 y 11-15 meses). Es necesaria una dosis booster en el segundo año para conseguir una protección adecuada. En niños que son vacunados con esquema 3+0 se produce una disminución significativa del título de anticuerpos de tal manera que la mayoría de los niños no se encuentran protegidos de forma completa (107, 108).

Los niños de alto riesgo ≥ 2 años de edad, como aquellos con asplenia, enfermedad de células falciformes, algunos tipos de inmunodeficiencia (deficiencias de anticuerpos), infección por VIH, implante coclear, fuga de LCR, diabetes mellitus y enfermedad crónica pulmonar, cardíaca o renal (incluido el síndrome nefrótico), puede beneficiarse también de PPSV23 administrado después de los 2 años de edad tras la vacunación primaria con PCV13. Por lo tanto, se recomienda que los niños de 2 años de

edad y mayores con estas afecciones subyacentes reciban la vacuna suplementaria con PPSV23 (87). Se recomienda una segunda dosis de PPSV23 5 años después de la primera dosis de PPSV23 para personas ≥ 2 años de edad que estén inmunocomprometidas, tengan anemia falciforme o asplenia funcional o anatómica. 3)Prevenar20®: compuesta por polisacáridos capsulares conjugados con la proteína transportadora CRM197. Cada dosis de 0,5 ml de la vacuna está formulada para contener aproximadamente 2,2 mcg de los polisacáridos capsulares de cada uno de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y 4,4 mcg del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, 51 mcg de proteína transportadora CRM197, 100 mcg de polisorbato 80, 295 mcg de ácido succínico, 4,4 mg de cloruro de sodio y 125 mcg de aluminio como fosfato de aluminio (102, 109).

4)Vaxneuvance®: compuesta por polisacáridos capsulares conjugados con la proteína transportadora CRM197. Cada dosis de 0,5 ml de la vacuna contiene aproximadamente 2 mcg de los polisacáridos capsulares de cada uno de los serotipos neumocócicos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y 4 mcg del serotipo neumocócico tipo 6B. Además, cada dosis de 0,5 ml contiene aproximadamente 30 microgramos de proteína transportadora, adsorbida en fosfato de aluminio (125 microgramos de aluminio [Al^{3+}]) como adyuvante, cloruro de sodio (NaCl), L-histidina, polisorbato 20, y agua para preparaciones inyectables (110).

La conjugación de los antígenos polisacáridos con proteínas transportadoras puede producir interferencia antigénica. Nosotros estudiamos la reactogenicidad e inmunogenicidad de dos vacunas antineumocócicas conjugadas tras la adición de dos serotipos con una proteína transportadora diferente al resto de serotipos.

Se evaluaron dos vacunas en investigación 11 y 12 valentes, que contenían polisacáridos capsulares de 10 serotipos, como en la vacuna antineumocócica 10-valente conjugados con la proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipable (PHiD-CV) y polisacáridos capsulares conjugados con CRM197 de serotipos 19A (11-valente) ó 19A y 6A (12-valente).

Se realizó un estudio multicéntrico, parcialmente ciego y en fase II

(NCT01204658) en el cual lactantes sanos fueron aleatorizados (1:1:1:1) para recibir 11vPHiD-CV, 12vPHiD-CV, PHiD-CV o vacuna antineumocócica 13-valente conjugada con CRM197 (PCV13) a los 2, 3 y 4 meses (serie primaria) y a los 12-15 meses de edad (dosis de refuerzo), coadministrado con DTPa-HBV-IPV/Hib. Los objetivos primarios evaluaron la no inferioridad de las vacunas en investigación frente a las comparadoras (PHiD-CV para los serotipos comunes; PCV13 para 19A y 6A), en términos de porcentaje de lactantes con concentraciones de anticuerpos neumocócicos de $0,2 \mu\text{g/ml}$ y concentraciones medias geométricas de anticuerpos, tras la vacunación primaria. Se evaluaron la reactogenicidad y la seguridad.

Se incluyeron 951 niños que recibieron 1 dosis primaria y 919 una dosis de refuerzo. Los criterios inmunológicos de no inferioridad predefinidos se cumplieron simultáneamente para 9 de 11 serotipos de la vacuna 11vPHiD-CV (todos excepto 23F y 19A) y 10 de 12 serotipos de la vacuna 12vPHiD-CV (todos excepto 19A y 6A). Se alcanzaron los objetivos de no inferioridad.

Para cada serotipo PHiD-CV, los porcentajes de niños con concentraciones de anticuerpos $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$ fueron $\geq 96,7\%$ post vacunación primaria (excepto 6B [75,2%] y 23F [81,1%]), y $\geq 98,1\%$ post vacunación de refuerzo. Para cada serotipo PHiD-CV excepto el serotipo 1 $\geq 81,0\%$ y el $\geq 93,9\%$ de los niños tenían títulos de actividad opsonofagocítica ≥ 8 post vacunación primaria y de refuerzo.

La incidencia de eventos adversos fue similar en todos los grupos. Los eventos adversos graves se notificaron en 117 niños (29 en el grupo 11vPHiD-CV, 26 en el grupo 12vPHiD-CV, 38 en el grupo PHiD-CV y 24 en el grupo PCV13). Se consideraron 4 eventos adversos graves relacionados con la vacunación. No se registraron eventos fatales.

La adición de los serotipos 19A y 6A conjugados con CRM197 19A y 6A no alteró la inmunogenicidad de los serotipos conjugados con PHiD-CV. Para ambas vacunas en investigación, las respuestas inmunes posteriores a la dosis de refuerzo para los 10 serotipos comunes fueron similares a las obtenidas por PHiD-CV. Los perfiles de seguridad y reactogenicidad de las vacunas en investigación fueron comparables a PHiD-CV.

La conclusión de estudio es que la adición de dos serotipos conjugados con CRM197 a la vacuna autorizada antineumocócica decavalente con serotipos conjugados con una proteína diferente (proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipable) no modifica la respuesta inmune al resto de serotipos. Este trabajo tiene en cuenta el problema de la posible interferencia antigénica dependiendo de la proteína carrier elegida, algo común en la vacunación infantil. La potencia antigénica de la proteína carrier puede variar entre diferentes proteínas o si la carga de la misma proteína carrier es elevada en una vacuna.

b. *Neisseria meningitidis*. Vacunas antimeningocócicas

N. meningitidis es un miembro patógeno de la familia *Neisseria* cuyo habitat es el epitelio de la nasofaringe humana. El hombre es el único portador del meningococo. La tasa de portación nasofaríngea varía con la edad y el entorno. Entre el 8% y el 25% de la población humana es portadora de meningococo en la nasofaringe, siendo los adolescentes el principal reservorio (111-114). La vía de transmisión es respiratoria, por las gotitas de Flügge expulsadas por los enfermos o por portadores sanos. Desde la nasofaringe el meningococo ocasionalmente invade el torrente sanguíneo ocasionando sepsis fulminante (meningococemia, 10-18%), meningitis (37-50%) o ambas (7-12%) y, menos frecuentemente neumonía (10%), artritis séptica, pericarditis, uretritis y conjunctivitis (111-113, 115, 116).

El período de incubación de la enfermedad suele ser de 3-4 días (rango de 2 a 10) (111). La sintomatología inicial puede ser inespecífica (fiebre sin foco) o incluso, dependiendo de la edad del sujeto, con manifestaciones clínicas similares a procesos virales comunes (exantema papuloso, odinofagia, dolor abdominal, diarrea) (89, 114).

En adolescentes, el diagnóstico suele ser más tardío, lo que supone un riesgo mayor de fallecer a consecuencia de la enfermedad meningocócica invasora (EMI). Entre los años 2015 y 2016 se detectó en Reino Unido y en otros países (Países Bajos) una acumulación de casos de EMI por serogrupo W en población adolescente (la mayoría

pertenecientes al complejo clonal 11), que presentaban un debut peculiar con síntomas gastrointestinales (vómitos, dolor abdominal y diarrea) y evolución fulminante (mortalidad del 12%), muchos de ellos no llegaron incluso ni a desarrollar fiebre). En Australia se ha observado un aumento en el número de casos notificados de enfermedad meningocócica invasiva (EMI) debida al serogrupo W (MenW) desde 2013 con una tasa de letalidad del 10,7% (117, 118).

El meningococo puede causar enfermedad esporádica, brotes de casos, epidemias y pandemias de meningitis y septicemia y, con menor frecuencia, neumonía y otras infecciones locales. En la era anterior a la vacuna, se estima que cada año se producían entre 500.000 y 1 millón de casos en todo el mundo, pero la incidencia se ha reducido drásticamente, debido al uso generalizado de vacunas. La mayor carga de enfermedad se encuentra en el África subsahariana, donde las tasas endémicas de enfermedad han sido de 3 a 10 por 100.000 habitantes, pero las tasas fueron de 1 por 1.000 habitantes durante las históricas pandemias cíclicas que ocurrieron cada 8 a 10 años. La introducción en 2010 de una nueva vacuna meningocócica conjugada para el grupo A (MenAfriVac) eliminó los brotes del grupo A en la región y disminuyó la colonización nasofaríngea por ese serogrupo, pero continúan brotes menos graves de los grupos C, X y W (115, 118, 119).

La OMS estima un número total de 500 000 casos y 50 000 muertes anuales debidos a la enfermedad meningocócica, siendo los serogrupos B, C y W los más frecuentes a nivel mundial (111).

La EMI es una enfermedad infecciosa poco común, impredecible y potencialmente mortal. Los síntomas iniciales suelen ser inespecíficos y la enfermedad puede progresar rápidamente hasta volverse mortal en cuestión de horas. La EMI se asocia con una tasa de letalidad del 10-20% incluso con tratamiento óptimo dependiendo del serogrupo y de la edad del niño. En la era pre-antibiótica el 70-85% de los casos de enfermedad meningocócica fallecían. Secuelas a largo plazo se dan en el 4.3-20% de supervivientes, con un impacto importante en su calidad de vida (pérdida de extremidades, pérdida de audición, disfunción cognitiva, discapacidad visual, dificultades educativas, retraso en el desarrollo, déficit de nervios motores, trastornos

convulsivos y problemas de comportamiento) (89, 111, 113, 120).

En general, la mayor incidencia de EMI se produce en bebés menores de 12 meses con un segundo pico de incidencia en adolescentes con edades entre 15 y 19 años, en los que la transmisión se ve facilitada por las estrechas condiciones de vida y factores socioconductuales (89, 112, 114, 121, 122).

Las tasas de portador nasofaríngeo se dan en adolescentes y adultos jóvenes (23,7% en adultos de 19 años) (122, 123).

La colonización nasofaríngea en adolescentes se asocia a sexo hombre, fumar, asistir a fiestas o bares, uso reciente de antibióticos (correlación inversa) e infecciones respiratorias recientes (115, 121).

Debido a que los adolescentes/adultos jóvenes representan una proporción importante de los casos, a menudo tienen la tasa más alta de portadores y tienen una adherencia característicamente baja a la vacunación, los esfuerzos deben centrarse en educar a esta población sobre las consecuencias a largo plazo de la infección y la importancia de la vacunación meningocócica en la prevención (123).

Existen factores que predisponen al desarrollo de EMI (111, 115): exposición al humo del tabaco, padecimiento reciente de una enfermedad respiratoria (como la gripe), vivir en condiciones de hacinamiento, especialmente en ambientes con un alto porcentaje de portadores asintomáticos (colegios mayores, cuarteles, albergues, prisiones), el intercambio de saliva (relaciones interpersonales), las personas con déficit de factores del complemento (C5- C9, properdina y factores D o H), aquellas tratadas con eculizumab (por el efecto de bloqueo funcional que genera este tratamiento sobre los factores terminales del complemento), las que hayan padecido EMI con anterioridad y las que presentan asplenia anatómica o funcional (incluyendo hemoglobinopatías), así como los trabajadores de laboratorio que manejan el germen.

Las cepas de *N. meningitidis* que causan enfermedades invasivas casi siempre están encapsuladas. Los determinantes de virulencia del meningococo incluyen los polisacáridos de la capsula, proteínas de la membrana externa incluyendo pili, porinas

(Porina A y B), moléculas de adhesión (Opc) y endotoxina (Lipopolisacárido) (112).

La susceptibilidad a la invasión por una cepa recién adquirida de *N. meningitidis* está asociada con la ausencia de anticuerpos bactericidas contra esa cepa (115). La actividad bactericida sérica requiere la presencia de anticuerpos y complemento (112). El ensayo de actividad bactericida sérica (SBA) es el gold estandar para valorar la inmunidad frente a la EMI y permite establecer una correlación de protección para EMI. Títulos de hSBA ≥ 4 y de rSBA ≥ 8 parecen constituir un nivel protector.

N. meningitidis puede expresar una cápsula de polisacárido, que es el factor principal que determina su virulencia. Se han identificado doce serogrupos meningocócicos: A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y y Z. Seis de los 12 serogrupos (A, B, C, W, X e Y) históricamente han causado la mayoría de las EMI y están asociados con una epidemiología dinámica e impredecible que varía según el tiempo y las regiones (111, 116).

Su prevalencia varía debido a varios factores, como la ubicación, comportamiento, entorno económico, intervenciones de salud pública y fluctuaciones temporales que ocurren naturalmente. La incidencia anual de EMI es relativamente baja, oscilando en todo el mundo entre 0,01 y 3,6 casos por 100.000 personas durante las dos últimas décadas (116, 118, 122).

La epidemiología de la enfermedad meningocócica invasiva (EMI) es impredecible, varía según la región y el grupo de edad y evoluciona continuamente. La incidencia global de EMI entre 2000 y 2019 fue generalmente baja, con una variabilidad sustancial entre regiones en los serogrupos circulantes (114, 116, 124).

La incidencia de IMD depende de la presión vacunal y la región geográfica y varía de 0.01 a 0.9 casos por 100000 habitantes en Norteamérica y Europa a 10-1000 casos por cada 100000 habitantes en el cinturón de meningitis (118).

A nivel mundial, el serogrupo B fue el serogrupo predominante productor de EMI en la mayoría de los países. Además, hubo un aumento notable en el número de casos de EMI causados por los serogrupos W e Y de 2010 a 2019 en varias regiones, lo que pone

de relieve la naturaleza impredecible y dinámica de la enfermedad. En general, los serogrupos A, B, C, W e Y fueron responsables de la gran mayoría de los casos de EMI, a pesar de la disponibilidad de vacunas para prevenir la enfermedad debida a estos serogrupos.

En Europa, la incidencia de EMI ha ido disminuyendo desde principios de la década de 2000. En 2017 la incidencia de EMI en Europa osciló entre 0,45 (norte y sur de Europa) y 1,33 (Reino Unido e Irlanda) casos por 100.000 habitantes. La tasa de letalidad fue del 9,7%. La incidencia de EMI fue mayor en los lactantes <1 año (8,2/100.000). De los casos notificados al ECDC, el 51% fueron MenB, seguido de MenW (17%) y MenC (16%). Sin embargo, MenY y MenW fueron los serogrupos principales en la región norte de la UE en comparación con MenB, seguido de MenC en la región central y sur de la UE; y MenB y MenW en el Reino Unido e Irlanda. En 2014-2015, MenW fue el responsable del 24% de todos los casos de EMI en Inglaterra y se asoció a enfermedad grave y mortalidad en todos los grupos de edad lo que dio lugar a la introducción de la vacunación con la vacuna conjugada cuadrivalente ACWY en los programas de vacunación. En Países Bajos la tasa de incidencia anual de la enfermedad meningocócica invasiva por el serogrupo W aumentó de < 0,05/100.000 antes de 2015 a 0,5/100.000 en 2017. A partir de mayo de 2018, la vacuna MenACWY reemplazó a la vacuna MenC a los 14 meses y, a partir de octubre de 2018, se ofrece la vacuna MenACWY a los niños de 13 a 14 años (114, 118, 125).

Clásicamente la mayor incidencia de enfermedad meningocócica se daba en el África subsahariana, conocida como el “cinturón de meningitis”, donde durante las epidemias la enfermedad puede afectar hasta el 1% de la población. El serogrupo más común en esta área antes de la introducción de la vacuna conjugada específica era el serogrupo A. La vacunación frente al serogrupo A ha supuesto la práctica desaparición de este serogrupo en esta región. Como consecuencia la epidemiología de la EMI ha cambiado y la mayoría de la enfermedad meningocócica está causada por los serogrupos MenC, MenW y MenX (114, 126).

En España el principal serogrupo productor de EMI es el B, En la temporada 2019-2020 la tasa de incidencia fue de 0.61 casos por 100000 habitantes con una

letalidad del 11,1% (mayor en los menores de 1 año). El serogrupo B fue el serogrupo mas frecuentemente aislado excepto en el grupo de 10-14 años en el que el más frecuente fue el serogrupo Y. El serogrupo B fue el responsable del 35% de todos los casos de enfermedad meningocócica invasora (el 81.2% en los menores de 1 año y el 71.4% en el grupo de 1-4 años). La disminución de la incidencia de algunos serogrupos se ha debido a la presión vacunal y a la tendencia secular (serogrupos B y C). La introducción de la vacunación antimeningocócica tetravalente (A,C,W,Y) en adolescentes en 2019 y en los lactantes a los 12 meses en las comunidades de Castilla y León y Andalucía y la vacunación antimeningocócica B en Castilla y León y Canarias ha favorecido ese descenso.

Respecto a la prevención, la incidencia de la enfermedad en los contactos domésticos es de 500 a 1000 veces mayor que en la población general. El 30% de los casos secundarios ocurren en la primera semana, el 20% en la segunda semana y el 30% en las semanas 3 a 8 después del caso índice. Los miembros del hogar, los contactos de guardería, colegio o Universidad, las personas expuestas a las secreciones orales de un paciente (incluido personal sanitario) deben recibir quimioprofilaxis. Para la quimioprofilaxis se utilizan Ceftriaxona intramuscular, Rifampicina oral o Quinolonas.

A pesar del tratamiento antibiótico, la mortalidad sigue siendo alta (10-20%) y la morbilidad a largo plazo importante. Además de la profilaxis antibiótica para prevención secundaria en contactos cercanos, la vacunación es útil para controlar los brotes de enfermedad meningocócica. Las vacunas de polisacáridos A, C, Y, W introducidas por primera vez en el decenio de 1970, tuvieron limitaciones importantes, entre ellas una corta duración de la protección, una débil respuesta inmunitaria en los lactantes (un grupo de alto riesgo para el patógeno) y la incapacidad para inducir la memoria inmunológica.

Las vacunas meningocócicas conjugadas de polisacárido capsular-proteína para A, C, W, Y brindan protección colectiva mediante la interferencia con la transmisión de *N. meningitidis*. Además, se han logrado avances en el desarrollo de vacunas contra el meningococo del serogrupo B mediante estrategias de

“vacunología inversa” (118).

Actualmente existen vacunas eficaces disponibles para los serogrupos A, C, W e Y y para el serogrupo B (MnB) (114, 118, 127).

Con la evolución de las vacunas meningocócicas y los cambios en la epidemiología de la EMI, se han utilizado diferentes estrategias de vacunación. En los últimos años, la rápida expansión clonal del serogrupo meningocócico W (MenW) ha producido un cambio en las recomendaciones de vacunación nacionales y regionales de vacunas meningocócicas monovalentes del serogrupo C a vacunas meningocócicas tetravalentes que incluyen los serogrupos A, C, W, Y (MenACWY) en varios países (111, 118, 122, 125, 127).

En relación con el serogrupo B no se han desarrollado vacunas de polisacáridos conjugados con proteínas por la similitud antigénica de los polisacáridos de meningococo B con las células neuronales fetales humanas y la posibilidad de inducir anticuerpos autoinmunes. Se han desarrollado varias vacunas frente a MenB basadas en proteínas. Las primeras utilizaron las vesículas de membrana externa (OMV). Posteriormente se autorizó una vacuna multicomponente basada en proteínas (Bexsero®; GSK Biologicals) en 2013 en Reino Unido y en Estados Unidos en 2015. Esta vacuna esta constituida por tres antígenos proteicos subcapsulares recombinantes que incluyen NadA (Neisserial adhesion A), NHBA (Neisseria heparin binding antigen) y fHbp (factor H binding protein) junto a vesículas de la membrana externa del meningococo B responsable del brote epidémico en Nueva Zelanda que contenían la Porina A. La vacuna 4CMenB protege frente a la mayoría de las cepas de MenB causantes de la enfermedad invasora con una cobertura de cepas del 66-91% en diferentes partes del mundo. No está demostrado que proporcione protección indirecta (efecto rebaño) o reduzca el estado de portador nasofaríngeo en adolescentes. Otra vacuna frente a MenB, rLP2086 (Trumenba®, Pfizer), fue autorizada en Estados Unidos en 2014 y en la Unión Europea en 2017. Esta vacuna está compuesta por dos variantes de fHbp (subfamilias A and B) en una formulación lipídica, que están presentes en casi todas las cepas de MenB invasoras. Está autorizada para sólo para niños mayores de 10 años (118, 127).

Actualmente hay autorizadas vacunas de polisacáridos solos y de polisacáridos conjugados con proteínas están disponibles frente a los serogrupos A, C, W e Y (114).

La vacuna cuadrivalente (MenACWY-PS) es una vacuna de polisacáridos pura. Produce inmunidad protectora en sujetos mayores de 2 años pero la persistencia de los anticuerpos solo dura 3-5 años, no induce células B de memoria ni inmunidad de rebaño.

Hay dos vacunas cuadrivalentes de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W, e Y conjugados con proteínas autorizadas en Europa: MenACWY-TT, Nimenrix® y Men ACWY- CRM, Menveo ® (114,118). Estas vacunas son eficaces en el niño menor de dos años y producen protección de rebaño mediante inducción de células B de memoria y la evitación de la colonización de la nasofaringe por la bacteria (127).

MenACWY-TT es una vacuna conjugada meningocócica tetravalente de administración intramuscular que utiliza el toxoide tetánico (TT) como proteína transportadora (114, 128).

Fue desarrollada por GSK pero ahora es comercializada por Pfizer. Contiene 5 µg de polisacáridos capsulares purificados de cada serogrupo A, C, W, e Y unidos a 44 µg de TT como proteína transportadora. Es la primera vacuna conjugada cuadrivalente aprobada para uso como dosis única en niños de 12 meses o mayores en países europeos. Está aprobada para uso en algunos países en esquema de tres dosis comenzando desde las 6 semanas (129). La inmunogenicidad y seguridad de la vacuna Men-ACWY-TT son similares a las de otras vacunas de polisacáridos MenACWY-PS previamente autorizadas y la coadministración con otras vacunas infantiles no produce efectos secundarios adicionales (127).

En sujetos que reciben vacunación primaria con MenACWY-TT en época de lactante, la respuesta de anticuerpos a la dosis booster con MenACWY-TT dura al menos hasta los 6 años (114, 129, 130) lo que sugiere que la memoria immune se adquiere al menos hasta la adolescencia precoz, que es el grupo con mayor riesgo de EMI. La vacuna, en los ensayos clínicos, fue segura y bien tolerada en lactantes,

inmunogénica tras la serie primaria y tras el booster, demostrando una inmunogenicidad persistente. La persistencia de anticuerpos es mayor en niños mayores y adolescentes (114).

La protección a largo plazo contra la enfermedad meningocócica depende de la persistencia de los anticuerpos después de la vacunación. La persistencia de anticuerpos hasta 5 años después de la vacunación en adolescentes de 11 a 17 años con una dosis única de la vacuna meningocócica de los serogrupos A, C, W, Y con toxoide tetánico conjugado (MenACWY-TT, Pfizer) o la vacuna de polisacárido MenACWY (MenPS, GSK Vaccines) mostró que cinco años después de una dosis única de MenACWY-TT, el porcentaje de participantes con títulos de rSBA $\geq 1:8$ fue del 97,5 % para el serogrupo A, del 88,6 % para el serogrupo C, del 86,0 % para el serogrupo W y del 96,6 % para el serogrupo Y. Los porcentajes en el grupo MenPS fueron 93,0%, 87,1%, 34,9% y 66,3%, respectivamente. Se observó un mayor porcentaje de sujetos con títulos de rSBA $\geq 1:8$ para los serogrupos W e Y, y títulos de anticuerpos medios geométricos de rSBA más altos para los serogrupos A, W e Y en el grupo MenACWY-TT que en el grupo MenPS en cada momento (años 3, 4 y 5) (129-131).

Actualmente hay escasa evidencia que respalde un impacto significativo de MenACWY en la portación nasofaríngea de meningococo (132).

En Canada, MenW fue el responsable del 18% de los casos de enfermedad invasiva neumocócica y en 2018 del 44%. Más del 90% de los meningococos serogrupo W pertenecían al complejo clonal 11 (cc11) (133).

MenACWY-CRM197 es una vacuna conjugada meningocócica cuadrivalente que utiliza como proteína transportadora una variante mutante de la toxina diftérica (cross-reactive material 197 o CRM197) (134). Fue desarrollada por Novartis y ahora está comercializada por GSK. La vacuna meningocócica conjugada MenACWY-CRM197 fue aprobada en primer lugar para uso en los Estados Unidos en 2010 (135).

Ahora está aprobada en más de 64 países en el mundo. Inicialmente aprobada para uso en sujetos de 11 a 55 años de edad, en 2011 la aprobación se extendió a individuos de 2 a 55 años. En 2013 el Advisory Committee on Immunization Practices

(ACIP) recomendó el uso en el grupo de edad de 2 meses a 23 meses para protección frente a EMI. MenACWY-CRM197 proporciona una inmunogenicidad duradera y presenta datos de seguridad aceptables en todos los grupos de edad. MenACWY-TT es inmunogénico en todas las edades. MenACWY- CRM197 es inmunogénico para bebés y adultos, pero faltan datos para niños de 1 a 2 años. MenACWY-TT y MenACWY-CRM197 son bien tolerados e inducen una persistencia e inmunogenicidad de anticuerpos similares contra los cuatro serogrupos en individuos de más de un año (118, 127, 129, 130, 135, 136).

MenACWY-DT es una vacuna conjugada meningocócica cuadrivalente conjugada que utiliza la toxina diftérica (DT) como proteína transportadora que no ha sido aún aprobada en Europa.

Las vacunas frente a MenB y MenACWY están incluidas en los calendarios vacunales de varios países, en diferentes edades y poblaciones dependiendo de la epidemiología local.

Actualmente en España se encuentran disponibles siete vacunas antimeningocócicas inactivadas (Tabla I). Dos de ellas son preparados de proteínas subcapsulares (serogrupo B). En las conjugadas, el oligo o polisacárido capsular de los diferentes serogrupos se une a una proteína transportadora que puede ser el toxoide tetánico o un mutante del toxoide diftérico (CRM197). Entre las polisacarídicas conjugadas, hay tres que son monovalentes frente al serogrupo C (MenC): Menjugate®, Meningitec® y NeisVac-C® y dos tetravalentes frente a los serogrupos A, C, W e Y (MenACWY): Menveo® y Nimenrix®. Tanto Meningitec® como Menjugate® están actualmente en desuso en nuestro país, en favor de NeisVac-C®, única vacuna frente al MenC que permite la administración de una sola dosis durante el primer año de vida por su elevada inmunogenicidad, duración de anticuerpos y eliminación del estado de portador.

Las primeras vacunas meningocócicas conjugadas autorizadas se utilizaron en el Reino Unido en 1999. Desde entonces, el espectro de vacunas conjugadas meningocócicas disponibles se ha expandido para incluir vacunas con hasta cuatro serogrupos. La aprobación de las vacunas conjugadas antimeningocócicas se basa en

la obtención de niveles adecuados de anticuerpos con actividad bactericida sérica (SBA) después de la vacunación. La Organización Mundial de la salud sugiere que títulos de hSBA $\geq 1/4$ y rSBA $\geq 1/8$ se correlacionan con protección contra la enfermedad por serogrupos A, C, W, e Y. Las vacunas antimeningocócicas conjugadas tetravalentes (Men ACWY) aprobadas se han evaluado en adolescentes demostrando una tolerabilidad y una inmunogenicidad que en la mayoría de los casos alcanza los niveles de anticuerpos con actividad bactericida sérica (SBA) aceptados. La vacunación en adolescentes induce una respuesta inmune duradera, con datos de persistencia hasta 5-10 años después de la vacunación (129, 130, 135).

La capacidad de las vacunas conjugadas meningocócicas para impactar sobre el estado de portador se ha demostrado con las vacunas frente a meningococo C y A. La evidencia de la eficacia de las vacunas antimeningocócicas conjugadas tetravalentes sobre el estado de portador es más limitada aunque estudios en estudiantes o personal militar han mostrado reducciones del 87.5% de portación nasofaríngea después de la vacunación con Men ACWY-TT.

Nimenrix® y Menveo® inducen un nivel de anticuerpos y persistencia en el tiempo ligeramente mejores que Menactra® en individuos mayores de dos años de edad (129, 130, 135). La protección de las vacunas MenACWY puede disminuir con el tiempo. Se pueden administrar conjuntamente con otras vacunas de rutina en el Programa Nacional de Inmunización con una excepción: Menactra® no se debe administrar conjuntamente con la vacuna antineumocócica Prevenar 13, ya que esto puede reducir la respuesta inmune a algunos serotipos neumocócicos (129, 135).

Menveo® tiene estudiada la compatibilidad con las vacunas del calendario sistemático (aunque no en menores de 10 años de edad), incluidas VPH4 y Tdpa y con las vacunas de viajes internacionales, fiebre amarilla, fiebre tifoidea inactivada, hepatitis A, encefalitis japonesa y rabia (135).

Nimenrix es compatible con las vacunas del calendario sistemático y VPH2 (129).

Siempre que sea posible, Nimenrix y una vacuna que contenga TT, como la vacuna DTPa-VHB- VPI/Hib, deben administrarse simultáneamente o Nimenrix debe

administrarse, al menos, un mes antes de la vacuna que contenga TT.

TABLA I. Vacunas antimeningocócicas

Nombre	Serogrupo conjugada (mcg)				Serogrupo B proteína (mcg)					Proteína carrier (mg)			Excipiente (mg)	
	A	C	W	Y	NHBA	NadA	fHbp B	OMV	fHbp A	TT	TD	CRM197	PO4A	AlOH3
Menjugate®	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.5-15	-	0.3-0.4
Meningitec®	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	0.125	-
Neisvac-C	-	10	-	-	-	-	-	-	-	10-20	-	-	-	0.5
Menveo®	10	5	5	5	-	-	-	-	-	-	-	3.3-33.3	-	-
Nimenrix®	5	5	5	5	-	-	-	-	-	44	-	-	-	-
Menactra®	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	48	-	-	-
Bexsero®	-	-	-	-	50	50	50	35	-	-	-	-	0.25	-
Trumemba®	-	-	-	-	-	-	60	-	60	-	-	-	0.25	-

Las vacunas MenACWY tienen un excelente perfil de seguridad. Se han comunicado de forma muy frecuente reacciones como: irritabilidad, cefalea, malestar general y dolor, eritema e induración en el lugar de la inyección (129, 135). De forma frecuente, se asocia la aparición de escalofríos, mialgias, artralgias o fiebre a la administración de la vacuna (especialmente en edades superiores a 10 años). Como efecto adverso grave a reseñar, inicialmente se detectó un riesgo de sufrir síndrome de Guillain-Barré en una de cada millón de dosis administradas de Menactra (extremadamente infrecuente). Estudios posteriores no han conseguido defender esta asociación, dada su rareza.

Actualmente se encuentran disponibles dos vacunas recombinantes multicomponentes basadas en proteínas contra la enfermedad por el serogrupo B (Tabla I).

Bexsero® (MenB-MC) (137) se puede usar a partir de las seis semanas de edad.

Los estudios de inmunogenicidad han mostrado que el 92% de los niños y adolescentes lograron la seroconversión 30 días después del ciclo de vacunación primaria. Sin embargo, la inmunogenicidad a largo plazo contra algunas cepas fue subóptima (un régimen primario de dos dosis tuvo una efectividad del 82.9% contra todas las cepas de meningococo B en lactantes menores de 10 meses después de la vacunación).

Trumenba® (138) está registrado para su uso a partir de los 10 años de edad. La evaluación de su efectividad clínica aún no está disponible. Bexsero y Trumenba no son intercambiables y se debe usar la misma marca para completar el ciclo de vacunación. Bexsero contiene cuatro antígenos principales que se conservan en múltiples especies de *Neisseria*, y puede proporcionar cierta protección contra otros grupos capsulares. Sin embargo, no se conoce el alcance y la importancia clínica de la protección cruzada.

Las vacunas MenB pueden administrarse conjuntamente con las vacunas MenACWY, así como con otras vacunas de rutina. La fiebre es un evento adverso muy común después de la administración de Bexsero en niños pequeños y es más probable si Bexsero se administra conjuntamente con otras vacunas. Este riesgo puede reducirse separando la administración de Bexsero de otras vacunas (por ejemplo, al menos tres días). El paracetamol profiláctico se recomienda para todos los niños menores de dos años que reciben Bexsero.

El Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social recomienda, la aplicación sistemática de 2 dosis de vacuna MenC-TT (conjugada con toxoide tetánico), con la siguiente pauta: 1 dosis en el primer año de vida (4 meses de edad), 1 dosis de refuerzo a los 12 meses de edad y 1 última dosis a los 12 años con vacuna antimenigocócica tetravalente (MenACWY). También se aconseja un rescate progresivo hasta los 19 años. Esta recomendación se basa en los cambios epidemiológicos observados respecto a la mayor incidencia de la infección meningocócica por los serogrupos W e Y. Otras recomendaciones incluyen: 1) Niños mayores de 6 semanas de vida con factores de riesgo de enfermedad meningocócica invasora (EMI): asplenia anatómica o funcional, déficit de factores del complemento, tratamiento con eculizumab, episodio previo de EMI por cualquier serogrupo y

contactos de un caso índice de EMI por serogrupo A, W o Y en el contexto de un brote epidémico; 2) Viajes o estancias en países de elevada incidencia o en los que la vacuna esté incluida en calendario, como USA, Canadá, Reino Unido, Austria, Grecia, Holanda, Italia o Suiza (139).

En España, Castilla y León introdujo la vacuna MenACWY a los 12 meses y a los 12 años de edad en el Programa de Inmunización Infantil financiado a partir del 1 de enero de 2019, Melilla la había incorporado para los adolescentes en 2016 y lleva 2 cohortes vacunadas con esta vacuna.

En la siguiente publicación se muestran los resultados de eficacia y seguridad de una vacuna antimeningocócica tetravalente frente a los serogrupos A, C, W e Y conjugada con toxoide tetánico como proteína transportadora coadministrada con las vacunas de rutina en lactantes pequeños. Se realizó un estudio de fase III, abierto, aleatorizado y controlado (NCT01144663), en el que se incluyeron 2095 niños (de 6 a 12 semanas de edad) que fueron asignados al azar (1:1:1:1) en 4 grupos para recibir MenACWY-TT a los 2, 3, 4 y 12 meses de edad, o MenACWY-TT, MenC-CRM197 (Menjugate®) o MenC-TT (NeisvaC-C®) a los 2, 4 y 12 meses de edad. Todos los participantes recibieron PHiD-CV y DTPa-HBV-IPV/Hib a los 2, 3, 4 y 12 meses de edad. Las respuestas inmunes se midieron mediante ensayos de actividad bactericida sérica utilizando complemento de conejo (rSBA) y humano (hSBA). Se recogieron síntomas solicitados y no solicitados durante los 8 y 31 días posteriores a la vacunación, respectivamente, y eventos adversos graves a lo largo del estudio.

Los resultados demostraron la no inferioridad de las respuestas inmunes a MenC inducidas por 2 o 3 dosis de MenACWY-TT versus 2 dosis de MenC-TT o MenC-CRM197. Se cumplieron los criterios de inmunogenicidad de MenACWY-TT para MenA, MenW y MenY. Un mes después de la vacunación primaria con MenACWY-TT, $\geq 93,1\%$ y $\geq 88,5\%$ de los lactantes tuvieron títulos $\geq 1:8$ de rSBA y hSBA para todos los serogrupos. El fuerte aumento de los títulos de rSBA y hSBA observado para todos los serogrupos de la vacuna después de la vacunación de refuerzo sugirió que MenACWY-TT induce memoria inmune. La coadministración de MenACWY-TT con las vacunas de rutina mostró un perfil de seguridad clínicamente aceptable.

Como conclusión, este estudio apoya la coadministración de MenACWY-TT con vacunas infantiles de rutina como 2 o 3 dosis primarias durante la infancia seguidas de una dosis de refuerzo en el segundo año de vida. La administración de la vacuna antimenigocócica tetravalente conjugada con toxoide tetánico es inmunógena (respuesta de anticuerpos no inferior frente a las vacunas conjugadas monovalentes antimeningocócica C) cuando se administra en esquema 2+1 ó 3+1 con un adecuado perfil de reactogenicidad. No se observaron fenómenos de interfeerencia con las vacunas coadministradas. La vacuna antimeningocócica tetravalente conjugada con toxoide tetánico puede proporcionar mayor cobertura para algunos serotipos cuya incidencia viene aumentando en países de nuestro entorno. Esta vacuna ha sido incluida en el calendario vacunal recomendado por el Consejo Interterritorial y nuestra Comunidad Autónoma.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La inmunización es la intervención sanitaria más costo-efectiva para prevenir enfermedades, discapacidades y fallecimientos por enfermedades prevenibles tales como el cáncer cervical, la difteria, la hepatitis B, el sarampión, la parotiditis, la tosferina, la neumonía, la poliomielitis, las enfermedades diarreicas por rotavirus, la rubeola y el tétanos.

A excepción de la potabilización del agua, ninguna otra medida, ni siquiera los antibióticos, ha contribuido a disminuir la morbilidad y la mortalidad en la especie humana como las vacunaciones

El Programa Avanzado de Inmunización (PAI) comenzó en 1974 y se creó para vacunar a todos los niños de 6 enfermedades: el tétanos, la tuberculosis, la poliomielitis, el sarampión, la tos ferina y la difteria. En aquel momento, menos de un 5% de la población tenía acceso a las vacunas, pero tras 50 años de esfuerzo, se estima que el 84% de la población infantil tiene una pauta de vacunación completa. Además, el programa de vacunación ha ido creciendo, y actualmente aconseja vacunar contra 14 de las enfermedades más prevalentes en la infancia, aunque esta recomendación se puede ampliar a 17 en función del contexto.

Este gran hito de la medicina ha permitido erradicar completamente la viruela y que algunas enfermedades antiguamente comunes, como la poliomielitis, estén a punto de desaparecer. En 2024 cualquier niño menor de 10 años tiene un 40% más de posibilidades de celebrar su siguiente cumpleaños en comparación con un hipotético 2024 en el que no se hubiesen realizado campañas de vacunación.

En la actualidad, con porcentajes de vacunación elevados el sarampión sigue cobrándose más de 100 000 vidas al año en todo el mundo, y los expertos estiman que su transmisión únicamente se cortaría en caso de alcanzar una inmunización colectiva superior al 95%. Aún así, los cálculos indican la vacuna contra el sarampión ha salvado la vida de 94 millones de personas en los últimos 50 años. Por esto, la vacunación sigue considerándose la forma más eficaz de prevenir las enfermedades. Se estima que la

administración de vacunas ha evitado 20 millones de casos de poliomielitis grave.

Un dato alarmante es que a raíz de la pandemia del COVID-19, el número de vacunaciones infantiles disminuyó. En 2019, 18,4 millones de niños no acudieron a su cita correspondiente al calendario de vacunación, una cifra ya de por sí elevada, pero que aumentó hasta los 24,4 millones en 2021. De estas cifras, la más preocupante es la del sarampión, que disminuyó notablemente. Por este motivo, el número de epidemias de esta enfermedad aumentaron hasta un total de 37 en 2022, un 40% más que los años anteriores. Como consecuencia, enfermaron a un total de 9 millones de niños y fallecieron 136 000.

Afortunadamente, parece que la nueva tendencia contra las vacunas se está revirtiendo, y en 2022 únicamente fallaron 20,5 millones de niños a su calendario de vacunación, unas cifras que, sin embargo, siguen siendo superiores a las anteriores de la pandemia.

En la actualidad, más niños que nunca llegan a los 5 años de edad. Este mérito es atribuible a todos los gobiernos, personal de investigación, trabajadores de la salud, personas voluntarias y progenitores que están concienciados sobre la protección que ofrecen las vacunas ante enfermedades potencialmente mortales.

El conocimiento de la estructura de los patógenos y de la respuesta inmune ha permitido mejorar el diseño de las nuevas vacunas así como de implementar nuevas estrategias de vacunación. Algunas de ellas son la mejora en el proceso productivo, el diseño de vacunas combinadas, de vacunas conjugadas y la mejora de la protección al recién nacido.

A nivel mundial, la mortalidad infantil ocurre desproporcionadamente en el período perinatal, con más del 15% de todas las muertes neonatales debido a una etiología infecciosa. Las infecciones maternas son un factor impulsor del parto prematuro, que también contribuye a la mortalidad neonatal. Durante el período crítico antes de que los bebés hayan iniciado su serie primaria de inmunización, la vacunación materna sirve como una herramienta segura y eficaz para reducir la morbilidad y

mortalidad perinatal por enfermedades infecciosas, incluyendo tétanos, tos ferina, influenza, COVID-19 y el virus respiratorio sincitial (VSR). Además, la vacunación materna también tiene el potencial de combatir las complicaciones del embarazo, ya que la gripe en el embarazo se asocia con la pérdida del embarazo y el bajo peso al nacer y la enfermedad por COVID-19 en el embarazo puede provocar muerte fetal y parto prematuro.

La vacunación materna provoca la producción de anticuerpos maternos específicos de antígeno, que se transfieren a través de la placenta al feto y reducen el riesgo de enfermedad y complicaciones asociadas durante la infancia. La inmunización pasiva a través de la transferencia de anticuerpos maternos proporciona al lactante un repertorio variado de anticuerpos específicos de antígeno en el período crítico posterior al nacimiento, con una vida media que se extiende de 28 a 35 días.

Se ha demostrado que los anticuerpos inducidos por la vacuna materna interfieren con la respuesta de anticuerpos posterior en el lactante a las inmunizaciones infantiles. Este “efecto atenuador” de la inmunogenicidad en los lactantes tras la vacunación se ha demostrado tanto para los patógenos dirigidos a la vacuna materna (tos ferina y difteria) como para los no dirigidos (neumococo y polio). Sin embargo, hasta la fecha no se han demostrado efectos clínicamente significativos de la interferencia de los anticuerpos maternos en las respuestas inmunitarias humorales y celulares a las inmunizaciones infantiles .

Las vacunas administradas durante el embarazo y el posparto también proporcionan una transferencia pasiva de anticuerpos a la mucosa respiratoria y gastrointestinal del bebé a través de la leche materna, donde la IgA predomina sobre la IgG y la IgM.

Nosotros realizamos dos estudios acerca de los efectos de la vacunación materna con Tdap sobre la respuesta inmune de los lactantes tras la vacunación primaria y booster observando una respuesta inmunitaria reducida a la vacunación primaria que se mantuvo tras la vacunación de refuerzo.

Las áreas para futuras investigaciones incluyen estudios para obtener una comprensión más profunda de la interfaz materno-fetal y su papel en el desarrollo de la inmunidad infantil, lo que puede ayudar a guiar el desarrollo de estrategias de vacunación más efectivas y la investigación de nuevos métodos de administración y programas de inmunización para la administración de vacunas maternas en una variedad de entornos puede contribuir a mejorar su seguridad y eficacia

Las vacunas combinadas que contienen antígenos que pertenecen a dos o más microorganismos se conocen hace ya 70 años, desde que en 1948 se autorizó la vacuna DTP. Entre 1993 y 2017 se han autorizado en España 65 vacunas, de las cuales 21 (32,3%) son combinadas.

La principal ventaja de las vacunas combinadas es que previenen un mayor número de enfermedades con un único preparado. Como consecuencia, se favorece el cumplimiento del calendario de inmunizaciones y aumentan las coberturas vacunales. Estas vacunas tienen mayor aceptación tanto por parte del personal sanitario como de la población en general, y al disminuir el número de inyecciones proporcionan un mayor confort al individuo. Además, su uso simplifica el manejo, el transporte y el almacenamiento en los centros de vacunación, permite reducir el número de visitas y favorece la armonización de los calendarios y la introducción de nuevas vacunas.

Los posibles inconvenientes de las vacunas combinadas son la interferencia antigénica entre algunos de sus componentes, que origina una disminución de la respuesta serológica, La valoración de la reactogenicidad es compleja, ya que las reacciones adversas son más difíciles de atribuir a cada uno de sus componentes, la variabilidad del contenido de los lotes es más grande debido a su múltiple composición, y el coste directo de la vacuna combinada es superior al de las vacunas que contiene, aunque el coste indirecto disminuye al requerirse un menor número de visitas y de personal, y menos gasto de material y almacenamiento.

Por estas razones, son necesarios ensayos clínicos que comparen la inmunogenicidad, la reactogenicidad y la seguridad de las vacunas combinadas antes de su comercialización definitiva, y además, debe realizarse un seguimiento

poscomercialización tras su aplicación a un número elevado de individuos, para detectar posibles reacciones adversas no observadas en los ensayos clínicos.

Nuestro trabajo demostró que la administración de dos vacunas combinadas no produjo interferencia entre ambas con un perfil de reactogenicidad e inmunogenicidad adecuados.

Bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* son patógenos importantes que causan enfermedades invasivas y no invasivas con una carga aún alta en términos de morbilidad y mortalidad en todo el mundo

La piedra angular para la prevención de estas patologías es la vacunación. En las últimas décadas, se han logrado avances significativos en el conocimiento sobre los mecanismos de patogenicidad de estos patógenos, a nivel molecular, y las características de la respuesta inmune a la infección natural y las vacunas en humanos

Los polisacáridos son factores de virulencia importantes, especialmente para las bacterias encapsuladas que tienen una estructura compleja de carbohidratos en su superficie. Los polisacáridos de superficie tienen varias funciones: protegen a los microorganismos de la desecación cuando se exponen al ambiente externo y evitan la activación de las vías alternativas del complemento.

Las vacunas de primera generación se basaban en polisacáridos capsulares bacterianos; Sin embargo, estos antígenos polisacáridos se consideran antígenos T-independientes, activan directamente las células B específicas de polisacáridos que se diferencian en células plasmáticas para producir anticuerpos, pero no forman células B de memoria.

El desarrollo de la tecnología de conjugación proteína-polisacárido en la década de 1980 permitió la disponibilidad de nuevas vacunas contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) y diferentes serogrupos de *Neisseria meningitidis* que han demostrado una muy buena seguridad y tolerabilidad, junto con la capacidad de provocar una fuerte inmunogenicidad combinada con la demostración de las respuestas de anticuerpos

anamnésicos.

Las principales ventajas de la tecnología de conjugación utilizada en las vacunas bacterianas, debido a la generación de una respuesta inmune dependiente de células T incluyen la mejora en la respuesta inmunogénica también en lactantes y niños pequeños (respuesta de anticuerpos predominantemente del isotipo IgG1); la capacidad de provocar una respuesta de memoria inmunogénica (producción de células B de memoria de larga duración) y un efecto de refuerzo tras un nuevo contacto con el antígeno específico (revacunación); la generación de una respuesta inmunitaria mucosa (IgA secretora e IgG) y la reducción de la portación mucosa (un prerrequisito de la protección colectiva).

La implementación de vacunas seguras y efectivas contra el meningococo tipo C (MenC) siguió a los programas de vacunación contra Hib, con la posterior vacuna antineumocócica conjugada heptavalente (PCV7) desde mediados de la década de 2000, y otras formulaciones que ampliaron la cobertura de antígenos (es decir, Men AC, Men ACW135Y, PCV10 y PCV13. Estas vacunas han demostrado ser eficaces para combatir no sólo enfermedades invasivas, como la sepsis y la meningitis, sino también otras enfermedades no invasivas importantes, como la neumonía adquirida en la comunidad y la otitis media aguda, tanto en niños como en adultos, con nuevas e interesantes perspectivas para optimizar las estrategias de prevención actuales en el futuro.

La protección colectiva observada entre las poblaciones no inmunizadas que viven en países donde inicialmente se implementaron programas de vacunación de rutina se debió al efecto indirecto de la vacunación sobre la portación nasofaríngea de la bacteria en portadores sanos.

Realizamos dos estudios con vacuna conjugada antineumocócica 12-valente y antimeningocócica tetravalente conjugada demostrando un perfil de inmunogenicidad y reactogenicidad adecuados. No observamos interferencia entre los diferentes antígenos.

Las vacunas han formado parte de la lucha humana contra las enfermedades durante más de 200 años. La campaña mundial de vacunación erradicó la viruela y la

inmunización ha eliminado la polio en todos los países, salvo en unos pocos. La vacunación infantil ha reducido sustancialmente la morbilidad y la mortalidad de las enfermedades infecciosas en gran parte del mundo desarrollado, y la vacunación anual contra la gripe es una práctica comúnmente aceptada en todo el mundo para reducir el impacto de la infección por gripe estacional.

Si bien podemos atribuir muchos éxitos de salud pública a la vacunación, el futuro presenta desafíos continuos. Siguen existiendo enfermedades para las que los investigadores no han podido encontrar vacunas efectivas (como el VIH/SIDA, la malaria y la leishmaniasis) o que proliferan en áreas del mundo donde las infraestructuras para la vacunación son deficientes o inexistentes, e incluso las vacunas disponibles actualmente no pueden distribuirse. En otros casos, el costo de las vacunas es demasiado alto para que los países más pobres puedan permitírselo, aunque a menudo es allí donde más se necesitan. Y, por supuesto, aunque muchas vacunas actuales son muy efectivas, continúan los esfuerzos para desarrollar vacunas que sean más efectivas que las disponibles hoy. Una mayor eficacia, un menor coste y una distribución cómoda son algunos de los principales objetivos. Se están empleando nuevas técnicas para crear diferentes tipos de vacunas. Algunos de estos nuevos tipos incluyen: vacunas recombinantes vivas, vacunas de ADN y vacunas de ARNm.

Se están investigando nuevas técnicas de administración además de la inyección. Las vacunas inhaladas ya se utilizan en algunos casos (vacuna antigripal). Otras posibilidades incluyen la aplicación mediante parche. Este método de administración podría ser particularmente útil en áreas remotas, ya que su aplicación no requeriría un personal médico capacitado, que generalmente se necesita para las vacunas administradas como inyección mediante jeringa.

Otro problema que los investigadores están tratando de abordar es el llamado problema de la cadena de frío. Muchas vacunas requieren temperaturas de almacenamiento bajas para seguir siendo viables. Lamentablemente, el almacenamiento a temperatura controlada a menudo no está disponible en partes del mundo donde la vacunación es vital para el control de enfermedades. Es necesario disponer de materiales para vacunas que puedan transportarse fácilmente en diversas condiciones y que sigan

siendo viables.

El futuro de la inmunización depende del éxito de la investigación médica para encontrar vacunas que sean más sencillas de administrar, que sobrevivan al transporte incluso sin refrigeración y que proporcionen una respuesta inmunitaria más sustancial y duradera.

CONCLUSIONES

1. Un estudio realizado en adultos, niños y lactantes, con la vacuna antigripal (IIV4-I) elaborada mediante un proceso de fabricación novedoso era inmunógena con un perfil de reactogenicidad y seguridad similar al de la IIV4 autorizada. Estos resultados apoyan que el proceso de investigación utilizado para fabricar la IIV4-I es adecuado para sustituir al actual proceso autorizado.
2. Los anticuerpos antitosferínicos transferidos durante el embarazo pueden disminuir el riesgo de infección por tos ferina en los primeros meses de vida, pero interfieren con la capacidad del lactante para producir anticuerpos antitosferínicos, cuya importancia clínica sigue siendo desconocida. Los resultados de seguridad y reactogenicidad fueron coherentes con la experiencia previa.
3. Como consecuencia de la interferencia de los anticuerpos antitosferínicos maternos con las respuestas inmunitarias de los lactantes a la vacunación primaria contra la tos ferina, las concentraciones de anticuerpos antitosferínicos seguían siendo más bajas en los niños de madres vacunadas con Tdap antes de la vacunación de refuerzo DTaP-HepB-IPV/Hib. Tras el refuerzo, las concentraciones de anticuerpos fueron inferiores para la hemaglutinina filamentosa y el toxoide de la tos ferina, pero no para la pertactina.
4. Las vacunaciones primaria y de refuerzo de lactantes/niños pequeños con DTPa-HBV-IPV/Hib y PHiD-CV coadministradas con MenACWY-TT fueron inmunogénicas con perfiles de reactogenicidad clínicamente aceptables. Estos resultados apoyan la coadministración de MenACWY-TT con las vacunas de rutina para niños.
5. La adición de los conjugados 19A y 6A CRM197 no alteró la inmunogenicidad de los conjugados PHiD-CV; para ambas vacunas en investigación, las respuestas inmunitarias posteriores al refuerzo frente a 10 serotipos comunes parecieron similares a las provocadas por PHiD-CV. Los perfiles de seguridad y reactogenicidad de las vacunas en investigación fueron comparables a los de PHiD-CV.
6. Un estudio apoya la administración conjunta de MenACWY-TT con las vacunas infantiles habituales en 2 ó 3 dosis primarias durante la infancia seguidas de una dosis de refuerzo en el segundo año de vida.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Stanton BF. [Global Infections and Child Health](#). *PediatrClin North Am*. 2017 Aug;64(4):xv-xvi. doi: 10.1016/j.pcl.2017.05.002.*Pediatr Clin North Am*. 2017. PMID: 28734521.
- 2.- <https://www.un.org/en/desa/child-or-youth-died-once-every-44-seconds-2021-un-report> 3.-<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>
- 4.-Denno DM, Paul SL. Child Health and Survival in a Changing World. *Pediatr Clin N Am* 64 (2017) 735–754. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.013>
- 5.-Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*. 2016 Dec 17;388(10063):3027-3035. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8. Epub 2016 Nov 11.*Lancet*. 2016. PMID: 27839855
- 6.-Khan AM, Morris SK, Bhutta ZA. Neonatal and Perinatal Infections. *Pediatr Clin N Am* 64 (2017) 785–798. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.008>
- 7.-Osano BO, Were F, Mathews S. Mortality among 5-17 year old children in Kenya. *Pan Afr Med J* 2017 Jun 15;27:121. doi: 10.11604/pamj.2017.27.121.10727. eCollection 2017.
- 8.-Kotloff KL. [The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries](#). *Pediatr Clin North Am* 2017 Aug;64(4):799-814. doi: 10.1016/j.pcl.2017.03.006. *Pediatr Clin North Am* 2017. PMID: 28734511
- 9.-Bhutta ZA, Guerrant RL, Nelson III CA. Neurodevelopment, Nutrition, and Inflammation: The Evolving Global Child Health Landscape. *Pediatrics* 2017;139:S12. DOI: 10.1542/peds.2016- 2828D
- 10.-Hansen C, Paintsil E. Infectious Diseases of Poverty in Children: A Tale of Two Worlds. *Pediatr Clin North Am* 2016 Feb;63(1):37-66. doi: 10.1016/j.pcl.2015.08.002

- 11.-You D, Hug L, Ejdemyr S, Idele P, Hogan D, Mathers C, Gerland P, New JR, Alkema L. United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME). Global, regional, and national levels and trends in under-5 mortality between 1990 and 2015, with scenario-based projections to 2030: a systematic analysis by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. *Lancet*. 2015 Dec 5;386(10010):2275-86. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00120-8. Epub 2015 Sep 8.
- 12.-He C, Liu L, Chu Y, Perin J, Dai L, Li X, Miao L, Kang L, Li Q, Scherpbier R, Guo S, Rudan I, Song P, Chan KY, Guo Y, Black R, Wang Y, Zhu J. National and subnational all-cause and cause-specific child mortality in China, 1996-2015: a systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals . *Lancet Glob Health* 2017 Feb;5(2):e186-e197. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30334-5. Epub 2016 Dec 20.
- 13.-Byass P. Child mortality is (estimated to be) falling. *Lancet*. 2016 Dec 17;388(10063):2965- 2967. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32169-9. Epub 2016 Nov 11.*Lancet*. 2016. PMID: 27839856
- 14.-López-Cuadrado T, Llácer A, Palmera-Suárez R, Gómez-Barroso D,Savulescu C, González- Yuste P, Fernández-Cuenca R. Trends in Infectious Disease Mortality Rates, Spain, 1980–2011. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 20, No. 5, May 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2005.131528>
- 15.-Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012 Dec 15;380(9859):2095-128. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0.*Lancet*. 2012. PMID: 23245604
- 16.-Hansen V, Oren E, Dennis LK, Brown HE. Infectious Disease Mortality Trends in the United States, 1980-2014. *JAMA* 2016 Nov 22;316(20):2149-2151. doi: 10.1001/jama.2016.12423.
- 17.-Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW.Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *JAMA* 1999 Jan 6;281(1):61-6. doi:

10.1001/jama.281.1.61.

18.-Nataro JP. [Global Infections and Child Health](#). *Pediatr Clin North Am* 2017 Aug;64(4): xvii-xviii. doi: 10.1016/j.pcl.2017.05.001. *Pediatr Clin North Am* 2017. PMID: 28734522.

19.-van Lier A, McDonald SA, Bouwknegt M; EPI group, Kretzschmar ME, Havelaar AH, Mangen MJ, Wallinga J, de Melker HE. Disease Burden of 32 Infectious Diseases in the Netherlands, 2007-2011. *PLoS One* 2016 Apr 20;11(4):e0153106. doi: 10.1371/journal.pone.0153106. eCollection 2016. *PLoS One*. 2016. PMID: 27097024.

20.-Liu L, Hill K, Oza S, Hogan D, Chu Y, Cousens S, Mathers C, Stanton C, Lawn J, Robert BE Levels and Causes of Mortality under Age Five Years. In: *Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 2)*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2016 Apr 5. Chapter 4. Robert E Black, Ramanan Laxminarayan, Marleen Temmerman, Neff Walker , editors. PMID: 27227226 Bookshelf ID: NBK361908 DOI: 10.1596/978-1-4648-0348-2_ch4

21.-Plotkin SA. Vaccines: the Fourth Century. *Clínical and Vaccine Immunology*, Dec. 2009, p. 1709–1719 Vol. 16, No. 12. doi:10.1128/CVI.00290-09

22.-Balogun SA, Yusuff HA, Yusuf KQ, Al-Shengiti AM, Balogun MT, Tettey P. Maternal education and child immunization: the mediating roles of maternal literacy and socioeconomic status. *Pan Afr Med J* 2017 Apr 24;26:217. doi: 10.11604/pamj.2017.26.217.11856. eCollection 2017.

23.-Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Generalidades de las inmunizaciones. Manual de Vacunas en línea de la AEP (Internet). Madrid: AEP; ene/2022. (Consultado el 29/ene/2022). Disponible en <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-71>.

24.-Cassone A, Rappuoli R. Universal vaccines: shifting to one for many. *mBio*. 2010 May 18;1(1):e00042-10. doi: 10.1128/mBio.00042-10.mBio. 2010. PMID: 20689748

25.-Higgins JPT, Soares-Weiser K, López-López JA, Kakourou A, Chaplin K, Christensen H,

Martin NK, Sterne JAC, Reingold AL. Association of BCG, DTP, and measles containing vaccines with childhood mortality: systematic review. BMJ 2016 Oct 13;355:i5170.doi: 10.1136/bmj.i5170.

26.-Minor PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges.Virology 479-480(2015):379–392.<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>.

27.-Omar M, Muhsen K. A narrative review of nonspecific effects of pediatric vaccines on child mortality and morbidity. Hum Vaccin Immunother. 2021 Dec 2;17(12):5269-5283. doi: 10.1080/21645515.2021.1996150. Epub 2021 Nov 30.

28.- <https://www.un.org/es/impacto-academico/uno-de-cada-diez-niños-en-el-mundo-no-recibieron-ninguna-vacuna-durante-2016>.

29.-Plotkin S. History of vaccination. PNAS August 26, 2014: vol. 111 (34): pags 12283–12287. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400472111.

30.-Kabbani S, Mulligan MJ. Vaccines. En: Inmunología clínica: Principios y práctica, 5ª ed; 90, 1211-1226.

31.-Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Calendarios de vacunas en España. Manual de Vacunas en línea de la AEP (Internet). Madrid: AEP; ene/2022. (Consultado el 29/ene/2022). Disponible en <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-7>.

32.-Plotkin S, Robinson JM, Cunningham G, Iqbal R, Larsen S. The complexity and cost of vaccine manufacturing. An overview .Vaccine 2017 Jul 24;35(33):4064-4071. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.06.003. Epub 2017 Jun 21.

33.-Luter N, Kumar R, Hozumi D, Lorenson T, Larsen S, Gowda B, BatsonA. An updated methodology to review developing-country vaccine manufacturer viability. Vaccine 35 (2017) 3897–3903.<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.087>.

34.-Ramsey BW, Nepom GT, Lonial S. Academic, Foundation, and Industry Collaboration in Finding New Therapies. N Engl J Med 2017;376:1762-9. DOI:

10.1056/NEJMra1612575.

35.-Calendario vacunal para toda la vida de Castilla y Leon. En: www.salud.jcyl.es/profesionales/vacunaciones

36.-Barberis I, Myles P, Ault SK, Bragazzi NL, Martini M. History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines. J Prev Med Hyg 2016; 57: E115-E120.

37.-Thompson WW, Comanor L, Shay DK. Epidemiology of Seasonal Influenza: Use of Surveillance Data and Statistical Models to Estimate the Burden of Disease. The Journal of Infectious Diseases 2006; 194 (Suppl 2):S82–91.

38.-Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Panatto D. Influenza vaccination: from epidemiological aspects and advances in research to dissent and vaccination policies. J Prev Med Hyg 2016; 57: E1-E4

39.-Cobey S, Hensley SE. Immune history and influenza virus susceptibility. Current Opinion in Virology 2017, 22:105–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2016.12.004>.

40.-García-Sastre A, Whitley RJ. Lessons Learned from Reconstructing the 1918 Influenza Pandemic. The Journal of Infectious Diseases 2006; 194 (Suppl 2): S127–32.

41.-<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>.

42.-<https://www.who.int/es/news/item/14-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year>

43.-Rotrosen ET, Neuzil KM. Influenza: A Global Perspective. Pediatr Clin N Am 64 (2017) 911– 936. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.007>.

44.-Livingston RA, Bernstein HH. Prevention of Influenza in Children. Infect Dis Clin N Am 29 (2015) 597–615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.07.008>

45.-Boes L, Boedeker B, Schmich P, Wetzstein M, Wichmann O, Remschmidt C. Factors associated with parental acceptance of seasonal influenza vaccination for their children –

A telephone survey in the adult population in Germany. *Vaccine* 35 (2017) 3789–3796. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.015>.

46.-Rondy M, Launay O, Castilla J, Costanzo S, Puig-Barberá J, Gefenaite G, et al. InNHOVE/I- MOVE+working group Alain Moren. Repeated seasonal influenza vaccination among elderly in Europe: Effects on laboratory confirmed hospitalised influenza. *Vaccine* 35 (2017) 4298–4306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.088>.

47.-Ting EEK, Sander B, Ungar WJ. Systematic review of the cost-effectiveness of influenza immunization Programs. *Vaccine* 35 (2017) 1828–1843. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.044>

48.-Gibson AE, Begum N, Sigmundsson B, Sackeyfio A, Hackett J and Rajaram S. Economic evaluation of pediatric influenza immunization program compared with other pediatric immunization programs: A systematic review. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2016, VOL. 12, NO. 5, 1202–1216. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1131369>.

49.-Puig-Barberà J, Mira-Iglesias A, Tortajada-Girbés M, López-Labrador FX, Librero-López J, Díez-Domingo J, et al, for the Valencia Hospital Network for the Study of Influenza and other Respiratory Viruses (VAHNSI, Spain). Waning protection of influenza vaccination during four influenza seasons, 2011/2012 to 2014/2015. *Vaccine* 35 (2017) 5799–5807. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.035>.

50.-Nichol KL, Treanor JJ. Vaccines for Seasonal and Pandemic Influenza. *The Journal of Infectious Diseases* 2006; 194 (Suppl 2): S111–8.

51.-Grohskopf LA, Sokolow LZ, Broder KR, Olsen SJ, Karron Ra, Jernigan DB, Bresee JS. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2016–17 Influenza Season. *MMWR Recomm Rep* 2016;65(5):1-52.

52.-Beyer WEP, Palache AM, Boulfich M, Osterhaus ADME. Rationale for two influenza B lineages in seasonal vaccines: A meta-regression study on immunogenicity and controlled field trials. *Vaccine* 35 (2017) 4167–4176.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.038>.

53.-<https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-26#7>: gripe.

54.-<https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/vacunaciones/calendario-vacunal-toda-vida-castilla-leon-2023.ficheros/2326222->

[Recomendaciones vacunacion gripe PoblacionInfantil%20octubre%202022%20web%20del%20MS.pdf](#)

55.-<https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-26#4.2>: tipos de vacunas de uso pediátrico. Composición y presentación.

56.-Meulen AS, Bergquist S, Klugman KP. Global perspectives on maternal immunisation . *Lancet Infect Dis* 2017 Jul;17(7):685-686. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30230-X. Epub 2017 Apr 19.

57.-Omer SB. Maternal Immunization. *N Engl J Med*. 2017 Mar 30;376(13):1256-1267. doi: 10.1056/NEJMra1509044. *N Engl J Med*. 2017. PMID: 28355514.

58.-Gabutti G, Azzari C, Bonanni P, Prato R, Tozzi AE, Zanetti A, Zuccotti G. Pertussis. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(1):108-17. doi: 10.4161/hv.34364. Epub 2014 Nov 1. PMID: 25483523.

59.-Kurasawa K. Maternal vaccination-current status, challenges, and opportunities . *J Obstet Gynaecol Res*. 2023 Feb;49(2):493-509. doi: 10.1111/jog.15503. Epub 2022 Nov 28.

60.-Raya BA, Edwards KM, Scheifele DW, Halperin SA. Pertussis and influenza immunisation during pregnancy: a landscape review. *Lancet Infect Dis* 2017;e17: 209–22. Published Online April 19, 2017 [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30190-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30190-1).

61.-Becker-Dreps S, Butler AM, McGrath LJ, Boggess KA, Weber DJ, Li D, Hudgens MG, Layton JB, et al. Effectiveness of Prenatal Tetanus, Diphtheria, Acellular Pertussis Vaccination in the Prevention of Infant Pertussis in the U.S. *Am J Prev Med*. 2018 Aug;55(2):159-166. doi: 10.1016/j.amepre.2018.04.013. Epub 2018 Jun 14. *Am J Prev*

Med. 2018. PMID: 29910115

62.-Baissas T, Boissard F, Cuesta Esteve I, García Sánchez M, Jones CE, Rigoine de Fougères T, Tan L, Vitoux O, Klein C. Vaccination in pregnancy against pertussis and seasonal influenza: key learnings and components from high-performing vaccine programmes in three countries: the United Kingdom, the United States and Spain. BMC Public Health. 2021 Nov 29;21(1):2182. doi: 10.1186/s12889-021-12198-2.

63.- Lumbreras Areta M, Eberhardt CS, Siegrist CA, Martínez de Tejada B. Antenatal vaccination to decrease pertussis in infants: safety, effectiveness, timing, and implementation. J Matern Fetal Neonatal Med. 2019 May;32(9):1541-1546. doi: 10.1080/14767058.2017.1406475. Epub 2017 Dec 3.

64.-Abu Raya B, Srugo I, Kessel A, Peterman M, Vaknin A, Bamberger E. The Decline of Pertussis-Specific Antibodies After Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Immunization in Late Pregnancy. J Infect Dis. 2015 Dec 15;212(12):1869-73. doi: 10.1093/infdis/jiv324. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26160743

65.-Cherry JD. Editorial commentary: the effect of Tdap vaccination of pregnant women on the subsequent antibody responses of their infants. Clin Infect Dis. 2015 Dec 1;61(11):1645-7. doi: 10.1093/cid/civ700. Epub 2015 Sep 15. Clin Infect Dis. 2015. PMID: 26374815.

66.-<https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/pertussis:text=WHO%20recommends%20the%20first%20do>.

67.-Prygiel M, Mosiej E, Górska P, Zasada AA. Diphtheria-tetanus-pertussis vaccine: past, current & future. Future Microbiol. 2022 Feb;17:185-197. doi: 10.2217/fmb-2021-0167. Epub 2021 Dec 3.

68.- Guiso N, Meade BD, Wirsing von König CH. Pertussis vaccines: The first hundred years. Vaccine. 2020 Jan 29;38(5):1271-1276. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.022. Epub 2019 Nov 25.

69.- Mazzilli S, Tavošči L, Lopalco PL. Tdap vaccination during pregnancy to protect

newborns from pertussis infection. Ann Ig. 2018 Jul-Aug;30(4):346-363. doi: 10.7416/ai.2018.2226.

70.-Vilajeliu A, García-Basteiro AL, Bayas JM. Protecting newborns against pertussis: the value of vaccinating during pregnancy. Expert Rev Vaccines. 2015;14(8):1051-3. doi: 10.1586/14760584.2015.1050386. Epub 2015 May 31. PMID: 26028129

71.-Healy CM, Rench MA, Baker CJ. [Importance of timing of maternal combined tetanus, diphtheria, and acellular pertussis \(Tdap\) immunization and protection of young infants.](#) Clin Infect Dis. 2013 Feb;56(4):539-44. doi: 10.1093/cid/cis923. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23097585

72.-Layton JB, Butler AM, Li D, Boggess KA, Weber DJ, McGrath LJ, Becker-Dreps S. Prenatal Tdap immunization and risk of maternal and newborn adverse events. Vaccine. 2017 Jul 24;35(33):4072-4078. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.06.071. Epub 2017 Jun 29. Vaccine. 2017. PMID: 28669620.

73.-Ladhani SN, Andrews NJ, Southern J, Jones CE, Amirthalingam G, Waight PA, England A, Matheson M, Bai X, Findlow H, Burbidge P, Thalasselis V, Hallis B, Goldblatt D, Borrow R, Heath PT, Miller E. Antibody responses after primary immunization in infants born to women receiving a pertussis-containing vaccine during pregnancy: single arm observational study with a historical comparator. Clin Infect Dis. 2015 Dec 1;61(11):1637-44. doi: 10.1093/cid/civ695. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26374816

74.- Kandeil W, Savic M, Ceregido MA, Guignard A, Kuznetsova A, Mukherjee P. Immune interference (blunting) in the context of maternal immunization with Tdap-containing vaccines: is it a class effect? Expert Rev Vaccines. 2020 Apr;19(4):341-352. doi: 10.1080/14760584.2020.1749597. Epub 2020 May 7.

75.-Zimmermann P, Perrett KP, Messina NL, Donath S, Ritz N, van der Klis FRM, Curtis N. The Effect of Maternal Immunisation During Pregnancy on Infant Vaccine Responses. E Clinical Medicine. 2019 Jul 26;13:21-30. doi: 10.1016/j.eclinm.2019.06.010. eCollection 2019 Aug. E Clinical Medicine. 2019. PMID: 31517260

76.-<https://www.who.int/es/health-topics/vaccines-and->

[immunization#tab=tab_1vacunación](#)materna

77.-Heil J, ter Waarbeek HLG, Hoebe CJP, Jacobs PHA, van Dam DW, Trienekens TAM, Cals JWL, van Loo IHM, Dukers-Muijers NHTM. Pertussis surveillance and control: exploring variations and delays in testing, laboratory diagnostics and public health service notifications, the Netherlands, 2010 to 2013. Euro Surveill.2017;22(28):pii=30571. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.28.30571>

78.-DeSilva M, Vazquez-Benitez G, Nordin JD, Lipkind HS, Klein NP, Cheetham TC, Naleway AL, Hambidge SJ, Lee GM, Jackson ML, McCarthy NL, Kharbanda EO. Maternal Tdap vaccination and risk of infant morbidity.Vaccine. 2017 Jun 22;35(29):3655-3660. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.041. Epub 2017 May 25.Vaccine. 2017. PMID: 28552511

79.-Healy CM. Pertussis vaccination in pregnancy. Hum Vaccin Immunother . 2016 Aug 2;12(8):1972-1981. doi: 10.1080/21645515.2016.1171948. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27385070 PMCID: PMC4994737 DOI: 10.1080/21645515.2016.1171948

80.-Moraga Llop F. Vacunas conjugadas hexavalentes. An Pediatr 2003; 58: 33-40.

81.- Dolhain J, Janssens W, Dindore V, Mihalyi A. Infant vaccine co-administration: review of 18 years of experience with GSK's hexavalent vaccine co-administered with routine childhood vaccines. Expert Rev Vaccines 2020 May;19(5):419-443. doi: 10.1080/14760584.2020.1758560. Epub 2020 May 18.

82.- Prygiel M, Mosiej E, Górska P, Zasada AA. Diphtheria-tetanus-pertussis vaccine: past, current & future. Future Microbiol. 2022 Feb;17:185-197. doi: 10.2217/fmb-2021-0167. Epub 2021 Dec 3.

83.-Dakin A, Borrow R, Arkwright PD. A review of the DTaP-IPV-HB-PRP-T Hexavalent vaccine in pediatric patients. Expert Rev Vaccines 2023 Jan-Dec;22(1):104-117. doi: 10.1080/14760584.2023.2161519. Epub 2022 Dec 26.

84.- Dolhain J, Janssens W, Mesaros N, Hanssens L, Fierens F. Hexavalent vaccines: increasing options for policy-makers and providers. A review of the data supporting

interchangeability (substitution with vaccines containing fewer antigens) and mixed schedules from the same manufacturer. *Expert Rev Vaccines*. 2018 Jun;17(6):513-524. doi: 10.1080/14760584.2018.1419070. Epub 2018 Jun 19.

85.-Paulke-Korinek M, Fischmeister G, Grac A, Rendi-Wagner P, Kundi M, Mohsenzadeh- Rabbani A, Moritz K, Fenninger B, Jarisch R, Jasinska J, Holzmann H, Wiedermann U, Kollaritsch H. Persistence of antibodies in 4-8 year old Austrian children after vaccination with hexavalent DTaP-HBV-IPV/Hib and MMR vaccines. *Vaccine*. 2011 Jul 18;29(32):5130-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.046. Epub 2011 May 30. *Vaccine*. 2011. PMID: 21624412

86.- Knuf M, Haas H, Garcia-Corbeira P, Turriani E, Mukherjee P, Janssens W, Berlaumont V. Hexavalent vaccines: What can we learn from head-to-head studies? *Vaccine*. 2021 Oct 1;39(41):6025-6036. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.08.086. Epub 2021 Sep 13.

87.-Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Neumococo. Manual de inmunizaciones en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP; ene/2024. [consultado el 05/Oct/2023]. Disponible en: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-31>

88.-Pineda Solas V. Vacunas conjugadas. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2005; 7 Supl 4:S65-74 89.- <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/meningitis>.

90.- Watkins ER, Kalizang'Oma A, Gori A, Gupta S, Heyderman RS. Factors affecting antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* following vaccination introduction. *Trends Microbiol*. 2022 Dec;30(12):1135-1145. doi: 10.1016/j.tim.2022.06.001. Epub 2022 Jul 15.

91.-Tam PYI, Thielen BK, Obaro SK, Brearley AM, Kaizer AM, Chu H, Janoff EN. Childhood pneumococcal disease in Africa - A systematic review and meta-analysis of incidence, serotype distribution, and antimicrobial susceptibility. *Vaccine* 2017 Apr 4;35(15):1817-1827. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.02.045. Epub 2017 Mar 9

92.-Traore Y, Tameklo TA, Njanpop-Lafourcade BM, Lourd M, Yaro S, Niamba D, Drabo A, Mueller JE, Koeck JL, Gessner BD. Incidence, Seasonality, Age Distribution, and Mortality

of Pneumococcal Meningitis in Burkina Faso and Togo. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 48:S181–9. DOI: 10.1086/596498

93.-Yildirim I, Shea KM, Pelton SI. Pneumococcal Disease in the Era of Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Infect Dis Clin N Am* 29 (2015) 679–697. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.07.009>

94.- Du QQ, Shi W, Yu D, Yao KH. Epidemiology of non-vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* before and after universal administration of pneumococcal conjugate vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2021 Dec 2;17(12):5628-5637. doi: 10.1080/21645515.2021.1985353. Epub 2021 Nov 2.

95.-Pichichero M, Malley R, Kaur R, Zagursky R, Anderson P. Acute otitis media pneumococcal disease burden and nasopharyngeal colonization in children due to serotypes included and not included in current and new pneumococcal conjugate vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2023 Jan- Dec;22(1):118-138. doi: 10.1080/14760584.2023.2162506. Epub 2022 Dec 26. PMID: 36565291.

96.-Marimon JM, Ardanuy C. Epidemiology of pneumococcal diseases in Spain after the introduction of pneumococcal conjugate vaccines. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* 2021 Mar;39(3):142-150. doi: 10.1016/j.eimc.2020.02.016. Epub 2020 Mar 27.

97.- Walter EB, Smith MJ. Prevention of pneumococcal infections in childhood: two decades of progress. *Curr Opin Pediatr.* 2022 Apr 1;34(2):140-146. doi: 10.1097/MOP.0000000000001112.

98.-Feldman C, Anderson R. Review: Current and new generation pneumococcal vaccines. *Journal of Infection* (2014) 69, 309e325 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.06.006>

99.- Perdrizet J, Farkouh RA, Horn EK, Hayford K, Sings HL, Wasserman MD. The broader impacts of otitis media and sequelae for informing economic evaluations of pneumococcal conjugate vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2022 Apr;21(4):499-511. doi: 10.1080/14760584.2022.2040989. Epub 2022 Feb 22.

100.-Dagan R. Relationship between immune response to pneumococcal conjugate vaccines in infants and indirect protection after vaccine implementation. *Expert Rev Vaccines*. 2019 Jun;18(6):641-661. doi: 0.1080/14760584.2019.1627207. Epub 2019 Jun 22.

101.-Izurieta P, Bahety P, Adegbola R, Clarke C, Hoet B. Public health impact of pneumococcal conjugate vaccine infant immunization programs: assessment of invasive pneumococcal disease burden and serotype distribution. *Expert Rev Vaccines*. 2018 Jun;17(6):479-493. doi: 10.1080/14760584.2018.1413354. Epub 2018 Jun 29.

102.-Janssens E, Flamaing J, Vandermeulen C, Peetermans WE, Desmet S, De Munter P. The 20-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV20): expected added value. *Acta Clin Belg*. 2023 Feb;78(1):78-86. doi: 10.1080/17843286.2022.2039865. Epub 2022 Feb 16.

103.-Marra LP, Sartori AL, Martinez-Silveira MS, Toscano CM, Andrade AL. Effectiveness of Pneumococcal Vaccines on Otitis Media in Children: A Systematic Review. *Value Health*. 2022 Jun;25(6):1042-1056. doi: 10.1016/j.jval.2021.12.012. Epub 2022 Feb 4.

104.-Pneumovax 23®. Ficha técnica. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/63828/FT_63828.html

105.-Synflorix®. Ficha técnica. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/09508004/FT_09508004.html

106.-Prevenar 13®. Ficha técnica. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/09590002/FT_09590002.html

107.-Zimmermann P, Perrett KP, Berbers G, Curtis N. Persistence of pneumococcal antibodies after primary immunisation with a polysaccharide-protein conjugate vaccine. *Arch Dis Child*. 2019 Jul;104(7):680-684. doi: 10.1136/archdischild-2018-316254. Epub 2019 Feb 22. *Arch Dis Child*. 2019. PMID: 30796020

108.-Blyth CC, Jayasinghe S, Andrews RM. A Rationale for Change: An Increase in Invasive

Pneumococcal Disease in Fully Vaccinated Children. Clin Infect Dis. 2020 Feb 3;70(4):680-683. doi: 10.1093/cid/ciz493.

109.-Prevenar 20®. Ficha técnica. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/09590002/FT_09590002.html

110.-Vaxneuvance®. Ficha técnica. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/1211591003/P_1211591003.html

111.-Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Meningococo. Manual de inmunizaciones en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP; ene/2024. [consultado el 05/Oct/2023]. Disponible en: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-30>

112.-Pizza M, Rappuoli R. Neisseria meningitidis: pathogenesis and immunity. Current Opinion in Microbiology 2015, 23:68–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.006>

113.-Stephens DS, Apicella MA. Neisseria meningitidis. En: Mandell, Douglas, Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Publicado January 1, 2021. Páginas 2585-2607.

114.-Assaf-Casals A, Dbaibo G. Meningococcal quadrivalent tetanus toxoid conjugate vaccine (MenACWY-TT, Nimenrix™): A review of its immunogenicity, safety, co-administration, and antibody persistence. Hum VaccinImmunother. 2016 Jul 2;12(7):1825-37. doi: 10.1080/21645515.2016.1143157. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26900984

115.-Stephens DS. Neisseria Meningitidis Infections. En: Goldman-Cecil Medicine, 274, 1941- 1946.e1.

116.-Pardo de Santayana C, Htar MTT, Findlow J, Balmer P. Epidemiology of invasive meningococcal disease worldwide from 2010-2019: a literature review. Epidemiol Infect. 2023 Mar 6;151:e57. doi: 10.1017/S0950268823000328. PMID: 37052295 PMCID: PMC10126893 DOI: 10.1017/S0950268823000328

117.-Martin NV, Ong KS, Howden BP, Lahra MM, Lambert SB, Beard FH, Dowse GK,

Saul N, Communicable Diseases Network Australia MenW Working Group. Rise in invasive serogroup W meningococcal disease in Australia 2013-2015. *Commun Dis Intell Q Rep* . 2016 Dec 24;40(4):E454-E459.

118.-Parikh SR, Campbell H, Bettinger JA, Harrison LH, Marshall HS, Martinon-Torres F, Safadi MA, Shao Z, Zhu B, von Gottberg A, Borrow R, Ramsay ME, Ladhani SN. The everchanging epidemiology of meningococcal disease worldwide and the potential for prevention through vaccination. *J Infect*. 2020 Oct;81(4):483-498. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.079. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32504737.

119.-The Men AfriCar consortium. Meningococcal carriage in the African meningitis belt. *Tropical Medicine and International Health*. Volume 18 no 8 pp 968–978 August 2013. doi:10.1111/tmi.12125

120.-Dretler AW, Roupheal NG, Stephens DS. Progress toward the global control of *Neisseria meningitidis*: 21st century vaccines, current guidelines, and challenges for future vaccine development. *Hum Vaccin Immunother*. 2018 May 4;14(5):1146-1160. doi: 10.1080/21645515.2018.1451810. Epub 2018 May 9. PMID: 29543582

121.-Breakwell L, Whaley M, Khan UI, Bandy U, Alexander-Scott N, Dupont L, Vanner C, Chang HY, Vuong JT, Martin S, MacNeil JR, Wang X, Meyer SA. Meningococcal carriage among a university student population - United States, 2015. *Vaccine* 2018 Jan 2;36(1):29-35. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.040. Epub 2017 Nov 26.

122.-Martín-Torres F, Taha MK, Knuf M, Abbing-Karahagopian V, Pellegrini M, Bekkat-Berkani R, Abitbol V. Evolving strategies for meningococcal vaccination in Europe: Overview and key determinants for current and future considerations. *Pathog Glob Health*. 2022 Mar;116(2):85-98. doi: 10.1080/20477724.2021.1972663. Epub 2021 Sep 27. PMID: 34569453; PMCID: PMC8933022.

123.-Burman C, Serra L, Nuttens C, Presa J, Balmer P, York L. Meningococcal disease in adolescents and young adults: a review of the rationale for prevention through vaccination. *Hum Vaccin Immunother* 2019;15(2):459-469. doi: 10.1080/21645515.2018.1528831. Epub 2018 Oct 29.

124.-Levy C, de La Rocque F, Cohen R.[Epidemiology of pediatric bacterial meningitis in France]. Med Mal Infect. 2009 Jul-Aug;39(7-8):419-31. doi: 10.1016/j.medmal.2009.03.006. PMID: 19394774 French.

125.-Knoll MJ, Ruijs WL, Antonise-Kamp L, de Melker HE, van der Ende A. Implementation of MenACWY vaccination because of ongoing increase in serogroup W invasive meningococcal disease, the Netherlands, 2018.Euro Surveill. 2018 Apr;23(16):18-00158. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.16.18-00158.PMID: 29692317

126.-Daugla DM, Gami JP, Gamougam K, Naibei N, Mbainadji L, Narbé M, Toralta J, Kodbessé B, Ngadoua C, Coldiron ME, Fermon F, Page AL, Djingarey MH, Hugonnet S, et al. Effect of a serogroup A meningococcal conjugate vaccine (PsA-TT) on serogroup A meningococcal meningitis and carriage in Chad: a community study [corrected]. Lancet. 2014 Jan

4;383(9911):40-47. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61612-8. Epub 2013 Sep 12.Lancet. 2014. PMID: 24035220

127.-Presa J, Findlow J, Vojcic J, Williams S, Serra L. Epidemiologic Trends, Global Shifts in Meningococcal Vaccination Guidelines, and Data Supporting the Use of MenACWY-TT Vaccine: A Review . Infect Dis Ther 2019 Sep;8(3):307-333. doi: 10.1007/s40121-019-0254-1. Epub 2019 Jul 25.

128.-Nimenrix®. Ficha técnica. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/12767003/FT_12767003.html

129.-Martín-Torres F, Serra L, Safadi MAP. Protecting the most vulnerable age group: a review of MenACWY-TT immunogenicity and safety in infants. Expert Rev Vaccines. 2020 Apr;19(4):313-325. doi: 10.1080/14760584.2020.1745070. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32250710.

130.-Webber C, Peyrani P, Balmer P, Serra L. Persistence of bactericidal antibodies following primary and booster MenACWY-TT vaccination of toddlers: A review of clinical studies. Vaccine. 2020 Jun 2;38(27):4236-4245. doi:10.1016/j.vaccine.2020.02.048. Epub

2020 May 7. PMID: 32389497.

131.-Quiambao BP, Bavdekar A, Dubey AP, Jain H, Kolhe D, Bianco V, Miller JM, Van der Wielen M. Antibody persistence up to 5 y after vaccination with a quadrivalent meningococcal ACWY- tetanus toxoid conjugate vaccine in adolescents. Hum Vaccine Immunother. 2017 Mar 4;13(3):636-644. doi: 10.1080/21645515.2016.1248009. Epub 2017 Feb 2.

132.-Oldfield NJ, Green LR, Parkhill, J, Bayliss CD, Turner David PJ. Limited Impact of Adolescent Meningococcal ACWY Vaccination on Neisseria meningitidis Serogroup W Carriage in University Students. J Infect Dis 2018 Jan 30;217(4):608-616.doi:10.1093/infdis/jix596.

133.-Tsang RS, Hoang L, Tyrrell GJ, Minion J, Van Caeseele P, Kus JV, Lefebvre B, Haldane D, Garceau R, Alemán G, Zahariadis G, Hanley B. Increase in ST-11 serogroup W Neisseria meningitidis invasive meningococcal disease in Canada, 2016–2018. Can Commun Dis Rep . 2019 6 de junio; 45 (6): 164-169. doi: 10.14745 / ccdr.v45i06a04

134.-Menveo®. Ficha técnica. Disponible en:
https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/10614002/FT_10614002.html

135.-Keshavan P, Pellegrini M, Vadivelu-Pechai K, Nissen M. An update of clinical experience with the quadrivalent meningococcal ACWY-CRM conjugate vaccine. Expert Rev Vaccines. 2018 Oct;17(10):865-880. doi: 10.1080/14760584.2018.1521280. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30198805.

136.-Luo W, Arkwright PD, Borrow R. Antibody persistence following meningococcal ACWY conjugate vaccine licensed in the European Union by age group and vaccine. Expert Rev Vaccines. 2020 Aug;19(8):745-754. doi: 10.1080/14760584.2020.1800460. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32897762.

137.-Bexsero®. Ficha técnica. Disponible en:
https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/112812001/FT_112812001.html

138.-Trumemba®. Ficha técnica. Disponible en:

https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171187001/FT_1171187001.html

139.-Ministerio de Sanidad. Consejo interterritorial. Sistema Nacional de Salud. Calendario común de vacunación a lo largo de toda la vida. Calendario recomendado año 2023.

https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/calendario-y-coberturas/docs/CalendarioVacunacion_Todalavida.pdf

140.-Sacyl. Junta de Castilla y León. Vacunaciones. Calendario vacunal para toda la vida de Castilla y León 2019.

<https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/vacunaciones/calendario-vacunal-toda-vida-castilla-leon-2019>

ANEXO

Artículo 1. *Claeys C, Drame M, García-Sicilia J, Zaman K, Carmona A, Tran PM, Miranda M, Martínón-Torres F, Thollot F, Horn M, Schwarz TF, Behre U, Merino JM, Sadowska-Krawczenko I, Szymański H, Schu P, Neumeier E, Li P, Jain VK, Innis BL. Assessment of an optimized manufacturing process for inactivated quadrivalent influenza vaccine: a phase III, randomized, double-blind, safety and immunogenicity study in children and adults. BMC Infect Dis. 2018 Apr 18;18(1):186. doi: 10.1186/s12879-018-3079-8. PMID: 29669531; PMCID: PMC5907359.*

Artículo 2. *Perrett KP, Halperin SA, Nolan T, Carmona Martínez A, Martínón-Torres F, García-Sicilia J, Virta M, Vanderkooi OG, Zuccotti GV, Manzoni P, Kostanyan L, Meyer N, Ceregido MA, Cheuvart B, Kuriyakose SO, Stranak Z, Merino Arribas JM, Cilleruelo Ortega MJ, Miranda-Valdivieso M, Arias Novas B, Ramos Amador JT, Omeñaca F, Baca M, Marchisio PG, Mesaros N. Impact of tetanus-diphtheria-acellular pertussis immunization during pregnancy on subsequent infant immunization seroresponses: follow-up from a large randomized placebo-controlled trial. Vaccine. 2020 Feb 18;38(8):2105-2114. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.10.104. Epub 2019 Nov 24. PMID: 31776027.*

Artículo 3. *Martínón-Torres F, Halperin SA, Nolan T, Tapiéro B, Perrett KP, de la Cueva IS, García-Sicilia J, Stranak Z, Vanderkooi OG, Kosina P, Rumlarova S, Virta M, Arribas JMM, Miranda-Valdivieso M, Novas BA, Bozensky J, Ortega MJC, Amador JTR, Baca M, Palomino EE, Zuccotti GV, Janota J, Marchisio PG, Kostanyan L, Meyer N, Ceregido MA, Cheuvart B, Kuriyakose SO, Mesaros N. Impact of maternal diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccination on pertussis booster immune responses in toddlers: Follow-up of a randomized trial. Vaccine. 2021 Mar 12;39(11):1598-1608. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.02.001. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33612341.*

Artículo 4. *Merino Arribas JM, Carmona Martínez A, Horn M, Perez Porcuna XM, Otero Reigada MDC, Marès Bermúdez J, Centeno Malfaz F, Miranda M, Mendez M, Garcia Cabezas MA, Christoph W, Bleckmann G, Fischbach T, Kolhe D, Van der Wielen M, Baine Y. Immunogenicity and Reactogenicity of DTPa-HBV-IPV/Hib and PHiD-CV When Coadministered With MenACWY-TT in Infants: Results of an Open, Randomized*

Trial. Pediatr Infect Dis J. 2018 Jul;37(7):704-714. doi: 10.1097/INF.0000000000002061. PMID: 29620722.

Artículo 5. Carmona Martínez A, Prymula R, Miranda Valdivieso M, Otero Reigada MDC, **Merino Arribas JM**, Brzostek J, Szenborn L, Ruzkova R, Horn MR, Jackowska T, Centeno-Malfaz F, Traskine M, Dobbelaere K, Borys D. Immunogenicity and safety of 11- and 12-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D-conjugate vaccines (11vPHiD-CV, 12vPHiD-CV) in infants: Results from a phase II, randomised, multicentre study. *Vaccine*. 2019 Jan 3;37(1):176-186. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.07.023. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30054160.

Artículo 6. Merino Arribas JM, Carmona Martínez A, Horn M, Perez Porcuna XM, Otero Reigada MD, Marès Bermúdez J, Centeno Malfaz F, Miranda M, Mendez M, Garcia Cabezas MA, Wittermann C, Bleckmann G, Fischbach T, Kolhe D, van der Wielen M, Baine Y. Safety and Immunogenicity of the Quadrivalent Meningococcal Serogroups A, C, W and Y Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Coadministered With Routine Childhood Vaccines in European Infants: An Open, Randomized Trial. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Apr;36(4):e98-e107. doi: 10.1097/INF.0000000000001484. PMID: 28002359

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Assessment of an optimized manufacturing process for inactivated quadrivalent influenza vaccine: a phase III, randomized, double-blind, safety and immunogenicity study in children and adults

Carine Claeys^{1*}, Mamadou Drame², José García-Sicilia³, Khalequ Zaman⁴, Alfonso Carmona⁵, Phu My Tran⁶, Mariano Miranda⁷, Federico Martín-Torres^{8,9}, Franck Thollot¹⁰, Michael Horn¹¹, Tino F. Schwarz¹², Ulrich Behre¹³, José M. Merino¹⁴, Iwona Sadowska-Krawczenko^{15,16}, Henryk Szymański¹⁷, Peter Schu¹⁸, Elisabeth Neumeier¹⁸, Ping Li^{2,19}, Varsha K. Jain^{20,21} and Bruce L. Innis^{20,22}

Abstract

Background: GSK has modified the licensed monovalent bulk manufacturing process for its split-virion inactivated quadrivalent influenza vaccine (IIV4) to harmonize the process among different strains, resulting in an increased number of finished vaccine doses, while compensating for the change from inactivated trivalent influenza vaccine (IIV3) to IIV4. To confirm the manufacturing changes do not alter the profile of the vaccine, a clinical trial was conducted to compare IIV4 made by the currently licensed process with a vaccine made by the new (investigational) process (IIV4-I). The main objectives were to compare the reactogenicity and safety of IIV4-I versus IIV4 in all age groups, and to demonstrate the non-inferiority of the hemagglutination-inhibition (HI) antibody responses based on the geometric mean titer ratio of IIV4-I versus IIV4 in children.

Methods: The Phase III, randomized, double-blind, multinational study included three cohorts: adults (18–49 years; $N = 120$), children (3–17 years; $N = 821$), and infants (6–35 months; $N = 940$). Eligible subjects in each cohort were randomized 1:1 to receive IIV4-I or IIV4. Both vaccines contained 15 μg of hemagglutinin antigen for each of the four seasonal virus strains. Adults and vaccine-primed children received one dose of vaccine, and vaccine-unprimed children received two doses of vaccine 28 days apart. All children aged ≥ 9 years were considered to be vaccine-primed and received one dose of vaccine.

Results: The primary immunogenicity objective of the study was met in demonstrating immunogenic non-inferiority of IIV4-I versus IIV4 in children. The IIV4-I was immunogenic against all four vaccine strains in each age cohort. The reactogenicity and safety profile of IIV4-I was similar to IIV4 in each age cohort, and there was no increase in the relative risk of fever ($\geq 38^\circ\text{C}$) with IIV4-I versus IIV4 within the 7-day post-vaccination period in infants (1.06; 95% Confidence Interval: 0.75, 1.50; $p = 0.786$).

(Continued on next page)

* Correspondence: carine.x.claeys@gsk.com

¹GSK, Clinical Research and Development, Wavre, Belgium

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Conclusions: The study demonstrated that in adults, children, and infants, the IIV4-I made using an investigational manufacturing process was immunogenic with a reactogenicity and safety profile that was similar to licensed IIV4. These results support that the investigational process used to manufacture IIV4-I is suitable to replace the current licensed process.

Trial registration: ClinicalTrials.gov: [NCT02207413](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02207413); trial registration date: August 4, 2014.

Keywords: Adults, Infants, Children, Quadrivalent, Influenza vaccine, Investigational, Manufacturing, Immunogenicity, Reactogenicity, Safety,

Background

Two phylogenetically and antigenically distinct influenza B lineages (B/Yamagata and B/Victoria) emerged globally in humans in the early 1980s, and have co-circulated in the US since 2001 [1]. Influenza B virus circulation is unpredictable, with both lineages co-circulating in recent years, meaning that trivalent influenza vaccines don't offer optimal protection against influenza B [2, 3]. Consequently, some manufacturers have developed quadrivalent influenza vaccines to improve vaccine efficacy against influenza B, and in the 2012/13 influenza season, the World Health Organization (WHO) recommended four seasonal influenza viruses for seasonal quadrivalent influenza vaccines, including an influenza B/Yamagata and B/Victoria strain [4].

Quadrivalent influenza vaccines from various manufacturers were licensed based on studies demonstrating that quadrivalent versus trivalent vaccine have similar immunogenicity against common vaccine strains, but the quadrivalent vaccine had superior immunogenicity for the influenza B strain absent from the trivalent vaccine [5–21]. The studies also showed that quadrivalent and trivalent influenza vaccines have similar safety profiles despite the additional 15 µg of influenza B hemagglutinin antigen in the quadrivalent vaccine. To date, there has been only two efficacy study of a quadrivalent influenza vaccine, which was a randomized, observer-blinded assessment in children aged 6–35 months and 3–8 years of age [22, 23]. These studies showed that IIV4 versus control reduced PCR-confirmed 'any influenza disease' by 50 to 59.3% and reduced 'moderate-to-severe influenza disease' by 63 to 74.2% [22, 23].

GSK received marketing authorization in the United States in 2012 and in several European countries in 2013 for its inactivated quadrivalent influenza vaccine (IIV4) produced in Dresden, Germany [24–27]. GSK has introduced modifications to its licensed monovalent bulk manufacturing process for its IIV4 vaccine to harmonise process conditions for different influenza strains and to improve the manufacturing procedure to increase the number of finished vaccine doses, while compensating for the change from inactivated trivalent influenza vaccine (IIV3) to IIV4. The specification of the final product remained unchanged. While each of the modifications in itself was assessed as

minor, the combined impact of the changes on the vaccine was difficult to assess using analytical and process data alone. Therefore the impact of the modifications on the benefit-risk profile of the vaccine was evaluated in a clinical study, assessing the immunogenicity and safety of IIV4-I and IIV4 in adults, children, and infants.

Methods

Design and participants

The Phase III, randomized, double-blind, multinational study was conducted to assess the safety and immunogenicity of IIV4 manufactured by an investigational process or by a licensed process in a cohort of adults (18–49 years), a cohort of children (3–17 years), and a cohort of infants (6–35 months). The study was conducted during the 2014/15 influenza season in Bangladesh, Czech Republic, France, Germany, Poland, Spain and the United States (ClinicalTrials.gov: [NCT02207413](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02207413); trial registration date: August 4, 2014).

To be eligible, participants in each age group had to be in stable health. Subjects were excluded if they had received 1) any non-registered drug or vaccine within 30 days or 2) any investigational or approved influenza vaccine (seasonal or pandemic) within 6 months of the first visit. Subjects were also excluded if they 3) were planning to participate in another clinical trial during the study, 4) were pregnant or breast-feeding, 5) were immunocompromised or receiving long-acting immune-modifying medicines, 6) had received immunoglobulins or any blood products within 3 months, or if they 7) had a history of allergy to any of the vaccine components or a history of Guillain-Barré Syndrome.

Adult participants were assessed from study entry until 21 days after vaccination. Children and infants were assessed from study entry until 28 days after the final vaccination. Cohorts were enrolled sequentially to limit risk to children and infants. Routine childhood vaccinations were permitted.

All adults or a parent/guardian of children provided written informed consent for participation, and children were required to assent if capable. The study was conducted in accordance with the Good Clinical Practice guidelines, the Declaration of Helsinki and applicable local regulations. All

study documents were approved by the appropriate Institutional Review Boards.

The study design was reviewed and approved by The Paul-Ehrlich Federal Institute for Vaccines and Biomedicines (Langen, Germany) and the United States Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).

Objectives

In adults (18–49 years) who received one dose of IIV4-I or IIV4, the primary objectives were: 1) to describe solicited injection-site adverse events (AEs) and general AEs within 7 days post-vaccination, including solicited oculo-respiratory syndrome (ORS)-like symptoms within 3 days post-vaccination; 2) to describe unsolicited AEs within 21 days post-vaccination and serious adverse events (SAEs) and medically-attended adverse events (MAEs) during the entire study period. Secondary objectives included a description of hemagglutination-inhibition (HI) antibody titers for IIV4-I and IIV4 at baseline and 21 days after vaccination.

In children (3–17 years) who received one or two doses of IIV4-I or IIV4 the primary objectives were: 1) to demonstrate the immunogenic non-inferiority of IIV4-I compared with IIV4 for each vaccine strain based on the GMT ratio measured by HI assay 28 days after completion of the vaccination series; 2) to describe solicited injection site AEs and general AEs within 7 days post-vaccination, including solicited ORS-like symptoms within 3 days post-vaccination; 3) to describe unsolicited AEs within 28 days after vaccination and SAEs and MAEs during the entire study period. Secondary objectives included the assessment of the relative risk (RR) of myalgia within 7 days post-vaccination for IIV4-I versus IIV4 in children aged 5–17 years, and the assessment of baseline and post-vaccination HI antibody titers for IIV4-I and IIV4.

In infants (6–35 months) who received one or two doses of IIV4-I or IIV4 the primary objectives were to demonstrate sequentially: 1) the immunogenic non-inferiority of IIV4-I compared with IIV4 for each vaccine strain based on geometric mean titer (GMT) ratio measured by HI assay 28 days after completion of the vaccination series; 2) no significant increase in subjects who reported fever $\geq 38^\circ\text{C}$ with IIV4-I compared with IIV4 within the 7-day post-vaccination periods after dose 1 or dose 2. Secondary objectives included the assessment of the RR of fever $\geq 38^\circ\text{C}$ in the IIV4-I group compared with the IIV4 group within 7 days post-vaccination after dose 1 and dose 2. Further secondary assessments were solicited injection site AEs and general AEs within 7 days post-vaccination, including solicited ORS-like symptoms within 3 days post-vaccination, unsolicited AEs (28 days), SAEs, and MAEs (entire study period), and baseline and post-vaccination HI antibody titers for IIV4-I and IIV4.

A further secondary objective in a group pooled from the infant and children cohorts including subjects aged 6 months–4 years was to describe the RR of fever $\geq 38^\circ\text{C}$ and $>39^\circ\text{C}$ within 2 days after dose 1 or dose 2 in the IIV4-I group compared with the IIV4 group.

Enrolment and randomization

The adults, children, and infants cohorts were enrolled sequentially. Adults were enrolled and vaccinated first, and a safety review was conducted by the sponsor's internal Safety Review Committee (iSRC) to review the 7 days post-vaccination safety data. Upon the receipt of iSRC's endorsement based on the safety review in adults, enrolment of children aged 3–17 years began, and enrolment of infants aged 6–35 months started after the first 100 subjects in the 3–17 years cohort were vaccinated and no life-threatening related SAE(s) were reported within 2 days after dose 1.

The randomization list and allocation of vaccines was generated using a software program developed for use in SAS (Cary, NC, USA) by GSK, Rixensart, Belgium. Vaccine allocation of the subjects at each study center was performed by investigators using an internet-based central randomization system. Eligible subjects in each age cohort were randomized 1:1 to receive IIV4-I or IIV4. The randomization algorithm used a minimization procedure in each age cohort: randomization in adults accounted for study center, age (18–33 years and 34–49 years), and influenza vaccination history in the previous season; randomization in children accounted for study center, age (3–4 years, 5–8 years, and 9–17 years), vaccine-priming status in children aged <9 years, and influenza vaccination history in the previous season in children aged ≥ 9 years; and randomization in infants accounted for study center, age (6–17 months and 18–35 months), and vaccine-priming status.

Vaccines and vaccination

The IIV4-I and the IIV4 (*Influsplit Tetra*, *Fluarix Tetra*, *Fluarix Quadrivalent*) were developed and manufactured by GSK in Dresden, Germany. IIV4-I and IIV4 were prepared from influenza viruses grown in embryonated chicken eggs. Virus is disrupted in a solution containing detergent and inactivated by the consecutive effect of sodium deoxycholate and formaldehyde. The split virus is suspended in sodium phosphate-buffered isotonic sodium chloride solution. IIV4-I was manufactured by a bulk manufacturing process in which conditions for different influenza strains were harmonised, such as composition of process media or use of excipients. The changes did not affect the conditions of virus replication, or inactivation. The specification of the final vaccine remains the same as for IIV4.

Each 0.5 mL dose of vaccine contained 15 μg of hemagglutinin antigen for each of the influenza strains

recommended by the WHO for the 2014/15 influenza season in the Northern Hemisphere: A/H1N1 (A/Christchurch/16/2010, an A/California/7/2009 like stain), A/H3N2 (A/Texas/50/2012, antigenically like the cell propagated A/Victoria/361/2011 strain), B/Yamagata lineage (B/Massachusetts/2/2012), and B/Victoria lineage (B/Brisbane/60/2008) [28].

Adults received one dose of vaccine (Day 0), infants and children aged 6 months–8 years who were vaccine-primed received one dose of vaccine (Day 0) and those who were vaccine-unprimed received two doses of vaccine 28 days apart (Day 0 and Day 28). All children aged ≥ 9 years were considered to be vaccine-primed and received one dose of vaccine. Vaccines were administered by blinded personnel in the deltoid of the non-dominant arm (adults and children ≥ 12 months), or in the antero-lateral thigh (infants aged < 12 months).

Children were defined as vaccine-primed if they had received ≥ 1 dose(s) of seasonal influenza vaccine in the previous influenza season (2013/14), or ≥ 2 doses of seasonal influenza vaccine since 1st July 2010, or ≥ 2 doses of seasonal influenza vaccine before 1st July 2010 and ≥ 1 dose(s) of A(H1N1)pdm09 vaccine, or ≥ 1 dose(s) of seasonal influenza vaccine before 1st July 2010 and ≥ 1 dose(s) of seasonal influenza vaccine since 1st July 2010. The definition of vaccine-priming status was based on US Advisory Committee on Immunization Practices recommendations [29].

Assessments

Immunogenicity

Immunogenicity was assessed at Day 0 and Day 28 (infants and children) or Day 21 (adults) in subjects who received one dose of vaccine, and at Day 0 and Day 56 in infants and children who received two doses of vaccine. Immune responses to each vaccine strain were assessed by HI assay using an established method [30].

HI antibody responses were described as the arithmetic mean of the log₁₀ transformed inverse geometric mean titres (GMT), seroprotection rate (SPR; proportion with post-vaccination titer $\geq 1:40$), and the seroconversion rate (SCR; proportion with antibody titer $< 1:10$ at baseline and with post-vaccination titer of $\geq 1:40$, or pre-vaccination titer of $\geq 1:10$ and a ≥ 4 -fold post-vaccination increase in titer). Subjects with HI antibody titers of $\geq 1:10$ were considered to be seropositive.

Solicited AEs

The incidence and severity of injection site AEs and general AEs was recorded by adults and by parents/guardians on diary cards during 7 days after receipt of each dose of vaccine. Injection site symptoms were: pain, swelling, and redness; general symptoms in children aged ≥ 5 years and adults were fatigue, gastrointestinal (GI) symptoms,

headache, joint pain, myalgia, shivering, and fever. General symptoms in infants and children aged < 5 years were drowsiness, irritability/fussiness, loss of appetite, and fever. Solicited ORS-like symptoms were: bilateral red eyes, chest tightness, cough, difficulty breathing, wheezing, hoarseness, sore throat, swallowing difficulty and swelling of the face.

Unsolicited AEs

In the adult cohort, unsolicited AEs were assessed within 21 days post-vaccination, and in the infant and children cohorts, unsolicited AEs were assessed within 28 days after the receipt of vaccine. MAEs and SAEs were assessed during the whole study period, including the allowed visit intervals of up to 23 days for adults, and up to 42 days post-vaccination for children.

Severity and causality of AEs

Solicited and unsolicited AEs were graded for severity: Grade 1 symptoms were those which caused mild discomfort; Grade 2 symptoms were those which caused moderate discomfort but did not prevent normal activities; Grade 3 symptoms were those which caused severe discomfort which prevented normal activities. Fever was defined as an axillary temperature of ≥ 38.0 °C and Grade 3 fever as > 39.0 °C. All injection-site AEs were deemed to be vaccine-related and investigators provided causality assessments for solicited general AEs and unsolicited AEs.

Statistical analyses

The target sample size of adults (18–49 years) was 120, which was based on an evaluable population of 100 participants with a 15% drop-out rate. This sample size was considered to be an adequate sample for the pilot safety assessment in adults before the sequential enrolment of children.

The target sample size in the children (3–17 years) cohort was based on the power to detect immunogenic non-inferiority for IIV4-I compared with IIV4 of the HI GMT ratio for 4 vaccine strains 28 days after the completion of the vaccination series. The target population in children was 360 evaluable subjects in each vaccine group, which would detect immunogenic non-inferiority with 98% global power using a 1-sided, 2-sample t-test and to meet the upper limit (UL) of the 95% confidence interval (CI) of the GMT ratio was ≤ 1.5 . The target sample size in the infant (6–35 months) cohort was based on 420 evaluable subjects needed in each group to detect non-inferiority of HI GMT ratio for IIV4-I compared with IIV4 with 92% global power using a 1-sided, 2-sample t-test to meet the UL of the 95% CI of the GMT ratio ≤ 1.5 . A total of 470 vaccinated infants provides 90% power to rule out the relative risk of fever (38.0°C) > 2 for IIV4-I/IIV4 using a 1-sided Score test [31].

GMT ratios were derived using the Analysis of Covariance (ANCOVA) on the log10 transformed titers adjusted by age and pre-vaccination titer. Immunogenicity analyses of GMT, SPR, and SCR were described as point estimates with 95% CIs. All immunogenicity analyses were performed on the per-protocol immunogenicity cohort for each age group including eligible subjects without protocol deviation who had serological data available at a given time point.

Solicited and unsolicited AEs were described as percentages with 95% CIs. All safety assessments were performed in the total vaccinated cohort (TVC) including all subjects who received at least 1 dose of vaccine. The relative risk (RR) of myalgia and fever was calculated with a 95% CIs.

Results

Enrolment started on 18 August 2014 and the last study visit was completed on 18 April 2015. The TVC of adults (aged 18–49 years) included 120 participants of which 119 completed the final study visit; the TVC of children (aged 3–17 years) included 821 participants of which one was lost to follow-up; the TVC of infants (aged 6–35 months) included 940 participants of which 920 completed the final study visit (Fig. 1). The baseline demographic characteristics in each age cohort are shown in Table 1. The vaccine groups were generally well balanced regarding age, geographic ancestry and gender.

In children aged 3–17 years, in the IIV4-I and IIV4 groups, 309 and 313 children respectively were primed, and 101 and 98 children, respectively were unprimed (Fig. 1). In

infants aged 6–35 months, in the IIV4-I and IIV4 groups, 40 and 41 children respectively were primed, and 426 and 433 infants, respectively were unprimed.

Immunogenicity

Adults

The per-protocol immunogenicity population included 57 adults (18–49 years) in the IIV4-I group and 58 in the IIV4 group. Both vaccines were immunogenic, and 95% CIs for the SCRs and SPRs overlapped between the IIV4-I and IIV4 groups. Against each vaccine strain 21 days after vaccination: the SCRs varied from 47.4 to 73.7% and from 50.9 to 73.7% for IIV4-I and IIV4 groups, respectively (Fig. 2).

Children

The per-protocol immunogenicity population included 403 children (3–17 years) in the IIV4-I group and 402 in the IIV4 group. Immunogenic non-inferiority in terms of the GMT ratio for IIV4-I compared with IIV4 was demonstrated for all four vaccine strains (UL 95% CI ≤1.5) (Table 2). Both vaccines were immunogenic against each vaccine strain 28 days after vaccination (Table 3). Against each vaccine strain, the SCRs varied from 47.6 to 70.7% and from 45.5 to 71.4% for IIV4-I and IIV4 groups, respectively.

Infants

The per-protocol immunogenicity population included 432 infants (6–35 months) in the IIV4-I group and 427

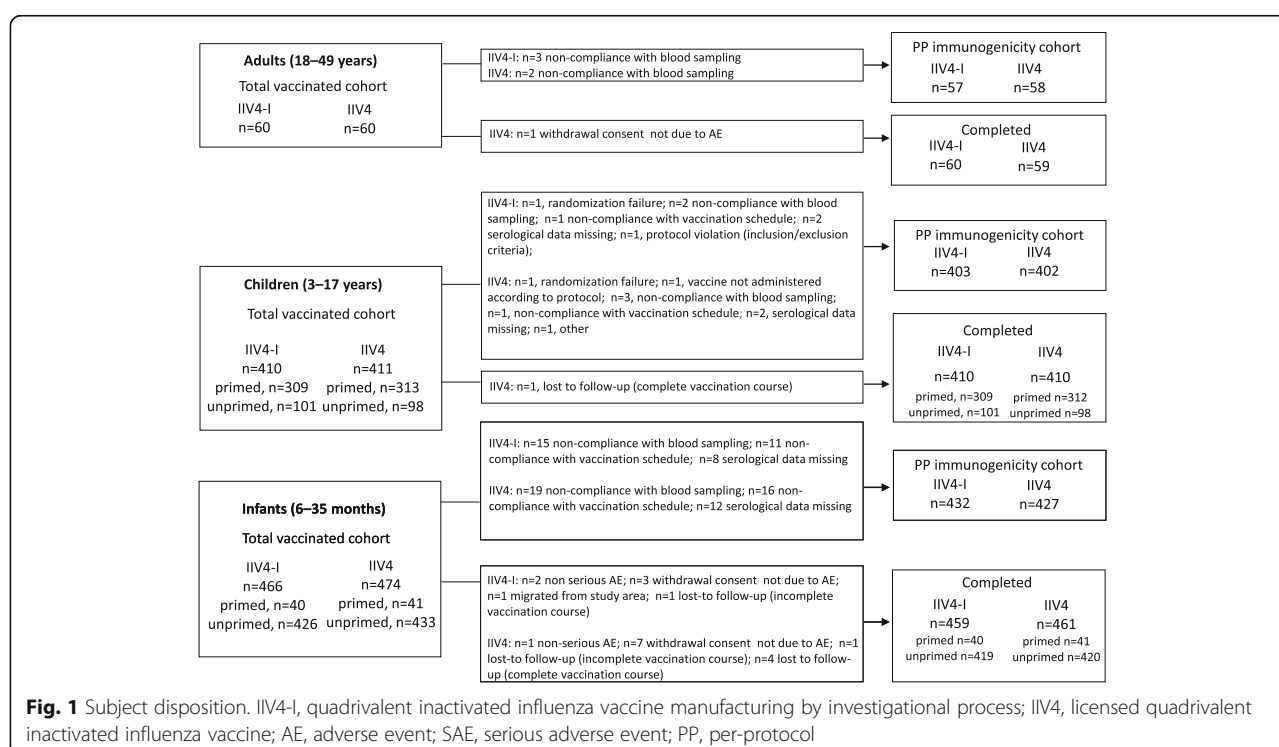


Table 1 Baseline demographics in the total vaccinated cohort

	Infants		Children		Adults	
	6–35 months		3–17 years		18–49 years	
	IIV4-I N = 466	IIV4 N = 474	IIV4-I N = 410	IIV4 N = 411	IIV4-I N = 60	IIV4 N = 60
Mean age, (SD)	19.7 (8.0) months	19.9 (8.3) months	9.4 (4.2) years	9.4 (4.2) years	29.8 (8.7) years	31.2 (9.3) years
Median age, (range)	19 (4–36) months	19 (5–35) months	9.0 (3–18) years	10.0 (3–18) years	28.0 (19–49) years	29.0 (18–49) years
Male, n (%)	243 (52.1)	265 (55.9)	214 (52.1)	224 (54.5)	19 (31.7)	25 (41.7)
White - Caucasian/European Heritage, n (%)	329 (70.6)	337 (71.1)	378 (92.2)	370 (90.0)	60 (100)	56 (93.3)
African Heritage/African American, n (%)	10(2.1)	10 (2.1)	11 (2.7)	17 (4.1)	0	2 (3.3)
Asian - South East Asian Heritage, n (%)	91 (19.5)	91 (19.2)	0	0	0	2 (3.3)
White - Arabic/North African Heritage, n (%)	28 (6.0)	23 (4.9)	13 (3.2)	15 (3.6)	0	0

IIV4-I quadrivalent inactivated influenza vaccine manufacturing by investigational process, IIV4 licensed quadrivalent inactivated influenza vaccine, SD standard deviation, N number of subjects with ≥ 1 vaccine dose, n number of subjects fulfilling the demographic

in the IIV4 group. Immunogenic non-inferiority in terms of GMT ratio for IIV4-I compared with IIV4 was demonstrated for all four vaccine strains (UL 95% CI ≤ 1.5) (Table 2). Both vaccines were immunogenic against each vaccine strain 28 days after vaccination (Table 3). Against each vaccine strain, the SCRs varied from 49.4 to 73.8% and from 49.9 to 75.9% for IIV4-I and IIV4 groups, respectively.

Reactogenicity and safety

Adults (18–49 years)

The TVC of adults included 60 in both IIV4-I and IIV4 groups. Overall, the reactogenicity profiles were consistent between the IIV4-I and IIV4 vaccine groups.

Within the 7 days post-vaccination, pain was the most frequent solicited injection site AE in the IIV4-I group (41/60; 68.3%) and the IIV4 group (32/59; 54.2%), of which most reports were Grade 1 or 2 (Fig. 3). There was 1 report of Grade 3 pain in the IIV4-I group. Swelling was reported by 3.3% (2/60) and 6.8% (4/59) of the IIV4-I and IIV4 groups, respectively, and redness was reported by 1 adult in each vaccine group. Headache and fatigue were the most common solicited general AEs in the IIV4-I group (30/60; 50.0% and 32/60; 53.3%, respectively) and in the IIV4 group (16/59; 27.1% and 20/59; 33.9%, respectively).

Solicited ORS-like symptoms during 3 days post-vaccination were uncommon in both groups (Additional file 1).

During 21 days post-vaccination, ≥ 1 unsolicited AE was reported by 23.3% (14/60) of the IIV4-I and IIV4 groups, of which 3 (5.0%) and 2 (3.3%) reports, respectively, were Grade 3 in severity (Table 4). During the entire study period, there was 1 SAE in each group (each 1.7%), and there were 9 (15.0%) and 8 (13.3%) MAEs in the IIV4-I and IIV4 groups, respectively (Additional file 2 and Additional file 3). None of the SAEs or MAEs was

considered by the investigator to be causally-related to vaccination.

Children (3–17 years)

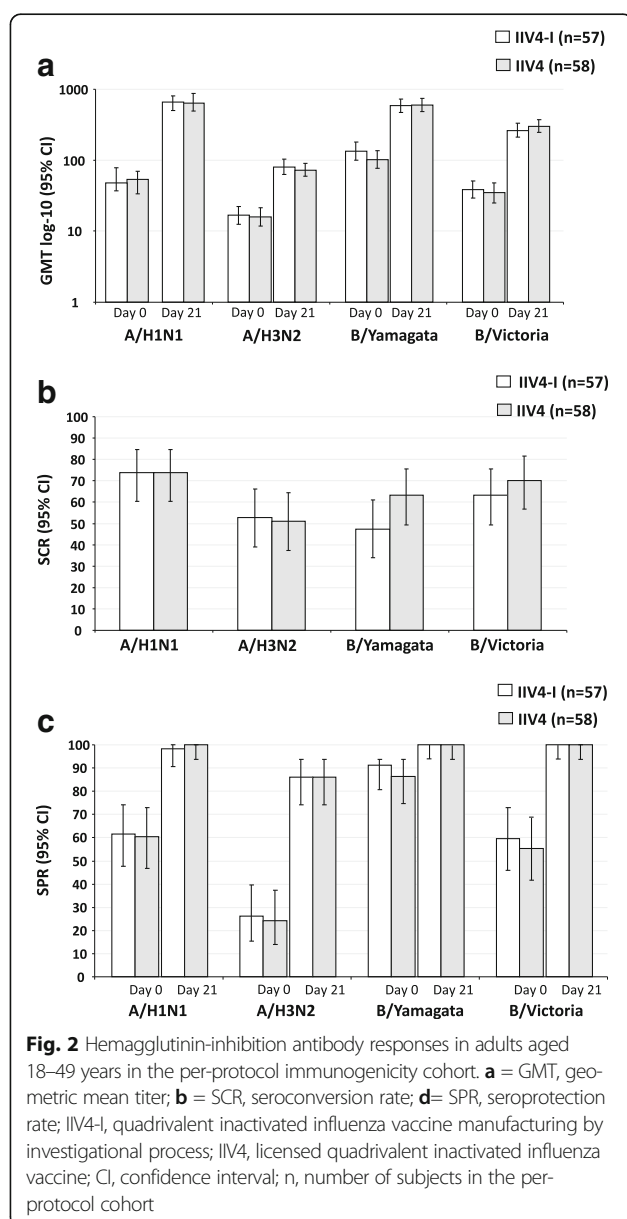
The TVC of children included 410 in the IIV4-I group and 411 in the IIV4 group. The reactogenicity profiles of IIV4-I and IIV4 were similar.

During 7-days post-vaccination overall, pain was the most frequent solicited injection site AE in the IIV4-I (252/410; 61.5%) and the IIV4 (264/410; 64.4%) groups, of which 14 (3.4%) and 21 (5.1%), respectively, were Grade 3 in severity (Fig. 4). Redness and swelling were reported by 129 (31.5%) and 109 (26.6%) children in the IIV4-I group, and 128 (31.2%) and 110 (26.8%) children in the IIV4 group.

Within 7 days post-vaccination overall, the most common solicited general AE in children aged 3–4 years was drowsiness in the IIV4-I group (16/70; 22.9%) and in the IIV4 group (11/72; 15.3%), of which 2 (2.8%) reports in the IIV4 group were Grade 3 in severity (Fig. 4). In children aged 3–4 years overall, there were 4 (5.7%) and 9 (12.5%) reports of fever ≥ 38.0 °C in the IIV4-I and IIV4 groups, respectively. Overall in children aged 5–17 years, fatigue was the most common solicited general AE in the IIV4-I group (97/340; 28.5%) and in the IIV4 group (101/338; 29.9%) (Fig. 4).

In the TVC, within 3 days post-vaccination the most common ORS-like symptoms were cough, red eyes, sore throat, and hoarseness (Additional file 1). In children aged 5–17 years, the RR for IIV4-I compared with IIV4 for myalgia within 7 days post-vaccination overall was 0.8 (95% CI: 0.58, 1.11; $p = 0.1914$).

In the TVC, 83 (20.2%) and 86 (20.9%) children in the IIV4-I and IIV4 groups, respectively, reported ≥ 1 AE during 28 days post-vaccination (Table 4). There were 12 (2.9%) and 8 (1.9%) children with Grade 3 AEs and 10 (2.4%) and 7 (1.7%) AEs, in the IIV4-I and IIV4 groups, respectively,



which were considered by the investigator to be causally-related to vaccination.

During the entire study period, there were 59 (14.4%) and 52 (12.7%) MAEs (most commonly upper respiratory tract infection, bronchitis, pharyngitis, and nasopharyngitis) in the IIV4-I and IIV4 groups, respectively (Additional file 3). Only 1 SAE, viral meningitis was observed in the IIV4-I group but it was not considered by the investigator to be vaccine-related (Additional file 2).

Infants (6–35 months)

The TVC of infants included 466 and 474 in the IIV4-I and IIV4 groups, respectively. Within 7 days post-vaccination overall, there were 72 (15.6%) and 69 (14.7%) reports of fever ≥ 38 °C in the IIV4-I and IIV4 groups,

Table 2 Immunogenic non-inferiority 28 days after last vaccination for IIV4 versus IIV4-I in children and infants in the per-protocol immunogenicity cohort

	IIV4-I Adjusted GMT	IIV4 Adjusted GMT	IIV4/IIV4-I Adjusted GMT ratio (95% CI)
Infants, 6–35 months	N = 431	N = 423 ^a	
A/H1N1	98.0	105.3	1.07 (0.90, 1.28)
A/H3N2	47.7	56.3	1.18 (1.00, 1.39)
B/Yamagata	99.2	106.4	1.07 (0.91, 1.27)
B/Victoria	32.2	37.7	1.17 (0.99, 1.38)
Children, 3–17 years	N = 403	N = 402	
A/H1N1	707.3	684.9	0.97 (0.85, 1.11)
A/H3N2	160.6	168.8	1.05 (0.94, 1.18)
B/Yamagata	496.0	509.4	1.03 (0.91, 1.16)
B/Victoria	240.8	250.4	1.04 (0.90, 1.21)

IIV4-I quadrivalent inactivated influenza vaccine manufacturing by investigational process, IIV4 licensed quadrivalent inactivated influenza vaccine, GMT geometric mean titer adjusted for age and pre-vaccination titers, CI confidence interval

^aA/H1N1, N = 424; N, number of subjects in the per-protocol cohort with both pre- and post-vaccination results available

respectively, and the RR for fever with IIV4-I versus IIV4 was 1.06 (0.75, 1.50; $p = 0.7868$). After dose 1, the RR of fever ≥ 38 °C for IIV4-I versus IIV4 was 0.94 (95% CI: 0.59, 1.50; $p = 0.885$) and 1.00 (95% CI: 0.63, 1.59; $p = 1.000$) after dose 2 (Table 5).

The most common solicited injection site AE within 7 days post-vaccination after dose 1 and dose 2 was pain in the IIV4-I group (69/462; 14.9%, and 47/420; 11.2%, respectively) and IIV4 group (77/470; 16.4%, and 48/421; 11.4%, respectively) (Fig. 5). After dose 1, redness and swelling were reported by 88 (19.0%) and 33 (7.1%) of the IIV4-I group, and 86 (18.3%) and 42 (8.9%) of the IIV4 group. After dose 2, redness and swelling were reported by 61 (14.5%), and 32 (7.6%) of the IIV4-I group, and 66 (15.7%) and 27 (6.4%) of the IIV4 group. Grade 3 local events were uncommon. After dose 1 and 2, the most common solicited general AE was irritability/fussiness in the IIV4-I group (124/462; 26.8% and 87/420; 20.7%), and in the IIV4 group (96/470; 20.4% and 87/421; 20.7%). The most common solicited symptoms of ORS-like within 3 days post-vaccination overall was cough in the IIV4-I group (73/462; 15.8%) and in the IIV4 group (85/470; 18.1%) (Additional file 1).

During 28 days post-vaccination, 243 (52.1%) and 262 (55.3%) of participants in the IIV4-I and IIV4 groups reported ≥ 1 unsolicited AE, of which 33 (7.1%) and 31 (6.5%), were Grade 3 in severity (Table 4).

During the entire study period, there were 235 (50.4%) and 252 (53.2%) MAEs in the IIV4-I and IIV4 groups, which were most commonly upper respiratory tract infection, bronchitis, and gastroenteritis (Additional file 3).

Table 3 Hemagglutinin-inhibition antibody titers in children and infants in the per-protocol immunogenicity cohort

Strain & cohort		Days	Seropositive n/N; % (95% CI)		GMT value (95% CI)		SPR n/N; % (95% CI)		SCR n/N; % (95% CI)	
			IIV4-I	IIV4	IIV4-I	IIV4	IIV4-I	IIV4	IIV4-I	IIV4
A/H1N1	Children	0	354/403; 87.8 (84.2, 90.9)	364/402; 90.5 (87.3, 93.2)	80.2 (69.2, 93.0)	87.7 (76.1, 101.0)	308/403; 76.4 (72.0, 80.5)	314/402; 78.1 (73.7, 82.1)	–	–
		56 or 28 ^a	402/403; 99.8 (98.6, 100)	401/402; 99.8 (98.6, 100)	698.0 (629.6, 773.9)	694.1 (625.8, 769.7)	393/403; 97.5 (95.5, 98.8)	395/402; 98.3 (96.4, 99.3)	274/403; 68.0 (63.2, 72.5)	269/402; 66.9 (62.1, 71.5)
	Infants	0	109/431; 25.3 (21.3, 29.7)	111/424; 26.2 (22.1, 30.6)	11.1 (9.6, 12.8)	11.2 (9.7, 12.9)	84/431; 19.5 (15.9, 23.5)	83/424; 19.6 (15.9, 23.7)	–	–
		56 or 28 ^a	406/432; 94.0 (91.3, 96.0)	408/427; 95.6 (93.1, 97.3)	97.5 (82.1, 115.7)	105.5 (88.2, 126.1)	303/432; 70.1 (65.6, 74.4)	289/427; 67.7 (63.0, 72.1)	287/431; 66.6 (61.9, 71.0)	275/424; 64.9 (60.1, 69.4)
A/H3N2	Children	0	346/403; 85.9 (82.1, 89.1)	345/402; 85.8 (82.0, 89.1)	38.9 (34.6, 43.8)	41.9 (37.1, 47.3)	245/403; 60.8 (55.8, 65.6)	252/402; 62.7 (57.8, 67.4)	–	–
		56 or 28 ^a	400/403; 99.3 (97.8, 99.8)	401/402; 99.8 (98.6, 100)	158.2 (143.7, 174.2)	171.4 (156.3, 188.0)	377/403; 93.5 (90.7, 95.7)	378/402; 94.0 (91.2, 96.1)	192/403; 47.6 (42.7, 52.6)	183/402; 45.5 (40.6, 50.5)
	Infants	0	79/431; 18.3 (14.8, 22.3)	91/423; 21.5 (17.7, 25.7)	7.5 (6.8, 8.2)	8.4 (7.5, 9.3)	55/431; 12.8 (9.8, 16.3)	67/423; 15.8 (12.5, 19.7)	–	–
		56 or 28 ^a	388/432; 89.8 (86.6, 92.5)	403/427; 94.4 (91.8, 96.4)	45.2 (39.0, 52.3)	59.9 (51.7, 69.4)	232/432; 53.7 (48.9, 58.5)	259/427; 60.7 (55.8, 65.3)	217/431; 50.3 (45.5, 55.2)	236/423; 55.8 (50.9, 60.6)
B/Yamagata	Children	0	325/403; 80.6 (76.4, 84.4)	333/402; 82.8 (78.8, 86.4)	58.1 (49.7, 68.0)	70.8 (60.4, 83.0)	266/403; 66.0 (61.2, 70.6)	281/402; 69.9 (65.2, 74.3)	–	–
		56 or 28 ^a	403/403; 100 (99.1, 100)	401/402; 99.8 (98.6, 100)	479.0 (434.1, 528.5)	527.6 (475.5, 585.3)	396/403; 98.3 (96.5, 99.3)	395/402; 98.3 (96.4, 99.3)	273/403; 67.7 (62.9, 72.3)	268/402; 66.7 (61.8, 71.3)
	Infants	0	105/431; 24.4 (20.4, 28.7)	99/423; 23.4 (19.4, 27.7)	8.3 (7.5, 9.1)	7.9 (7.2, 8.6)	53/431; 12.3 (9.3, 15.8)	49/423; 11.6 (8.7, 15.0)	–	–
		56 or 28 ^a	415/432; 96.1 (93.8, 97.7)	409/427; 95.8 (93.4, 97.5)	100.8 (87.8, 115.8)	105.4 (91.8, 121.0)	329/432; 76.2 (71.9, 80.1)	331/427; 77.5 (73.3, 81.4)	318/431; 73.8 (69.4, 77.9)	321/423; 75.9 (71.5, 79.9)
B/Victoria	Children	0	285/403; 70.7 (66.0, 75.1)	287/402; 71.4 (66.7, 75.8)	27.3 (23.8, 31.3)	28.8 (25.0, 33.1)	192/403; 47.6 (42.7, 52.6)	195/402; 48.5 (43.5, 53.5)	–	–
		56 or 28 ^a	398/403; 98.8 (97.1, 99.6)	394/402; 98.0 (96.1, 99.1)	237.6 (210.4, 268.3)	253.7 (222.7, 289.1)	375/403; 93.1 (90.1, 95.3)	374/402; 93.0 (90.1, 95.3)	285/403; 70.7 (66.0, 75.1)	287/402; 71.4 (66.7, 75.8)
	Infants	0	30/431; 7.0 (4.7, 9.8)	30/423; 7.1 (4.8, 10.0)	5.7 (5.4, 6.1)	5.7 (5.4, 6.1)	17/431; 3.9 (2.3, 6.2)	16/423; 3.8 (2.2, 6.1)	–	–
		56 or 28 ^a	359/432; 83.1 (79.2, 86.5)	366/427; 85.7 (82.0, 88.9)	32.1 (28.1, 36.7)	38.0 (33.2, 43.5)	214/432; 49.5 (44.7, 54.4)	217/427; 50.8 (46.0, 55.7)	213/431; 49.4 (44.6, 54.2)	211/423; 49.9 (45.0, 54.8)

Children, 3–17 years; infants, 6–35 months; IIV4-I, quadrivalent inactivated influenza vaccine manufactured by investigational process; IIV4, licensed quadrivalent inactivated influenza vaccine; CI, confidence interval; GMT, geometric mean titer; SCR, seroconversion rate; SPR, seroprotection rate
n, number of subjects fulfilling immunogenicity definition; N, number of subjects in the per-protocol cohort with results available

^a28 days after final vaccination, i.e. Day 28 in primed subjects or Day 56 in unprimed subjects

There were 7 (1.5%) and 11 (2.3%) SAEs in the IIV4-I and IIV4 groups none of which were considered by the investigator to be vaccine-related (Additional file 2). There was a report of febrile seizure for 1 infant in the IIV4 group which occurred 31 days after study vaccination and concomitantly with an adenovirus infection that was not considered by the investigator to be causally-related to vaccination.

Children aged < 5 years

Cases of fever ≥ 38.0 °C within 2 days post-vaccination in children aged <5 years were reported in 5.3% ($n = 28$) of the IIV4-I group and 5.7% ($n = 31$) of the IIV4 group resulting in a RR (95% CI) of 0.92 (0.53, 1.59; $p = 0.8507$). There were 4 and 1 reports of fever > 39.0 °C within 2 days post-vaccination in the IIV4-I and IIV4 groups,

respectively resulting in a RR for IIV4-I versus IIV4 of 4.08 (0.40, 200.69; $p = 0.3635$).

Discussion

The need to test the impact of manufacturing changes in clinical trials should be based on a careful risk assessment of the changes to the product and a detailed evaluation of the comparability of critical quality attributes. Changes to the inactivation process or other critical process steps, or changes that require modification of the product-release specifications are more likely to require clinical evaluation than other changes that do not affect critical process steps, critical quality attributes or specification limits. This Phase III, double-blind, multinational study was conducted to assess the immunogenicity and safety of a inactivated quadrivalent influenza vaccine manufactured by an investigational

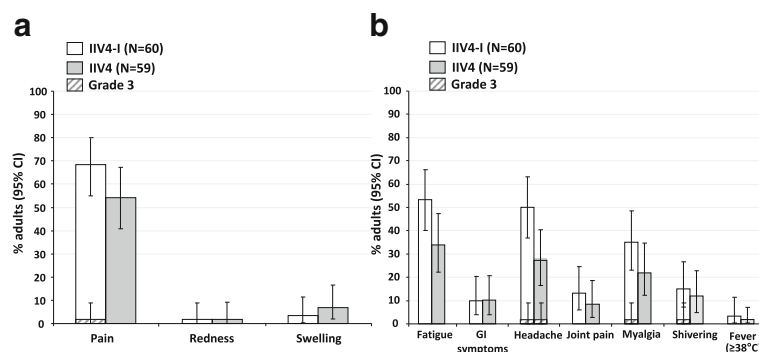


Fig. 3 Solicited injection-site adverse events (a) and general adverse events (b) in adults aged 18–49 years in the total vaccinated cohort. IIV4-I, quadrivalent inactivated influenza vaccine manufacturing by investigational process; IIV4, licenced quadrivalent inactivated influenza vaccine; CI, confidence interval; GI, gastrointestinal; N, number of subjects in the in the total vaccinated cohort who returned diary cards

process (IIV4-I) to ensure it is suitable to replace the vaccine manufactured by the current licensed process (IIV4).

The study showed that the reactogenicity and safety profile of IIV4-I and IIV4 were similar in each age cohort. The immunogenicity analyses showed that antibody titers against each vaccine strain fulfilled the definition of non-inferiority for IIV4-I versus IIV4 in infants and in children, and that GMTs, SCRs, and SPRs were similar between vaccine groups in each age cohort. In adults, both vaccines were immunogenic against all vaccine strains, although

SCRs against H3N2 were lower than the other strains in both vaccine groups.

Influenza vaccines are only moderately immunogenic in infants and young children who have had limited previous exposure to vaccines and viruses such that two doses of vaccine are recommended in influenza vaccine-naïve children aged ≤ 9 years to achieve antibody titers that are considered protective [32]. There are no immunogenic thresholds specified by regulatory authorities as a surrogate of protection against influenza in children. As well as demonstrating immunogenic non-inferiority at 28 days after the

Table 4 Global summary of unsolicited adverse events in adults, children, and infants in the total vaccinated cohort

	Infants 6–35 months		Children 3–17 years		Adults 18–49 years	
	IIV4-I N = 466	IIV4 N = 474	IIV4-I N = 410	IIV4 N = 411	IIV4-I N = 60	IIV4 N = 60
Unsolicited AEs for 21 days (adults) or 28 days (infants & children) post-last vaccination						
≥ 1 AE, n (%)	243 (52.1)	262 (55.3)	83 (20.2)	86 (20.9)	14 (23.3)	14 (23.3)
≥ 1 Grade 3 AE, n (%)	33 (7.1)	31 (6.5)	12 (2.9)	8 (1.9)	3 (5.0)	2 (3.3)
≥ 1 AE causally-related to vaccination, n (%)	6 (1.3)	3 (0.6)	10 (2.4)	7 (1.7)	2 (3.3)	1 (1.7)
≥ 1 Grade 3 AE causally-related to vaccination, n (%)	1 (0.2) [bronchitis]	0	1 (0.2) [axillary pain]	1 (0.2) [injection site pustule]	0	0
MAEs for entire study ^a						
≥ 1 MAE, n (%)	235 (50.4)	252 (53.2)	59 (14.4)	52 (12.7)	9 (15.0)	8 (13.3)
≥ 1 Grade 3 MAE, n (%)	35 (7.5)	29 (6.1)	7 (1.7)	6 (1.5)	3 (5.0)	1 (1.7)
≥ 1 MAE causally-related to vaccination, n (%)	2 (0.4)	0	2 (0.5)	0	0	0
≥ 1 Grade 3 MAE causally-related to vaccination, n (%)	1 (0.2) [bronchitis]	0	0	0	0	0
SAEs for entire study ^a						
≥ 1 SAE, n (%)	7 (1.5)	11 (2.3)	1 (0.2)	0	1 (1.7)	1 (1.7)
≥ 1 SAE causally-related to vaccination, n (%)	0	0	0	0	0	0

IIV4-I quadrivalent inactivated influenza vaccine manufacturing by investigational process, IIV4 licensed quadrivalent inactivated influenza vaccine, AE adverse event; MAE, medically-attended adverse event, SAE serious adverse event

N, number of subjects with ≥ 1 vaccine dose; n, number of subjects reporting the event

^aincluding the allowed visit interval of up to 23 days post-vaccination for the adults and up to 42 days post-last vaccination for the children

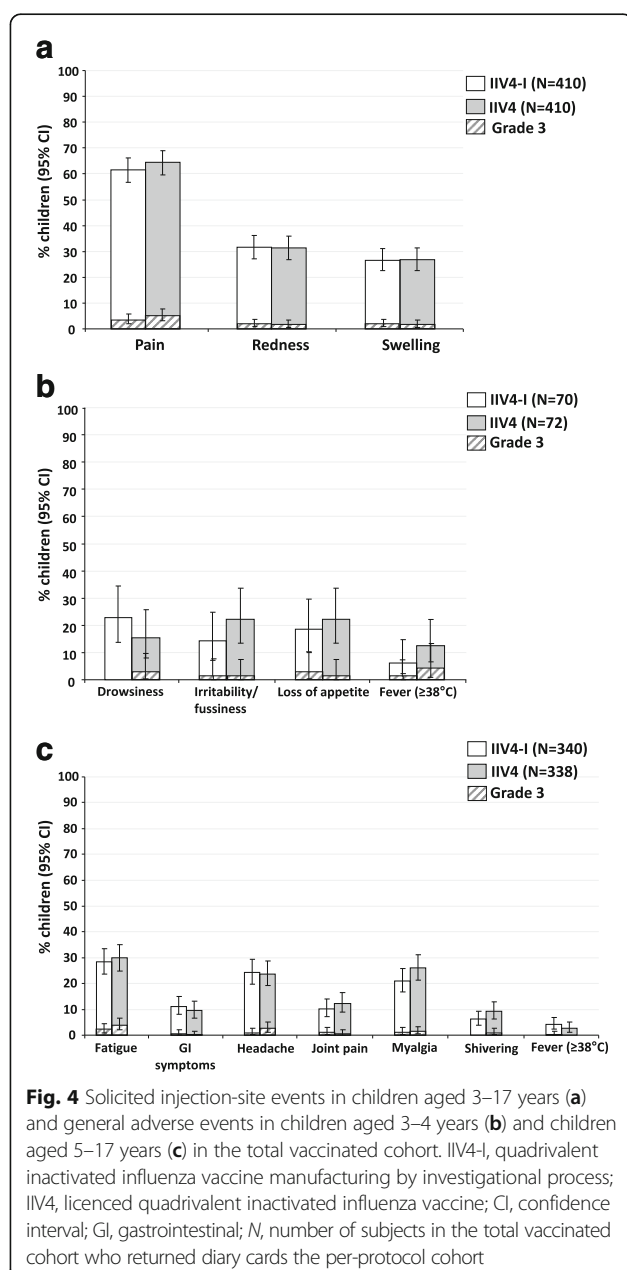


Table 5 Relative risk of fever ≥ 38.0 °C for IIV4-I versus IIV4, within 7 days post-vaccination, in infants 6–35 months in the total vaccinated cohort

Axillary temperature, °C	IIV4-I n/N; %	IIV4 n/N; %	IIV4-I/IIV4 RR (95% CI)	p-value
Dose 1 ≥ 38.0	39/462; 8.4	42/ 470; 8.9	0.94 (0.59, 1.50)	0.8851
Dose 2 ≥ 38.0	40/420; 9.5	40/421; 9.5	1.00 (0.63, 1.59)	1.000
Overall ≥ 38.0	72/462; 15.6	69/470; 14.7	1.06 (0.75, 1.50)	0.7868

IIV4-I quadrivalent inactivated influenza vaccine manufacturing by investigational process, IIV4 licensed quadrivalent inactivated influenza vaccine, RR relative risk, N, number of subjects with ≥ 1 vaccine dose and returned diary cards; n, number of subjects reporting the event

vaccination series, we observed robust antibody responses in infants and children. In children who received IIV4-I, SCRs were 47.6–70.7%, and in infants who received IIV4-I, SCRs were 49.4–73.8%.

The safety and reactogenicity evaluations used conventional endpoints but focused on the incidence of fever and of signs and symptoms of ORS because both outcomes have been associated with manufacturing process changes in the past [33–36]. For example, the increased prevalence of febrile convulsions in children aged <5 years in Australia and New Zealand who received *Fluvax* (CSL Biotherapies) in 2010 demonstrated the potential for alterations in the safety profile of vaccines from season to season and between vaccine brands [34, 35]. The increased pyrogenicity for *Fluvax* versus other IIV3s was thought to be associated with the different manufacturing processes used by CSL Biotherapies than in the other IIV3s [34, 35, 37]. ORS was first described as an influenza vaccine-associated AE in Canada during the 2000/01 influenza vaccination campaign, and was linked to the domestically-produced IIV3 which contained unsplit and aggregated influenza virions at higher than expected levels [33, 36]. The symptoms of ORS usually present within 24 h of vaccination and resolve within 72 h of onset, and can include bilateral red eyes, facial oedema, and respiratory symptoms such as sore throat, cough, and wheezing. In our study, in the 6–35 months cohort, fever ≥ 38 °C within 7 days post-vaccination was selected as an objective comparative measure of reactogenicity between the vaccines. In the infant population overall, the incidence of fever ≥ 38 °C was 15.6% and 14.7% in the IIV4-I and IIV4 groups, respectively, and the RR for post-vaccination fever ≥ 38 °C for IIV4-I/IIV4 was 1.06 (95% CI: 0.75, 1.50). In children aged 6 months– <5 years, within 2 days post-vaccination there were 4 (0.8%) reports and 1 (0.2%) report of Grade 3 fever in the IIV-I and IIV4 groups, respectively; the observed RR (4.08) was due to the very low incidence. There were no reports of febrile convulsion considered by the investigator to be causally-related to vaccination. Within 3 days after vaccination, cough was the most reported ORS-like symptom in the IIV4-I and IIV4 groups in infants (15.8% and 18.1%, respectively) and children (9.5% and 9.5%, respectively). In adult the most reported ORS-like symptoms in the IIV4-I and the IIV4 groups were sore throat (6.7% and 3.4%, respectively) and cough (5.0% and 3.4%, respectively). The non-specific nature of the ORS case definition presents significant limitations. However, the data collected in this study indicates that there is no increase in the incidence of ORS-like symptoms with the use of IIV4-I compared to IIV4.

During the post-vaccination period(s) in infants, the most common injection-site AE was pain, which was reported in about 20% of infants overall, and the most common general AE was fussiness, which was reported in about 30% of infants overall. The most frequent unsolicited AEs were

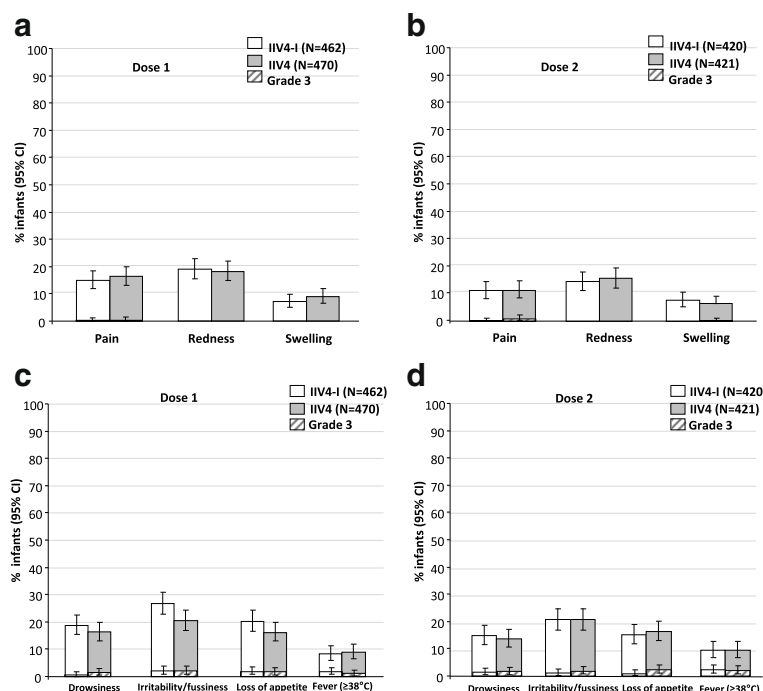


Fig. 5 Solicited injection-site adverse events after the first (a) and second (b) dose, and general adverse events after the first (c) and second dose (d) in infants aged 6–35 months in the total vaccinated cohort. IIV4-I, quadrivalent inactivated influenza vaccine manufacturing by investigational process; IIV4, licenced quadrivalent inactivated influenza vaccine; CI, confidence interval; N, number of subjects in the total vaccinated cohort who returned diary cards

upper respiratory tract illnesses, such as nasopharyngitis and cough. The reactogenicity and safety profile of both vaccines was consistent with previous studies of infants who received GSK's IIV4s manufactured in Dresden or Québec [9, 16, 18, 38, 39]. In children, the most frequent injection-site AE in both vaccine groups was pain, and the reactogenicity and safety profiles of IIV4-I and IIV4 overall were consistent with previous observations in vaccine-primed and vaccine-unprimed children in the same age range who received IIV4 manufactured in Dresden or Québec, and with children aged 3–8 years in the efficacy study of IIV4 (Québec), versus non-influenza vaccine control [9, 16].

The main limitation of the study was that HI antibody levels are a surrogate outcome for clinical protection against influenza infections, and in children and infants there are no surrogate thresholds defined. However, HI antibody levels were consistent between the IIV4-I and IIV4 vaccines, and both vaccines elicited immune responses at levels considered to be protective in adults [40].

Conclusion

In conclusion, the study showed that in adults, children, and infants, IIV4-I was immunogenic with a reactogenicity and safety profile that was similar to the licensed IIV4. These results suggest the investigational manufacturing

process used to IIV4-I is suitable to replace the current licensed process.

Trademarks statement

Influsplit Tetra, *Fluarix Tetra* and *Fluarix Quadrivalent* are trademarks of the GSK group of companies.

Additional files

Additional file 1: Solicited oculo-respiratory syndrome-like symptoms within the 3-day post vaccination period in infants (6–35 months), children (3–17 years), and adults (18–49 years) (total vaccinated cohort). (PDF 378 kb)

Additional file 2: Serious adverse events in infants (6–35 months), children (3–17 years), and adults (18–49 years) during the entire study (total vaccinated cohort). (PDF 362 kb)

Additional file 3: Medically-attended adverse events in and adults (18–49 years), children (3–17 years), and infants (6–35 months), during the entire study (total vaccinated cohort). (PDF 445 kb)

Abbreviations

AE: Solicited injection-site adverse event; CBER: Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research; CI: Confidence interval; GI: Gastrointestinal; GMT: Geometric mean titres; HI: Hemagglutination-inhibition; IIV3: Inactivated trivalent influenza vaccine; IIV4: Inactivated quadrivalent influenza vaccine; IIV4-I: Inactivated quadrivalent influenza vaccine investigational; ISRC: Internal Safety Review Committee; MAE: Medically-attended adverse events; ORS: Oculo-respiratory syndrome; RR: Relative risk; SAE: Serious adverse events; SCR: Seroconversion rate; SPR: Seroprotection rate; TVC: Total vaccinated cohort; WHO: World Health Organization

Acknowledgements

The authors are indebted to the participating study volunteers and their parents, clinicians, nurses and laboratory technicians at the study sites. In particular we thank Jerzy Brzostek, Matthew Davis, Maria Mendez, Renata Ruzkova, Daniel Drazan, Richard Ohnmacht, Terry Poling and Stephan Sharp who provided support and cared for study participants. The authors also thank the teams of GSK, in particular Florence Bieswal (Study Delivery Lead) and Riju Ray for his review. Finally, the authors thank Annick Moon (Moon Medical Communications Ltd., UK, on behalf of GSK) for providing medical writing services, and Bruno Dumont and Véronique Gochet (Business and Decision Life Sciences, on behalf of GSK) for editorial assistance and manuscript coordination.

Funding

GlaxoSmithKline Biologicals SA funded this study and was involved in all stages of study conduct, including analysis of the data. GlaxoSmithKline Biologicals SA also took in charge all costs associated with the development and publication of this manuscript.

Availability of data and materials

The results summary for this study (NCT02207413) is available on clinicaltrials.gov (trial registration date: August 4, 2014), the default register for GSK Human Subject Research. For interventional studies that evaluate our medicines, anonymized patient-level data will be made available to independent researchers, subject to review by an independent panel, at www.clinicalstudydatarequest.com within six months of publication. To protect the privacy of patients and individuals involved in our studies, GSK does not publically disclose patient-level data. The study adheres to Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) guidelines.

Authors' contributions

CC, MD, PS, EN, PL, VK and BI were involved in the conception or the design of the study. JGS, KZ, AC, PMT, MM, FMT, FT, MH, TS, UB, JM, ISK and HS participated in the acquisition of the data. CC, MD, JGS, PL, VK and BI were involved in the analyses or interpretation of the data. All authors had full access to the data, were involved in the revising of the manuscript for important intellectual content, gave final approval before submission, and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval and consent to participate

All adults or a parent/guardian of children provided written informed consent for participation, and children were required to assent if capable. The study was conducted in accordance with the Good Clinical Practice guidelines, the Declaration of Helsinki and applicable local regulations. All study documents were approved by the appropriate Institutional Review Boards (Bangladesh: icddr;b; Czech Republic: Etická komise Fakulty nemočnice Olomouc a Lekarske fakulty UP v Olomouci [68/14 MEK 9]; France: CPP SUD MEDITERRANEE V [14.045]; Germany: Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg [129/14 ff]; Poland: Komisja Bioetyczna przy Okręgowej Izbie Lekarskiej; Spain: Comité Ético de Investigación Clínica Área de Salud de Burgos y Soria; United States: Chesapeake IRB).

Competing interests

Bruce L. Innis, Varsha K. Jain and Ping Li were employed by the GSK group of companies at the time of the study. Bruce L. Innis is currently employed by PATH. Varsha K. Jain is currently employed by the Bill and Melinda Gates Foundation. Ping Li is currently employed by Pfizer. Carine Claeys, Mamadou Drame, Peter Schu and Elisabeth Neumeier are employed by the GSK group of companies. Carine Claeys, Peter Schu, Elisabeth Neumeier, Ping Li, Varsha K. Jain, Bruce L. Innis hold shares in the GSK group of companies. Federico Martínón-Torres reports investigator fees to his institution from the GSK group of companies, during the conduct of the study; grants to his institution from the GSK group of companies, SPMSD, MERCK and PFIZER, as well as personal fees from PFIZER, outside the submitted work. Franck Thollot reports personal fees from the GSK group of companies, during the conduct of the study; personal fees from the GSK group of companies and non-financial support from Sanofi Aventis, outside the submitted work. Michael Horn reports personal fees from the GSK group of companies, during the conduct of the study. Tino F. Schwarz reports personal fees from the GSK group of companies, outside the submitted work. José M. Merino reports personal fees and non-financial support

from the GSK group of companies, during the conduct of the study; personal fees from PFIZER and SANOFI-PASTEUR, outside the submitted work. José García-Sicilia reports fees to his institution from the GSK group of companies, during the conduct of the study. Khalequ Zaman, Alfonso Carmona, Phu My Tran, Mariano Miranda, Ulrich Behre, Iwona Sadowska-Krawczenko and Henryk Szymański declare no conflicts of interest.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹GSK, Clinical Research and Development, Wavre, Belgium. ²GSK, Clinical Evidence Generation (CEG), King of Prussia, PA, USA. ³Hospital Universitario HM Sanchinarro, Clinical Investigation in Vaccines Unit, Madrid, Spain. ⁴icddr;b, MCHD Administration, Dhaka, Bangladesh. ⁵Instituto Hispalense de Pediatría, Pediatría, Sevilla, Spain. ⁶Cabinet Médical Tran, Pédiatrie, Nice, France. ⁷Antequera Hospital, UGC de Pediatría, Málaga, Spain. ⁸Department of Pediatrics, Santiago de Compostela, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Translational Pediatrics and Infectious Diseases, Galicia, Spain. ⁹Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago and Universidade de Santiago de Compostela (USC), Grupo de Investigación en Genética, Vacunas, Infecciones y Pediatría (GENVIP), Galicia, Spain. ¹⁰Association Française de Pédiatrie Ambulatoire (AFPA), Pédiatrie, Essey-les-Nancy, France. ¹¹Dr. med. Michael R. Horn Office, Pediatrics, Schoenau am Koenigssee, Germany. ¹²Klinikum Würzburg Mitte, Standort Juliusospital, Central Laboratory and Vaccination Centre, Würzburg, Germany. ¹³Ulrich Behre, Practice, Kehl, Germany. ¹⁴Pediatric Department, Hospital Universitario de Burgos, Burgos, Spain. ¹⁵Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Nicolaus Copernicus University in Torun, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Torun, Poland. ¹⁶Department of Neonatology, University Hospital No 2, Bydgoszcz, Poland. ¹⁷NZOZ, Praktyka Lekarska, Oborniki Śląskie, Poland. ¹⁸GSK, Global Industrial Operations, Dresden, Germany. ¹⁹Present Address: Pfizer VRD, Collegeville, PA, USA. ²⁰GSK, Clinical Research and Development, King of Prussia, PA, USA. ²¹Present Address: Bill and Melinda Gates Foundation, Seattle, WA, USA. ²²Present Address: PATH, Washington, DC, USA.

Received: 6 September 2017 Accepted: 3 April 2018

Published online: 18 April 2018

References

- United States Centers for Disease Control and Prevention.: Seasonal influenza activity surveillance reports: 2000-2001 to 2010-2011 seasons. <http://www.cdc.gov/flu/weekly/pastreports.htm>. Accessed August 2017.
- Belongia EA, Kieke BA, Donahue JG, Greenlee RT, Balish A, Foust A, Lindstrom S, Shay DK. Effectiveness of inactivated influenza vaccines varied substantially with antigenic match from the 2004-2005 season to the 2006-2007 season. *J Infect Dis*. 2009;199(2):159-67.
- Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, Woo JC, Wu X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. *Vaccine*. 2010;28(9):2149-56.
- World Health Organization.: Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012-2013 northern hemisphere influenza season. 2012. http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201202_recommendation.pdf. Accessed August 2017.
- Beran J, Peeters M, Dewe W, Raupachova J, Hobzova L, Devaster JM. Immunogenicity and safety of quadrivalent versus trivalent inactivated influenza vaccine: a randomized, controlled trial in adults. *BMC Infect Dis*. 2013;13:224.
- Block SL, Falloon J, Hirschfield JA, Krilov LR, Dubovsky F, Yi T, Belshe RB. Immunogenicity and safety of a quadrivalent live attenuated influenza vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(7):745-51.
- Block SL, Yi T, Sheldon E, Dubovsky F, Falloon J. A randomized, double-blind noninferiority study of quadrivalent live attenuated influenza vaccine in adults. *Vaccine*. 2011;29(50):9391-7.
- Cadorna-Carlos JB, Nolan T, Borja-Tabora CF, Santos J, Montalban MC, de Looze FJ, Eizenberg P, Hall S, Dupuy M, Hutagalung Y, et al. Safety, immunogenicity, and lot-to-lot consistency of a quadrivalent inactivated influenza vaccine in children, adolescents, and adults: a randomized, controlled, phase III trial. *Vaccine*. 2015;33(21):2485-92.

9. Domachowske JB, Pankow-Culot H, Bautista M, Feng Y, Claeys C, Peeters M, Innis BL, Jain V. A randomized trial of candidate inactivated quadrivalent influenza vaccine versus trivalent influenza vaccines in children aged 3–17 years. *J Infect Dis*. 2013;207(12):1878–87.
10. Gorse GJ, Falsey AR, Ozol-Godfrey A, Landolfi V, Tsang PH. Safety and immunogenicity of a quadrivalent intradermal influenza vaccine in adults. *Vaccine*. 2015;33(9):1151–9.
11. Greenberg DP, Robertson CA, Landolfi VA, Bhaumik A, Senders SD, Decker MD. Safety and immunogenicity of an inactivated quadrivalent influenza vaccine in children 6 months through 8 years of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(6):630–6.
12. Greenberg DP, Robertson CA, Noss MJ, Blatter MM, Biedenbender R, Decker MD. Safety and immunogenicity of a quadrivalent inactivated influenza vaccine compared to licensed trivalent inactivated influenza vaccines in adults. *Vaccine*. 2013;31(5):770–6.
13. Haber P, Moro PL, Cano M, Lewis P, Stewart B, Shimabukuro TT. Post-licensure surveillance of quadrivalent live attenuated influenza vaccine United States, vaccine adverse event reporting system (VAERS), July 2013–June 2014. *Vaccine*. 2015;33(16):1987–92.
14. Jain VK, Chandrasekaran V, Wang L, Li P, Liu A, Innis BL. A historically-controlled phase III study in adults to characterize the acceptability of a process change for manufacturing inactivated quadrivalent influenza vaccine. *BMC Infect Dis*. 2014;14:133.
15. Kieninger D, Sheldon E, Lin WY, Yu CJ, Bayas JM, Gabor JJ, Esen M, Fernandez Roure JL, Narejos Perez S, Alvarez Sanchez C, et al. Immunogenicity, reactogenicity and safety of an inactivated quadrivalent influenza vaccine candidate versus inactivated trivalent influenza vaccine: a phase III, randomized trial in adults aged >=18 years. *BMC Infect Dis*. 2013;13:343.
16. Langley JM, Carmona Martinez A, Chatterjee A, Halperin SA, McNeil S, Reisinger KS, Aggarwal N, Huang LM, Peng CT, Garcia-Sicilia J, et al. Immunogenicity and safety of an inactivated quadrivalent influenza vaccine candidate: a phase III randomized controlled trial in children. *J Infect Dis*. 2013;208(4):544–53.
17. Pepin S, Donazzolo Y, Jambrecina A, Salamand C, Saville M. Safety and immunogenicity of a quadrivalent inactivated influenza vaccine in adults. *Vaccine*. 2013;31(47):5572–8.
18. Rodriguez Weber MA, Claeys C, Aranza Doniz C, Feng Y, Innis BL, Jain VK, Peeters M. Immunogenicity and safety of an inactivated quadrivalent and trivalent influenza vaccines in children 18–47 months of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(12):1262–9.
19. Sheldon EA, Jeanfreau R, Sliman JA, Charenkavanich S, Rousculp MD, Dubovsky F, Mallory RM. Immunogenicity of a quadrivalent Ann Arbor strain live attenuated influenza vaccine delivered using a blow-fill-seal device in adults: a randomized, active-controlled study*. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(6):1142–50.
20. Tinoco JC, Pavia-Ruz N, Cruz-Valdez A, Aranza Doniz C, Chandrasekaran V, Dewe W, Liu A, Innis BL, Jain VK. Immunogenicity, reactogenicity, and safety of inactivated quadrivalent influenza vaccine candidate versus inactivated trivalent influenza vaccine in healthy adults aged >=18 years: a phase III, randomized trial. *Vaccine*. 2014;32(13):1480–7.
21. Tsurudome Y, Kimachi K, Okada Y, Matsuura K, Ooyama Y, Ibaragi K, Kino Y, Ueda K. Immunogenicity and safety of an inactivated quadrivalent influenza vaccine in healthy adults: a phase II, open-label, uncontrolled trial in Japan. *Microbiol Immunol*. 2015.
22. Jain VK, Rivera L, Zaman K, Espos RA Jr, Sirivichayakul C, Quiambao BP, Rivera-Medina DM, Kerdpanich P, Ceyhan M, Dinleyici EC, et al. Vaccine for prevention of mild and moderate-to-severe influenza in children. *N Engl J Med*. 2013;369(26):2481–91.
23. Claeys C, Zaman K, Dbaibo G, Li P, Izu A, Kosalaraksa P, Rivera L, Acosta B, Arroba Basanta ML, Aziz A, et al. Prevention of vaccine-matched and mismatched influenza in children 6–35 months of age: a multinational randomized trial across five influenza seasons. *Lancet Child Adolescent Health*. 2018; in press.
24. United States Centers for Disease Control and Prevention. Influenza Vaccines — United States, 2014–15 Influenza Season. November 2014, <http://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/vaccines.htm>. Accessed August 2017.
25. European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza and vaccination. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/seasonal_influenza/vaccines/Pages/influenza_vaccination.aspx. Accessed August 2017.
26. Public Health Agency of Canada National Advisory Committee on Immunization. Statement on Seasonal Influenza Vaccine for 2014–2015 July 2014, <http://www.phac-aspc.gc.ca/naci-ccni/flu-grippe-eng.php>. Accessed August 2017.
27. Australian Government Therapeutic Drugs Administration. 2015 seasonal influenza vaccines. <https://www.tga.gov.au/media-release/2015-seasonal-influenza-vaccines>. July 2014. Accessed August 2017.
28. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014–2015 northern hemisphere influenza season. 20 February 2014, http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_15_north/en/. Accessed August 2017.
29. Grohskopf LA, Olsen SJ, Sokolow LZ, Bresee JS, Cox NJ, Broder KR, Karron RA, Walter EB. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) – United States, 2014–15 influenza season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014;63(32):691–7.
30. Hehme N, Künzel W, Petschke F, Türk G, Raderecht C, van Hoecke C, Sängler R. Ten years of experience with the trivalent split-influenza vaccine, Fluairix™. *Clin Drug Invest*. 2002;22(11):751–69.
31. Miettinen O, Nurminen M. Comparative analysis of two rates. *Stat Med*. 1985;4(2):213–26.
32. American Academy of Pediatrics. Recommendations for prevention and control of influenza in children, 2014–2015. *Pediatrics*. 2014;134(5):e1503–19.
33. Al-Dabbagh M, Lapphra K, Scheifele DW, Halperin SA, Langley JM, Cho P, Kollmann TR, Li Y, De Serres G, Fortuno ES 3rd, et al. Elevated inflammatory mediators in adults with oculorespiratory syndrome following influenza immunization: a public health agency of Canada/Canadian Institutes of Health Research influenza research network study. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(8):1108–14.
34. Armstrong PK, Dowse GK, Effler PV, Carcione D, Blyth CC, Richmond PC, Geelhoed GC, Mascaro F, Scully M, Weeramanthri TS. Epidemiological study of severe febrile reactions in young children in Western Australia caused by a 2010 trivalent inactivated influenza vaccine. *BMJ Open*. 2011;1(1):e000016.
35. Petousis-Harris H, Poole T, Booy R, Turner N. Fever following administration of two inactivated influenza vaccines—a survey of parents of New Zealand infants and children 5 years of age and under. *Vaccine*. 2011;29(16):2933–7.
36. Skowronski DM, Strauss B, De Serres G, MacDonald D, Marion SA, Naus M, Patrick DM, Kendall P. Oculo-respiratory syndrome: a new influenza vaccine-associated adverse event? *Clin Infect Dis*. 2003;36(6):705–13.
37. Maraskovsky E, Rockman S, Dyson A, Koernig S, Becher D, Morelli AB, Barnden M, Camuglia S, Bodle J, Vandenberg K et al. Scientific investigations into febrile reactions observed in the paediatric population following vaccination with a 2010 southern hemisphere trivalent influenza vaccine. *Vaccine* 2012, 30(51):7400–7406.
38. Langley JM, Wang LM, Aggarwal N, Bueso A, Chandrasekaran V, Cousin L, Halperin SA, Li P, Liu A, McNeil S, et al. Immunogenicity and Reactogenicity of an inactivated Quadrivalent influenza vaccine administered intramuscularly to children 6 to 35 months of age in 2012–2013: a randomized, double-blind, controlled, multicenter, multicountry, clinical trial. *J Pediatr Infect Dis*. 2014; <https://doi.org/10.1093/jpids/piu1098>. Epub.
39. Wang L, Chandrasekaran V, Domachowske J, Li P, Innis B, Jain V. Immunogenicity and safety of an inactivated Quadrivalent influenza vaccine in US children 6–35 months of age during 2013–2014: results from a phase II randomized trial. *J Pediatr Infect Dis*. 2015; Epub 16 July 2015.
40. Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J Hyg*. 1972;70(4):767–77.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

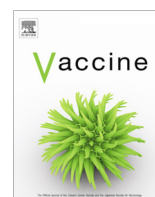
Learn more biomedcentral.com/submissions





Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Impact of tetanus-diphtheria-acellular pertussis immunization during pregnancy on subsequent infant immunization seroresponses: follow-up from a large randomized placebo-controlled trial



Kirsten P. Perrett^a, Scott A. Halperin^b, Terry Nolan^a, Alfonso Carmona Martínez^c, Federico Martínón-Torres^d, Jose García-Sicilia^e, Miia Virta^f, Otto G. Vanderkooi^g, Gian Vincenzo Zuccotti^h, Paolo Manzoniⁱ, Lusine Kostanyan^j, Nadia Meyer^k, Maria Angeles Ceregido^k, Brigitte Cheuvart^k, Sherine O. Kuriyakose^l, Zbynek Stranak^m, Jose M. Merino Arribasⁿ, María José Cilleruelo Ortega^o, Mariano Miranda-Valdivieso^p, Begoña Arias Novas^q, Jose Tomas Ramos Amador^r, Felix Omeñaca^s, Manuel Baca^t, Paola Giovanna Marchisio^u, Narcisa Mesaros^{k,*}

^a Murdoch Children's Research Institute and Melbourne School of Population and Global Health, University of Melbourne, Melbourne, Australia

^b Dalhousie University, Canadian Center for Vaccinology, Halifax, Canada

^c Instituto Hispalense de Pediatría, Sevilla, Spain

^d Translational Pediatrics and Infectious Diseases, Pediatrics Department, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela and Genetics, Vaccines and Pediatrics Research Group, University of Santiago de Compostela, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

^e Hospital Universitario Madrid Sanchinarro, Madrid, Spain

^f Tampere Vaccine Research Center, Tampere University, Tampere, Finland

^g Alberta Children's Hospital, University of Calgary, Alberta, Calgary, Canada

^h Ospedale dei Bambini Vittore Buzzi, and University of Milan, Milan, Italy

ⁱ Ospedale Ostetrico Ginecologico Sant'Anna, Turin, Italy and Department of Maternal-Infant -Pediatric Health, Hospital "Degli Infermi", Biella, Italy

^j Modis, C/O GSK, Wavre, Belgium

^k GSK, Wavre, Belgium

^l GSK, Bangalore, India

^m Institute for the Care of Mother and Child, Prague, Czech Republic

ⁿ Nuevo Hospital Universitario de Burgos, Burgos, Spain

^o Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Majadahonda, Spain

^p Hospital de Antequer, Antequer, Málaga, Spain

^q Hospital La Zarzuela, Aravaca, Spain

^r Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

^s Neonatología, Hospital La Paz, Madrid, Spain

^t Hospital Quiron Málaga, Andalucía, Málaga, Spain

^u Unità Pediatrica di Cure Altamente Intensive, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Lombardia, Milano, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 August 2019

Received in revised form 30 October 2019

Accepted 31 October 2019

Available online 24 November 2019

ABSTRACT

Background: Pertussis immunization during pregnancy results in high pertussis antibody concentrations in young infants but may interfere with infant immune responses to post-natal immunization.

Methods: This phase IV, multi-country, open-label study assessed the immunogenicity and safety of infant primary vaccination with DTaP-HepB-IPV/Hib and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine

Abbreviations: AE, adverse event; ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; CPS, capsular polysaccharide; DTaP-HepB-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b vaccine; ECL, electrochemiluminescence; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FHA, filamentous hemagglutinin; HBs, hepatitis B surface antigen; GMC, geometric mean concentration; GMT, geometric mean titer; Hib, *Haemophilus influenzae* type b; LLoQ, lower limit of quantitation; PCV13, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; PRN, pertactin; PRP, polyribosylribitol phosphate; PT, pertussis toxin; RCT, randomized controlled trial; SAE, serious adverse event; Tdap, diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine; TVC, total vaccinated cohort.

* Corresponding author at: GSK, Avenue Fleming 20, 1300 Wavre, Belgium.

E-mail addresses: kirsten.perrett@rch.org.au (K.P. Perrett), scott.halperin@dal.ca (S.A. Halperin), t.nolan@unimelb.edu.au (T. Nolan), alfonsocarmona@ihppediatrics.com (A. Carmona Martínez), federico.martinon.torres@sergas.es (F. Martínón-Torres), jgarcia-sicilia@telefonica.net (J. García-Sicilia), mii.virta@staff.uta.fi (M. Virta), ovanderk@ucalgary.ca (O.G. Vanderkooi), gianvincenzo.zuccotti@unimi.it (G.V. Zuccotti), lusine.x.kostanyan@gsk.com (L. Kostanyan), nadia.x.meyer@gsk.com (N. Meyer), maria-angeles.x.ceregido@gsk.com (M.A. Ceregido), brigitte.cheuvart@gsk.com (B. Cheuvart), sherine.o.kuriyakose@gsk.com (S.O. Kuriyakose), z.stranak@seznam.cz (Z. Stranak), mjose.cilleruelo@salud.madrid.org (M.J. Cilleruelo Ortega), mariano.miranda@andaluciajunta.es (M. Miranda-Valdivieso), barias@sanitas.es (B. Arias Novas), joseotomas.ramos@salud.madrid.org (J.T. Ramos Amador), pediatra@manuelbaca.com (M. Baca), paola.marchisio@unimi.it (P.G. Marchisio), narcisa.x.mesaros@gsk.com (N. Mesaros).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.104>

0264-410X/© 2019 GlaxoSmithKline Biologicals S.A. Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords:

Tdap vaccine

Pertussis

Maternal immunization

Blunting

Infants

(PCV13). Enrolled infants (6–14 weeks old) were born to mothers who were randomized to receive reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-three-component acellular pertussis vaccine (Tdap group) or placebo (control group) during pregnancy (27^{0/7}–36^{6/7} weeks' gestation) with crossover immunization postpartum. All infants received 2 or 3 DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 doses according to national schedules. Immunogenicity was assessed in infants pre- and 1 month post-primary vaccination. The primary objective was to assess seroprotection/vaccine response rates for DTaP-HepB-IPV/Hib antigens 1 month post-primary vaccination.

Results: 601 infants (Tdap group: 296; control group: 305) were vaccinated. One month post-priming, seroprotection rates were 100% (diphtheria; tetanus), $\geq 98.5\%$ (hepatitis B), $\geq 95.9\%$ (polio) and $\geq 94.5\%$ (Hib) in both groups. Vaccine response rates for pertussis antigens were significantly lower in infants whose mothers received pregnancy Tdap (37.5–77.1%) versus placebo (90.0–99.2%). Solicited and unsolicited adverse event rates were similar between groups. Serious adverse events occurred in 2.4% (Tdap group) and 5.6% (control group) of infants, none were vaccination-related.

Conclusions: Pertussis antibodies transferred during pregnancy may decrease the risk of pertussis infection in the first months of life but interfere with the infant's ability to produce pertussis antibodies, the clinical significance of which remains unknown. Safety and reactogenicity results were consistent with previous experience.

Clinical Trial Registration: ClinicalTrials.gov: NCT02422264.

© 2019 GlaxoSmithKline Biologicals S.A. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Despite comprehensive global infant immunization programs, pertussis (*Bordetella pertussis*) continues to cause high morbidity and mortality among infants <2 months of age who are too young to be vaccinated [1,2]. Several strategies to optimize pertussis control and protection during this susceptible period were pursued [3]; vaccination of pregnant women is the most commonly implemented.

Randomized controlled trials (RCTs) and prospective cohort studies have provided evidence that adult-formulation diphtheria-tetanus-acellular pertussis (Tdap) immunization during the second or third trimester of pregnancy results in high levels of pertussis antibodies in cord blood [4–10].

This maternal immunization strategy has been observed to provide 69%–93% effectiveness against pertussis disease in the first 2 or 3 months of life [11–19]. However, several studies have raised concerns that transplacentally acquired antibodies could interfere with the infant's immune response to pertussis and other antigens in the primary infant series (i.e., immunological interference or blunting) [4–8,10,20–23]. We evaluated the immunogenicity and safety of a childhood hexavalent diphtheria-tetanus-three-component acellular pertussis-hepatitis B virus-poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine (DTaP-HepB-IPV/Hib) co-administered with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in infants born to mothers given reduced-antigen-content Tdap vaccine during pregnancy or postpartum.

2. Methods

2.1. Study design and participants

This phase IV, multi-center, open-label, non-randomized trial with two parallel groups was conducted between 22 January 2016 and 7 March 2018 in Australia, Canada, Czech Republic, Finland, Italy and Spain. The trial (ClinicalTrials.gov: NCT02422264) was performed according to the principles of Good Clinical Practice, the Declaration of Helsinki and applicable regulations. The centers' Institutional Review Boards and/or Ethics Committees (Supplementary material) approved the protocol, informed consent form and other study-related documents. An independent data monitoring committee oversaw the participants' safety.

We enrolled healthy infants 6–14 weeks old whose mothers had participated in a phase IV, observer-blind, randomized, placebo-controlled maternal immunization trial (NCT02377349) in which they received reduced-antigen-content Tdap vaccine or placebo at 27^{0/7}–36^{6/7} weeks' gestation and crossover administration within 72 h postpartum [24]. Infants born prematurely (<37 weeks' gestation, but after 27 weeks' gestation) could be enrolled if they were medically stable. Exclusion criteria included a history of diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B, polio, Hib or pneumococcal diseases; vaccination against any of these diseases since birth (except hepatitis B vaccination); administration of long-acting immune-modifying drugs, any chronic drug therapy or immunoglobulins and/or blood products; and immunosuppressive conditions. The Supplementary methods provide detailed inclusion and exclusion criteria. The parent(s) or legally acceptable representative(s) of each participant provided written informed consent before enrollment.

The infants' group allocation was determined by the intervention their mothers received during pregnancy (Tdap or placebo) in the maternal immunization trial [24]. The study had an open-label design because all infants received the same vaccines, but investigators and study staff involved in the infants' care and responsible for evaluating the study endpoints and laboratory testing remained blinded to the treatment allocation of the infants' mothers.

2.2. Procedures

Infants received 2 or 3 doses of DTaP-HepB-IPV/Hib (*Infanrix Hexa*, GSK) co-administered with PCV13 (*Prevnar 13*, Pfizer Inc.) at 2 and 4 months; or 3 and 5 months; or 2, 4 and 6 months; or 2, 3 and 4 months of age, according to the different countries' routine primary immunization schedules (Fig. 1). In some countries/regions with a 3-dose primary DTaP-HepB-IPV/Hib schedule, PCV13 was given as a 2-dose schedule at 2 and 4 months of age. DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 were injected intramuscularly in opposite thighs. PCV13 contains capsular polysaccharides of 13 pneumococcal serotypes (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23), each conjugated to the diphtheria toxoid variant CRM₁₉₇. The composition of both vaccines is provided in the Supplementary methods.

Blood samples were collected before the first DTaP-HepB-IPV/Hib dose (2 mL, pre-primary) and 1 month (allowed interval: 21–48 days) after the last DTaP-HepB-IPV/Hib dose (5 mL, post-

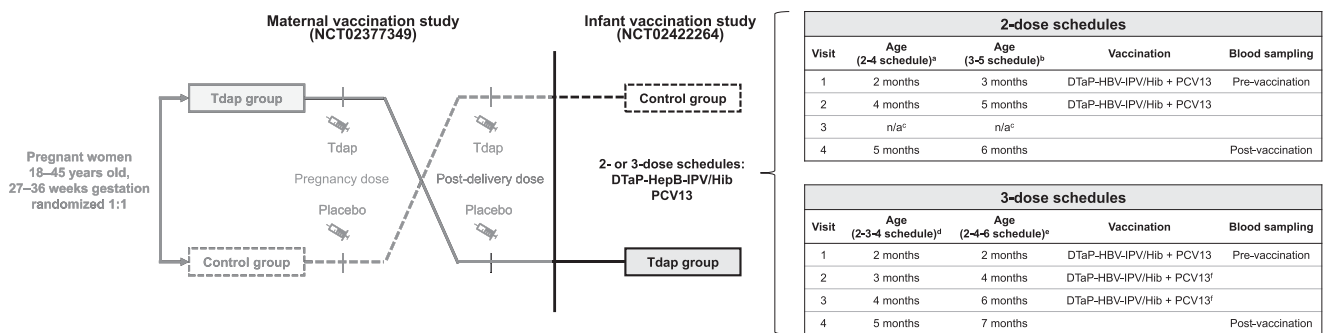


Fig. 1. Study design. Abbreviations: DTaP-HepB-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b vaccine; PCV13, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; Tdap, reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine. ^a2-dose DTaP-HepB-IPV/Hib primary schedule at 2 and 4 months of age administered in Spain. ^b2-dose DTaP-HepB-IPV/Hib primary schedule at 3 and 5 months of age administered in Finland and Italy. ^cOnly for infants receiving a 3-dose DTaP-HepB-IPV/Hib primary schedule. Infants who received a 2-dose DTaP-HepB-IPV/Hib primary schedule did not attend visit 3. ^d3-dose DTaP-HepB-IPV/Hib primary schedule at 2, 3 and 4 months of age administered in Czechia. ^e3-dose DTaP-HepB-IPV/Hib primary schedule at 2, 4 and 6 months of age administered in Australia, Canada and Spain. ^fPCV13 was co-administered as a 2-dose or 3-dose primary vaccination schedule; in some countries, infants received a 3-dose DTaP-HepB-IPV/Hib schedule but a 2-dose PCV13 schedule (at 2 and 4 months of age).

primary) (Fig. 1). Antibodies against diphtheria, tetanus and the three pertussis antigens (filamentous hemagglutinin [FHA], pertactin [PRN] and pertussis toxin [PT]) were measured using validated enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), with assay cut-offs (lower limits of quantitation [LLOQs]) of 0.057 IU/mL (anti-diphtheria), 0.043 IU/mL (anti-tetanus), 2.046 IU/mL (anti-FHA), 2.187 IU/mL (anti-PRN) and 2.693 IU/mL (anti-PT) defining seropositivity. Seroprotection for diphtheria and tetanus was defined as an antibody concentration ≥ 0.1 IU/mL [25,26]. No correlate of protection has been established for pertussis [27]. Anti-hepatitis B surface antigen (HBs) antibodies were measured using a commercial chemiluminescence immunoassay (ADVIA Centaur anti-HBs2, Siemens Healthcare) with an assay cut-off of 6.2 mIU/mL and a concentration of 10 mIU/mL defining seroprotection [27–29]. Anti-poliovirus types 1, 2 and 3 antibodies were measured using a validated microneutralization test [30], with antibody titers ≥ 8 considered protective. Anti-Hib polyribosylribitol phosphate (PRP) antibodies were measured using a validated ELISA, with an assay cut-off of 0.066 μ g/mL and concentrations of 0.15 μ g/mL and 1.0 μ g/mL indicative of short- and long-term protection, respectively [31,32]. Serotype-specific anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibodies (for the PCV13 serotypes) were measured using validated multiplex electrochemiluminescence (ECL) assays [33]. A threshold of 0.35 μ g/mL for the ECL assays was shown to be equivalent to the 0.35 μ g/mL PCV licensure threshold established for the World Health Organization pneumococcal reference ELISA [33,34]. All assays were performed at GSK, Rixensart/Wavre, Belgium.

At each vaccination visit, the infants' parents or legally acceptable representatives (LARs) received diary cards to record solicited local (injection site pain, redness, swelling) and general (drowsiness, irritability, loss of appetite, fever) adverse events (AEs) within 4 days and unsolicited AEs within 31 days after each vaccination. Diary cards were returned at the next visit, during which the investigators asked the parents/LARs about any other possible AEs (or serious AEs [SAEs]) occurring since the previous visit. SAEs were collected from the first DTaP-HepB-IPV/Hib dose until study end. The total safety follow-up time depended on the vaccination schedule: approximately 5 months for infants receiving a 3-dose schedule at 2, 4 and 6 months of age and approximately 3 months for infants receiving the other schedules. The investigators assessed the intensity of all AEs and their causal relation to infant vaccination. Solicited local AEs were all considered vaccination-related.

2.3. Objectives

The primary objective was to assess the immune response to DTaP-HepB-IPV/Hib in terms of anti-diphtheria, anti-tetanus, anti-HBs, anti-poliovirus types 1–3 and anti-PRP seroprotection; and anti-FHA, anti-PRN and anti-PT vaccine responses 1 month post-primary vaccination. Vaccine response was defined as a post-vaccination antibody concentration at least as high as the LLOQ for infants with a pre-vaccination concentration $<$ LLOQ; and a post-vaccination antibody concentration at least as high as the pre-vaccination concentration for infants with a pre-vaccination concentration $\geq$ LLOQ. Because of the expected decline in maternally transferred pertussis antibodies between the pre- and post-vaccination time points, a post-vaccination concentration equal to the pre-vaccination concentration would correspond to at least a 2-fold increase in infant-induced antibodies.

Secondary immunogenicity objectives were to assess antibody concentrations or titers against all DTaP-HepB-IPV/Hib antigens, seropositivity for pertussis, and serotype-specific anti-pneumococcal antibody concentrations 1 month after the last DTaP-HepB-IPV/Hib primary dose; and the persistence of maternally transferred antibodies to all Tdap antigens in terms of concentrations and seroprotection/seropositivity before the first DTaP-HepB-IPV/Hib infant primary dose.

The reactogenicity and safety of DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 primary vaccination were assessed as secondary objective in terms of the occurrence of solicited AEs, unsolicited AEs and SAEs.

2.4. Statistical analyses

The sample size was based on the number of mothers enrolled in the maternal immunization trial. The primary immunogenicity analyses were performed on the according-to-protocol (ATP) cohort for immunogenicity, including all eligible participants who received at least 1 dose of the study vaccines per protocol, complied with study procedures and intervals, were born full term (≥ 37 weeks' gestation) and had immunogenicity results available for at least one of the study vaccines' antigens. Seroprotection, seropositivity and vaccine response rates were calculated with exact 95% confidence intervals (CIs). Geometric mean antibody concentrations and titers (GMCs and GMTs) were calculated with 95% CIs by taking the anti-log of the mean of the log10 concentration or titer transformations. Antibody concentrations or titers

below the assay cut-offs were given arbitrary values of half the cut-offs for the GMC and GMT calculations.

We also performed exploratory subgroup analyses by dose schedule (2-dose vs 3-dose primary schedule).

The primary safety analyses were performed on the total vaccinated cohort (TVC), including all participants who received at least 1 study vaccine dose. Percentages of participants for whom solicited or unsolicited AEs were reported were calculated with exact 95% CIs. SAEs were described in detail.

Congenital anomalies which became apparent once the maternal immunization trial [24] ended were reported as pre-existing medical condition in the present study and analyzed post-hoc.

All endpoints were descriptive. Analyses were performed using SAS version 9.2.

3. Results

3.1. Study population

601 infants were enrolled and included in the TVC: 296 whose mothers were randomized to receive Tdap (Tdap group) and 305 whose mothers were randomized to receive placebo (control

group) during pregnancy in the maternal immunization trial. 592 infants (98.5%) completed the study and 542 (90.2%) were included in the ATP cohort for immunogenicity (Fig. 2). Baseline characteristics were comparable between the two groups (Table 1). Most infants (~88%) received a 3-dose primary DTaP-HepB-IPV/Hib schedule (mainly at 2, 4 and 6 months of age); of those who received a 2-dose primary schedule, nearly all received their doses at 3 and 5 months of age (Table 1).

3.2. Immunogenicity

3.2.1. Response to the DTaP-HepB-IPV/Hib primary series

The percentages of infants who reached the seroprotective thresholds for anti-diphtheria, anti-tetanus, anti-HBs, anti-poliovirus types 1–3 and anti-PRP 1 month post-primary vaccination were similar between groups: 100% in both groups for anti-diphtheria and anti-tetanus, $\geq 98.5\%$ for anti-HBs, $\geq 95.9\%$ for anti-poliovirus and $\geq 94.5\%$ for anti-PRP (Table 2). Vaccine response rates against the three pertussis antigens were lower in the Tdap than in the control group (39.6% vs 94.8% for anti-FHA, 37.5% vs 90.0% for anti-PRN and 77.1% vs 99.2% for anti-PT; Table 3). One month post-primary vaccination, all infants in the Tdap group were

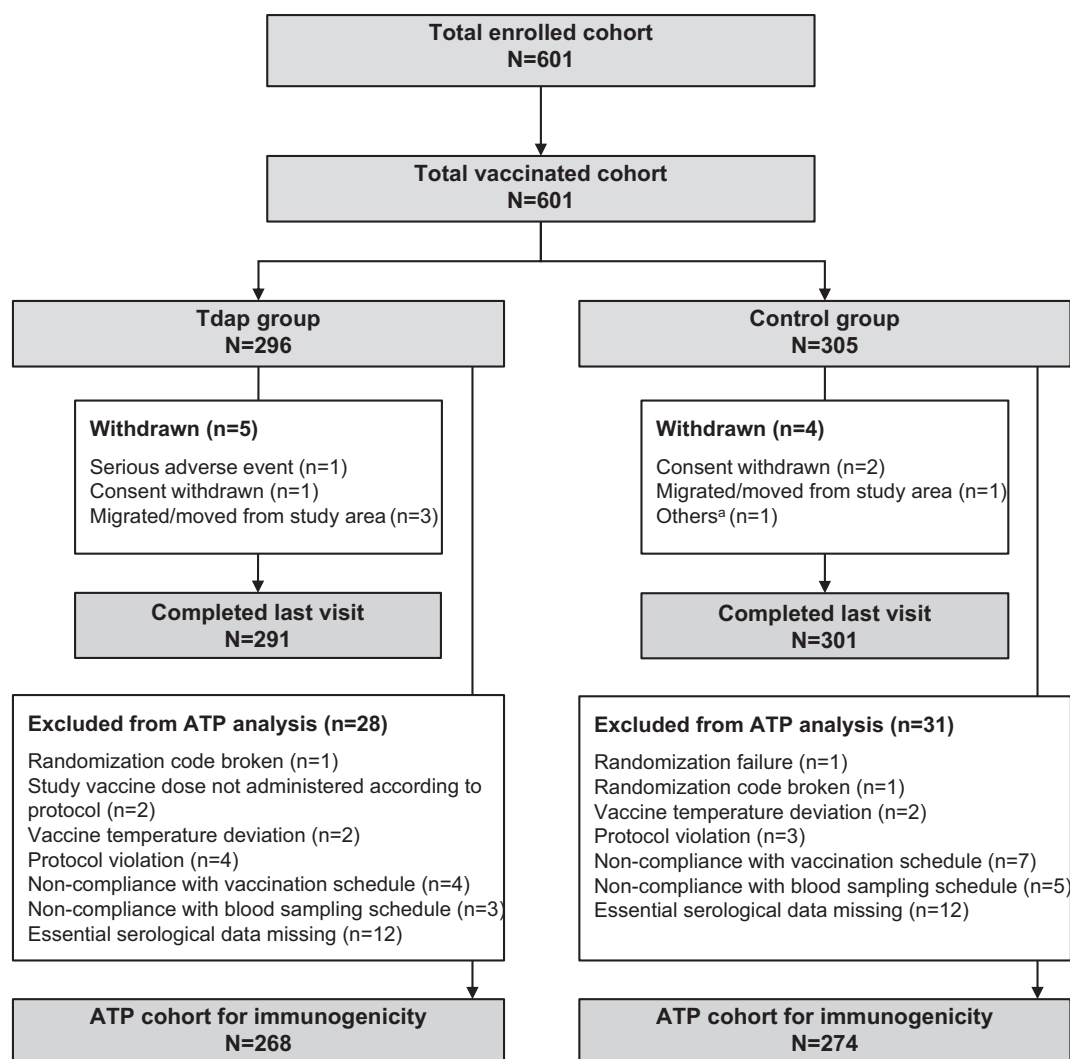


Fig. 2. Participant flow diagram. Abbreviations: ATP, according-to-protocol; N, number of infants per cohort/group; n, number of infants with the specified elimination code assigned (excluding those for whom a lower elimination code number was assigned; elimination codes from the maternal immunization trial carried forward into the follow-up infant immunization trial); Tdap, reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine. ^aThis infant was withdrawn from the study at visit 2 as the infant was vaccinated outside of the study before migrating from the study site.

Table 1
Characteristics of participants in the total vaccinated cohort.

	Tdap group (N = 296)	Control group (N = 305)
Mean age $\pm$ SD at vaccination dose 1, weeks	8.7 $\pm$ 1.6	8.9 $\pm$ 1.8
Female sex, n (%)	141 (47.6)	144 (47.2)
Ethnic origin, n (%)		
White ^a	269 (90.8)	288 (94.4)
Asian	5 (1.7)	0 (0.0)
African/African American	4 (1.4)	9 (3.0)
Other	18 (6.1)	8 (2.6)
DTaP-HepB-IPV/Hib schedule, n (%)		
2-dose	32 (10.8)	41 (13.4)
3, 5 months	29 (9.8)	37 (12.1)
2, 4 months	3 (1.0)	4 (1.3)
3-dose	264 (89.2)	264 (86.6)
2, 4, 6 months	229 (77.4)	228 (74.8)
2, 3, 4 months	35 (11.8)	36 (11.8)
Mean weight $\pm$ SD, kg	5.3 $\pm$ 0.8	5.4 $\pm$ 0.8
Maternal age category at pregnancy dose, n (%)		
18–24 years	7 (2.4)	12 (3.9)
25–34 years	187 (63.2)	188 (61.6)
35–45 years	102 (34.5)	105 (34.4)
Gestational age category at pregnancy dose, n (%)		
27–32 weeks	174 (58.8)	179 (58.7)
33–36 weeks	121 (40.9)	126 (41.3)
>36 weeks	1 (0.3)	0 (0.0)

Abbreviations: DTaP-HepB-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b vaccine; N, total number of infants per group; n (%), number (percentage) of infants in the specified category; SD, standard deviation; Tdap, reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine.

^a Includes White – Caucasian/European heritage (majority) and White – Arabic/North African heritage (1 in Tdap and 3 in control group)

seropositive for all pertussis antibodies but antibody GMCs were lower in the Tdap than in the control group (68.5 vs 103.5 IU/mL for anti-FHA, 60.5 vs 92.0 for anti-PRN, and 32.7 vs 54.7 for anti-PT; Table 3). Post-primary anti-diphtheria antibody GMCs were also lower in the Tdap than in the control group. For the other DTaP-HepB-IPV/Hib antigens, antibody GMCs were similar between the two groups (Table 2).

Table 2
Seroprotection rates and geometric mean concentrations or titers for diphtheria, tetanus, hepatitis B, poliovirus and Hib antibodies in infants 1 month after primary vaccination (ATP cohort for immunogenicity).

Antibody (Cut-off)	Tdap group			Control group		
	N	Seroprotection, % (95% CI)	GMC or GMT (95% CI)	N	Seroprotection, % (95% CI)	GMC or GMT (95% CI)
Anti-D (0.1 IU/mL)	264	100 (98.6–100)	1.75 (1.60–1.91)	271	100 (98.6–100)	2.75 (2.50–3.02)
Anti-T (0.1 IU/mL)	266	100 (98.6–100)	2.35 (2.14–2.58)	271	100 (98.6–100)	2.28 (2.07–2.51)
Anti-HBs (10 mIU/mL)	253	99.2 (97.2–99.9)	1322.8 (1116.7–1567.0)	263	98.5 (96.2–99.6)	1339.2 (1132.8–1583.3)
Anti-polio 1 (8 ED50)	237	98.3 (95.7–99.5)	432.1 (351.8–530.9)	244	99.2 (97.1–99.9)	489.9 (402.6–596.0)
Anti-polio 2 (8 ED50)	241	99.2 (97.0–99.9)	424.6 (342.7–526.2)	245	95.9 (92.6–98.0)	388.4 (306.3–492.6)
Anti-polio 3 (8 ED50)	230	99.1 (96.9–99.9)	730.6 (596.5–894.9)	237	99.6 (97.7–100)	775.6 (645.9–931.3)
Anti-PRP (0.15 μ g/mL)	266	95.9 (92.7–97.9)	1.86 (1.55–2.23)	271	94.5 (91.0–96.9)	1.72 (1.43–2.06)
(1.0 μ g/mL)		64.7 (58.6–70.4)			65.3 (59.3–71.0)	

Abbreviations: %, percentage of infants with antibody concentrations equal to or above the specified seroprotection cut-offs; ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; D, diphtheria; ED50, effective dose causing 50% effect; GMC, geometric mean concentration; GMT, geometric mean titer; HBs, hepatitis B surface antigen; Hib, *Haemophilus influenzae* type b; polio 1–3, poliovirus types 1–3; (m)IU, (milli)international unit; N, number of infants with available results; PRP, Hib polyribosylribitol phosphate; T, tetanus; Tdap, reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine.

3.2.2. Response to the PCV13 primary series

One month post-primary vaccination, the percentages of infants with serotype-specific anti-pneumococcal antibody concentrations ≥ 0.35 μ g/mL were similar in both groups for each PCV13 serotype (Table 4). Serotype-specific antibody GMCs were in the same range in both groups for most PCV13 serotypes; minimal differences in GMCs were observed for serotypes 4 and 19F (marginally lower in the Tdap group) (Table 4).

3.2.3. Persistence of maternally transferred antibodies to Tdap antigens

Before the first primary dose (i.e., at 2 or 3 months of age depending on the schedule the infant received), more infants in the Tdap group were seroprotected against diphtheria (82.6% in Tdap vs 43.7% in control); against tetanus (99.2% in Tdap vs 88.9% in control); and also more were seropositive for the three pertussis antigens (90.1%–100% in Tdap vs 34.8%–83.0% in control) (Table 5). Antibody GMCs at the pre-primary time point in the Tdap group were significantly higher than those in the control group for all Tdap antigens (Table 5).

3.2.4. Subgroup analysis by dose schedule

We evaluated the immune response to the DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 primary series separately in infants who received a 2-dose schedule (nearly all at 3 and 5 months of age) and in infants who received a 3-dose schedule (predominantly at 2, 4 and 6 months of age). Generally, the trends we described for the overall population were observed for both schedules (Supplementary tables 1–3). However, interpretation of these results is limited by the small sample size of the 2-dose subgroup.

3.3. Reactogenicity and safety

Solicited AEs were reported at similar rates in both groups, with redness being the most commonly reported local AE at the DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 injection sites (Table 6) and irritability the most commonly reported general AE (Table 6). Most solicited AEs in both groups were mild or moderate. Unsolicited AEs were reported for 54.4% and 56.7% of infants in the Tdap and control groups, respectively, most being mild or moderate (Table 6). Upper respiratory tract infection was the most common unsolicited AE (Tdap: 12.2%, 95% CI: 8.7–16.4; control: 10.8%, 7.6–14.9).

Table 3
Vaccine response rates, seropositivity rates and geometric mean concentrations for pertussis antibodies in infants 1 month after primary vaccination (ATP cohort for immunogenicity).

Antibody (LLOQ)	Tdap group					Control group				
	N	Vaccine response ^a % (95% CI)	N'	Sero-positivity, % (95% CI)	GMC, IU/mL (95% CI)	N	Vaccine response ^a % (95% CI)	N'	Sero-positivity, % (95% CI)	GMC, IU/mL (95% CI)
Anti-FHA (2.046 IU/mL)	240	39.6 (33.4–46.1)	266	100 (98.6–100)	68.5 (63.5–73.9)	251	94.8 (91.3–97.2)	271	100 (98.6–100)	103.5 (95.6–112.1)
Anti-PRN (2.187 IU/mL)	240	37.5 (31.4–44.0)	266	100 (98.6–100)	60.5 (54.2–67.6)	250	90.0 (85.6–93.4)	270	99.6 (98.0–100)	92.0 (81.6–103.6)
Anti-PT (2.693 IU/mL)	240	77.1 (71.2–82.2)	266	100 (98.6–100)	32.7 (30.2–35.3)	251	99.2 (97.2–99.9)	271	100 (98.6–100)	54.7 (51.0–58.6)

Abbreviations: %, percentage of infants who mounted a vaccine response or were seropositive (antibody concentration equal to or above the specified LLOQs); ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; FHA, filamentous hemagglutinin; GMC, geometric mean concentration; IU, international unit; LLOQ, lower limit of quantitation; N, number of infants with pre- and post-vaccination results available; N', number of infants with post-vaccination results available; PRN, pertactin; PT, pertussis toxoid; Tdap, reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine.

^a Vaccine response to FHA, PRN and PT antigens is defined as a post-vaccination antibody concentration $\geq$ LLOQ for infants with a pre-vaccination concentration $<$ LLOQ; a post-vaccination concentration at least as high as the pre-vaccination concentration for infants with a pre-vaccination concentration $\geq$ LLOQ.

Table 4
Percentages of infants with pneumococcal serotype-specific antibody concentrations ≥ 0.35 μ g/mL and geometric mean concentrations 1 month after primary vaccination^a (ATP cohort for immunogenicity).

Vaccine serotype	Tdap group			Control group		
	N	% ≥ 0.35 μ g/mL (95% CI)	GMC, μ g/mL (95% CI)	N	% ≥ 0.35 μ g/mL (95% CI)	GMC, μ g/mL (95% CI)
1	232	95.7 (92.2–97.9)	1.61 (1.43–1.80)	237	95.8 (92.4–98.0)	1.92 (1.73–2.14)
3	232	74.6 (68.5–80.0)	0.54 (0.49–0.60)	237	76.4 (70.4–81.6)	0.60 (0.55–0.67)
4	232	92.2 (88.0–95.3)	1.20 (1.07–1.35)	237	96.2 (92.9–98.2)	1.56 (1.40–1.75)
5	226	88.1 (83.1–92.0)	1.09 (0.96–1.24)	234	91.5 (87.1–94.7)	1.27 (1.13–1.43)
6A	232	95.3 (91.7–97.6)	2.16 (1.89–2.47)	237	95.4 (91.8–97.7)	2.59 (2.27–2.95)
6B	232	79.7 (74.0–84.7)	1.37 (1.12–1.68)	237	84.4 (79.1–88.8)	1.44 (1.20–1.73)
7F	232	98.7 (96.3–99.7)	2.39 (2.15–2.65)	237	99.6 (97.7–100)	2.67 (2.43–2.93)
9V	232	91.4 (87.0–94.7)	1.33 (1.19–1.50)	237	95.8 (92.4–98.0)	1.64 (1.47–1.83)
14	232	98.7 (96.3–99.7)	5.70 (4.99–6.52)	237	98.3 (95.7–99.5)	6.57 (5.71–7.56)
18C	232	94.8 (91.1–97.3)	1.61 (1.42–1.82)	237	94.1 (90.3–96.7)	1.79 (1.59–2.01)
19A	232	93.1 (89.0–96.0)	1.61 (1.43–1.82)	237	95.8 (92.4–98.0)	2.01 (1.78–2.27)
19F	232	99.1 (96.9–99.9)	2.57 (2.35–2.82)	237	98.3 (95.7–99.5)	3.24 (2.92–3.60)
23F	230	79.1 (73.3–84.2)	0.86 (0.74–0.99)	236	86.0 (80.9–90.2)	1.02 (0.88–1.17)

Abbreviations: %, percentage of infants with antibody concentrations ≥ 0.35 μ g/mL; ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; GMC, geometric mean concentration; N, number of infants with available results; Tdap, reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine.

^a 1 month after DTaP-HepB-IPV/Hib primary vaccination, which is 1 month after PCV13 primary vaccination for most infants, but 3 months after PCV13 primary vaccination for those who received a 3-dose DTaP-HepB-IPV/Hib schedule at 2, 4 and 6 months of age and a 2-dose PCV13 schedule at 2 and 4 months of age.

Table 5
Seropositivity or seroprotection rates and geometric mean concentrations for diphtheria, tetanus and pertussis antibodies in infants before primary vaccination (ATP cohort for immunogenicity).

Antibody (LLOQ or cut-off)	Tdap group			Control group		
	N	% $\geq$ LLOQ or cut-off (95% CI)	GMC, IU/mL (95% CI)	N	% $\geq$ LLOQ or cut-off (95% CI)	GMC, IU/mL (95% CI)
Anti-D (0.1 IU/mL)	242	82.6 (77.3–87.2)	0.423 (0.354–0.506)	252	43.7 (37.4–50.0)	0.089 (0.076–0.103)
Anti-T (0.1 IU/mL)	242	99.2 (97.0–99.9)	2.152 (1.925–2.406)	253	88.9 (84.4–92.5)	0.378 (0.330–0.434)
Anti-FHA (2.046 IU/mL)	242	100 (98.5–100)	88.3 (77.7–100.4)	253	83.0 (77.8–87.4)	6.6 (5.7–7.7)
Anti-PRN (2.187 IU/mL)	242	95.5 (92.0–97.7)	70.5 (56.1–88.5)	253	59.7 (53.4–65.8)	4.5 (3.7–5.4)
Anti-PT (2.693 IU/mL)	242	90.1 (85.6–93.5)	11.9 (10.3–13.6)	253	34.8 (28.9–41.0)	2.2 (2.0–2.5)

Abbreviations: %, percentage of infants with antibody concentrations greater than or equal to the specified seroprotection cut-offs (for diphtheria and tetanus) or LLOQs (for pertussis); ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; D, diphtheria; FHA, filamentous hemagglutinin; GMC, geometric mean concentration; IU, international unit; LLOQ, lower limit of quantitation; N, number of infants with available results; PRN, pertactin; PT, pertussis toxoid; T, tetanus; Tdap, reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine.

Nine SAEs were reported for seven (2.4%) infants in the Tdap group and 23 for 17 (5.6%) infants in the control group. The difference between the two groups mainly resulted from a greater number of respiratory tract and other infections reported as SAE in the control compared to the Tdap group (15 vs 2) (Supplementary table 4). One infant in the Tdap group was withdrawn due to SAEs

(intestinal hemorrhage and milk allergy). No SAEs were deemed related to infant vaccination and no infants died during the study.

Congenital anomalies were reported for 24 (8.1%, 95% CI: 5.3–11.8) infants from Tdap-vaccinated mothers and 28 (9.2%, 6.2–13.0) infants from control mothers, atrial septal defect being most common (Tdap: 1.4%, 0.4–3.4; control: 2.6%, 1.1–5.1).

Table 6

Solicited and unsolicited adverse events after primary vaccination (total vaccinated cohort).

Adverse event	Tdap group (N = 294)		Control group (N = 303)	
	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
Solicited local AEs at the DTaP-HepB-IPV/Hib injection site (4 days post-vaccination)				
Pain				
Any	165	56.1 (50.2–61.9)	166	54.8 (49.0–60.5)
Grade 3	7	2.4 (1.0–4.8)	14	4.6 (2.5–7.6)
Redness				
Any	185	62.9 (57.1–68.5)	185	61.1 (55.3–66.6)
>20 mm	10	3.4 (1.6–6.2)	14	4.6 (2.5–7.6)
Swelling				
Any	137	46.6 (40.8–52.5)	138	45.5 (39.8–51.3)
>20 mm	4	1.4 (0.4–3.4)	12	4.0 (2.1–6.8)
Solicited local AEs at the PCV13 injection site (4 days post-vaccination)				
Pain				
Any	158	53.9 (48.0–59.7)	153	50.5 (44.7–56.3)
Grade 3	9	3.1 (1.4–5.8)	8	2.6 (1.1–5.1)
Redness				
Any	163	55.6 (49.7–61.4)	170	56.1 (50.3–61.8)
>20 mm	6	2.0 (0.8–4.4)	6	2.0 (0.7–4.3)
Swelling				
Any	114	38.9 (33.3–44.8)	128	42.2 (36.6–48.0)
>20 mm	8	2.7 (1.2–5.3)	11	3.6 (1.8–6.4)
Solicited general AEs (4 days post-vaccination)				
Drowsiness				
Any	216	73.5 (68.0–78.4)	232	76.6 (71.4–81.2)
Grade 3	14	4.8 (2.6–7.9)	16	5.3 (3.0–8.4)
Irritability				
Any	255	86.7 (82.3–90.4)	257	84.8 (80.3–88.7)
Grade 3	36	12.2 (8.7–16.5)	37	12.2 (8.7–16.4)
Loss of appetite				
Any	142	48.3 (42.5–54.2)	157	51.8 (46.0–57.6)
Grade 3	8	2.7 (1.2–5.3)	7	2.3 (0.9–4.7)
Fever				
Any	126	42.9 (37.1–48.7)	126	41.6 (36.0–47.4)
>39.0 °C	4	1.4 (0.4–3.4)	1	0.3 (0.0–1.8)
Unsolicited AEs (31 days post-vaccination)				
		(N = 296)		(N = 305)
Any	161	54.4 (48.5–60.2)	173	56.7 (51.0–62.4)
Grade 3	15	5.1 (2.9–8.2)	18	5.9 (3.5–9.2)
Related	11	3.7 (1.9–6.6)	13	4.3 (2.3–7.2)

Abbreviations: AE, adverse event; CI, confidence interval; DTaP-HepB-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b vaccine; N, number of infants with at least one documented dose (for solicited AEs) or at least one administered dose (for unsolicited AEs); n/%, number/percentage of infants for whom the specified AE was reported at least once during the follow-up periods after any of the doses; Tdap, reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine.

Grade 3 pain was defined as crying when the limb was moved or the limb being spontaneously painful; grade 3 irritability as crying that could not be comforted or irritability preventing normal activity; grade 3 drowsiness as drowsiness preventing normal activity; and grade 3 loss of appetite as not eating at all; unsolicited AEs were considered grade 3 if they prevented normal activity.

Supplementary Fig. 1 depicts a plain language summary outlining the findings and highlighting their clinical relevance.

4. Discussion

The key rationale for pertussis immunization during pregnancy is to protect infants too young to be vaccinated from pertussis disease and death by achieving persistent high levels of maternally transferred pertussis antibodies in infants between birth and the first primary immunization dose. Our study—the largest RCT to date to investigate this—showed that administration of the reduced-antigen-content Tdap vaccine during the third trimester of pregnancy resulted in high levels of maternally transferred pertussis antibodies in infants up to the pre-primary vaccination time point (at 2 or 3 months of age). Infants of Tdap-immunized mothers presented significantly higher antibody levels for all Tdap antigens before the primary series compared to infants of control mothers. However, immunological interference was evident for

pertussis (in terms of GMCs and vaccine response rates) and to a lesser extent for diphtheria (in terms of GMC but not seroprotection rate) after the primary DTaP-HBV-IPV/Hib series in infants born to Tdap mothers.

There was no evidence of maternally derived antibodies interfering with the infant immune response to tetanus, hepatitis B, poliovirus or Hib PRP in terms of seroprotection rates and GMCs after the primary DTaP-HBV-IPV/Hib series. Likewise, we observed no interference with the response to PCV13 in terms of percentages of infants achieving the 0.35 µg/mL threshold (shown to be equivalent to the threshold used for PCV licensure [33,34]). The minimal GMC differences observed for serotypes 4 and 19F between the two groups may be explained by the absence of statistical adjustments for multiple testing.

The concept of immune interference or blunting, where maternal antibodies reduce antibody generation to the infant primary series [35,36], resulting in lower post-primary antibody concentrations, is not new. Previous studies assessing the administration of

Tdap vaccines (three- or five-component pertussis vaccines) during pregnancy have reported significantly lower antibody responses to one or more pertussis antigens in infants born to Tdap-vaccinated mothers following completion of their primary series compared to infants whose mothers had not been Tdap-vaccinated [4–8,10,20–22]. However, this effect was not consistently observed [4–6,10,21,22]. Similarly, several studies have shown that maternally transferred diphtheria antibodies can interfere with diphtheria and diphtheria-derived CRM-conjugated pneumococcal vaccine responses to the infant primary series following Tdap immunization during pregnancy [4,5,10,21,22,37]. In contrast to other studies [4,5,21,22] we did not see an enhancement of the immune response to tetanus post-primary series, despite higher pre-primary anti-tetanus GMCs in infants of Tdap-vaccinated mothers than in controls.

Maternal antibody interference with the immune response to infant vaccination has also been described as a natural phenomenon in the absence of maternal immunization in a recent meta-analysis of 32 clinical trials [38]. This meta-analysis showed that pre-existing antibodies inhibit infant immune responses to primary immunization for 20 of 21 measured antigens, and this in the absence of maternal vaccination [38]. Two-fold higher maternal antibody levels were estimated to result in 11% lower post-vaccination antibody levels for PT and FHA, 22% lower for PRN, 13% lower for tetanus and 24% lower for diphtheria [38]. Given that maternal antibodies decline rapidly over the first months of life, mathematical modeling indicated that the inhibitory effect of a 2-fold to 5-fold increase in maternal antibody concentrations in infants can be offset by a delay of 2.2–5.0 weeks in starting primary vaccination [38]. A recent RCT in the Netherlands investigated the effect of maternal Tdap immunization on pertussis antibody responses of infants starting primary vaccination at 3 months (instead of 2 months) and still found significant blunting [8]. In our subgroup analysis by dose schedule, nearly all infants in the 2-dose subgroup started their primary series at 3 months of age; interference with the pertussis response seemed to occur in this subgroup as well; however, the small sample size of this subgroup precludes any sound conclusions.

Importantly, the clinical relevance of the lower post-primary antibody levels in infants from Tdap-vaccinated mothers remains unknown, since there is no established correlate of protection for pertussis. To date, there is no evidence that the observed immunological interference is of clinical significance as there has been no increase in pertussis disease in infants born to Tdap-vaccinated mothers following primary series vaccinations in the first year of life [13,14,39]. However, this requires ongoing monitoring.

This study provides further evidence of the tolerability and safety of DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 in infants whose mothers received Tdap vaccine during pregnancy. Rates of solicited and unsolicited AEs were similar between groups. SAEs were not reported more frequently in the Tdap group compared to the control group. Hence, the safety profile of DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 in infants did not change depending on whether their mothers received Tdap during pregnancy.

The current study has several potential limitations. It was conducted in six high-income countries, and participants of the original study (NCT02377349) were mainly white Caucasian women and women with low-risk pregnancies. Hence, the results may not be generalizable to low- and middle-income countries, to infants of other ethnic groups or infants born from high-risk pregnancies. In addition, analyses were descriptive with no adjustment for multiplicity. We also did not assess the effect of breastfeeding on antibody levels before and after the infant primary series. Because mothers in the control group received Tdap postpartum, antibodies to Tdap antigens might have been transferred through breast milk to infants in the control group.

A follow-up study is ongoing in the same infant cohort to investigate the effect of maternal Tdap immunization on the persistence of antibodies induced by the primary DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 series up to 11–18 months of age and the effect on the immune response to booster DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 vaccination in the child's second year of life (NCT02853929).

5. Conclusion

Our study is the largest RCT to date providing evidence that immunization against pertussis during pregnancy leads to high levels of pertussis antibodies in young infants that persist until the start of the primary immunization series. These high levels of maternal pertussis antibodies can help to further close the susceptibility gap to severe pertussis disease and death in young infants but appear to interfere with the infant's immune response to the primary pertussis immunization series. The clinical significance of this interference remains unknown in the absence of a correlate of protection. Ongoing epidemiological surveillance of the maternal immunization strategy is required to further understand if there is a clinical impact. We found no evidence of maternally derived antibodies to Tdap antigens interfering with the infant immune response to tetanus, hepatitis B, poliovirus or Hib PRP and only minimal potential interference with the response to diphtheria and two pneumococcal serotypes. The reactogenicity and safety of DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 in infants did not seem impacted by whether their mothers received Tdap or placebo during pregnancy.

6. Contributors

ACM, BC, FOT, JTRA, KPP, NMes, OGV, SAH, SOK and TN were involved in study conception and design.

BAN, FMT, FOT, GVZ, JGS, JMMA, JTRA, LK, MAC, MB, MJCO, MMV, MV, NMes, NMey, OGV, PGM, PM, SAH, TN and ZS performed the study and participated in data collection.

BC, FMT, JMMA, LK, MAC, MV, NMes, NMey, PGM, SAH, SOK, TN and ZS were involved in data analysis and interpretation.

KPP wrote the manuscript and all authors have revised and approved the manuscript.

Funding

This work was supported by GlaxoSmithKline Biologicals S.A., which was the funding source, was involved in all stages of the study conduct and analysis and paid for all costs associated with the development and publishing of this manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: [BAN reports grant from the GSK group of companies (GSK) and personal fees from Pfizer, MSD and Sanofi Pasteur. BC, MAC, NMes, NMey and SOK are employees of GSK, and BC and NMes own GSK restricted shares. FMT, KPP, OGV, SAH and TN's institutions received grants from GSK during the conduct of the study. FMT's institution received financial support from GSK during the conduct of the study, as well as financial and non-financial support outside the submitted work; he also received personal fees from Pfizer, Novavax, MSD and Sanofi Pasteur; his institution also received financial support as trial fees from Ablynx, Jansen, Regeneron, Medimmune, Pfizer, MSD, Sanofi Pasteur, Novavax and Novartis, as well as non-financial support from Pfizer and MSD and grants from MSD and AstraZeneca. JMMA reports receiving fees and non-financial

support from GSK during the conduct of the study, as well as fees from GSK, Pfizer and MSD outside the submitted work. LK is working as consultant for GSK. SAH is member of ad-hoc advisory committees for GSK and Sanofi Pasteur and he has a patent for novel triple adjuvant issued. ACM, FOT, GVZ, JGS, JTRA, MB, MJCO, MMV, MV, PGM, PM and ZS declare no conflicts of interest.]

Acknowledgements

The authors would like to thank all mothers and infants for participating in the study, the members of the independent data monitoring committee and all the research staff at participating centers. In particular, the authors acknowledge José María Martín Sánchez, Irene Rivero Calle, M^a Luz Couce Pico, Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez (Hospital Clínico Universitario de Santiago, Spain); Giulia Rendo (Ospedale dei Bambini Vittore Buzzi, Milan, Italy); Joanne M. Langley and Karina Top (Dalhousie University, Halifax, Canada). The authors also thank Modis for editorial assistance and manuscript coordination, on behalf of GSK; Natalie Denef provided medical writing support and Michaela Conrad coordinated the manuscript development and provided editorial support.

Trademarks

Boostrix and Infanrix Hexa are trademarks of the GSK group of companies. Prevnar 13 is a trademark of Pfizer Inc.

Data sharing

The study protocol is available at <https://www.gsk-studyregister.com/study/5349>. Anonymized individual participant data and study documents can be requested for further research from www.clinicalstudydatarequest.com.

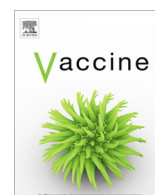
Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.104>.

References

- [1] Masseria C, Martin CK, Krishnarajah G, Becker LK, Buikema A, Tan TQ. Incidence and burden of pertussis among infants less than 1 year of age. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:e54–61. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001440>.
- [2] World Health Organization SAGE pertussis working group. Background paper; SAGE April 2014, [accessed 8 February 2019]. http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1_Pertussis_background_FINAL4_web.pdf.
- [3] World Health Organization. Pertussis vaccines: WHO position paper – September 2015. *Wkly Epidemiol Rec* 2015;90:433–58.
- [4] Munoz FM, Bond NH, Maccato M, Pinell P, Hammill HA, Swamy GK, et al. Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;311:1760–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3633>.
- [5] Hoang HT, Leuridan E, Maertens K, Nguyen TD, Hens N, Vu NH, et al. Pertussis vaccination during pregnancy in Vietnam: Results of a randomized controlled trial Pertussis vaccination during pregnancy. *Vaccine* 2016;34:151–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.098>.
- [6] Villarreal Perez JZ, Ramirez Aranda JM, de la O Cavazos M, Zamudio Osuna MJ, Perales Davila J, Ballesteros Elizondo MR, et al. Randomized clinical trial of the safety and immunogenicity of the Tdap vaccine in pregnant Mexican women. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13:128–35. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1232786>.
- [7] Halperin SA, Langley JM, Ye L, MacKinnon-Cameron D, Elsherif M, Allen VM, et al. A randomized controlled trial of the safety and immunogenicity of tetanus, diphtheria, and acellular pertussis vaccine immunization during pregnancy and subsequent infant immune response. *Clin Infect Dis* 2018;67:1063–71. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy244>.
- [8] Barug D, Pronk I, van Houten MA, Versteegh FGA, Knol MJ, van de Kasstele J, et al. Maternal pertussis vaccination and its effects on the immune response of infants aged up to 12 months in the Netherlands: an open-label, parallel, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2019;19:392–401. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30717-5](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30717-5).
- [9] Abu Raya B, Srugo I, Kessel A, Peterman M, Bader D, Gonen R, et al. The effect of timing of maternal tetanus, diphtheria, and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy on newborn pertussis antibody levels – a prospective study. *Vaccine* 2014;32:5787–93. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.038>.
- [10] Maertens K, Cabore RN, Huygen K, Hens N, Van Damme P, Leuridan E. Pertussis vaccination during pregnancy in Belgium: Results of a prospective controlled cohort study. *Vaccine* 2016;34:142–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.100>.
- [11] Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Donegan K, et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet* 2014;384:1521–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60866-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60866-3).
- [12] Dabrera G, Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, et al. A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012–2013. *Clin Infect Dis* 2015;60:333–7. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu821>.
- [13] Amirthalingam G, Campbell H, Ribeiro S, Fry NK, Ramsay M, Miller E, et al. Sustained effectiveness of the maternal pertussis immunization program in England 3 years following introduction. *Clin Infect Dis* 2016;63:S236–43. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw559>.
- [14] Baxter R, Bartlett J, Fireman B, Lewis E, Klein NP. Effectiveness of vaccination during pregnancy to prevent infant pertussis. *Pediatrics* 2017;139:. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-4091e20164091>.
- [15] Bellido-Blasco J, Guiral-Rodrigo S, Miguez-Santiyan A, Salazar-Cifre A, Gonzalez-Moran F. A case-control study to assess the effectiveness of pertussis vaccination during pregnancy on newborns, Valencian community, Spain, 1 March 2015 to 29 February 2016. *Euro Surveill* 2017;22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2017.22.22.30545>.
- [16] Saul N, Wang K, Bag S, Baldwin H, Alexander K, Chandra M, et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in preventing infection and disease in infants: The NSW Public Health Network case-control study. *Vaccine* 2018;36:1887–92. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.047>.
- [17] Skoff TH, Blain AE, Watt J, Scherzinger K, McMahon M, Zansky SM, et al. Impact of the US maternal tetanus, diphtheria, and acellular pertussis vaccination program on preventing pertussis in infants <2 months of age: a case-control evaluation. *Clin Infect Dis* 2017;65:1977–83. <https://doi.org/10.1093/cid/cix724>.
- [18] Fernandes EG, Sato APS, Vaz-de-Lima LRA, Rodrigues M, Leite D, de Brito CA, et al. The effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in Brazil: A case-control study. *Vaccine* 2019;37(36):5481–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.03.049>.
- [19] Romanin V, Acosta AM, Juarez MDV, Briere E, Sanchez SM, Cordoba BL, et al. Maternal vaccination in Argentina: Tdap vaccine effectiveness during pregnancy in preventing pertussis in infants less than 2 months of age. *Clin Infect Dis* 2019. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz217> [in press].
- [20] Hardy-Fairbanks AJ, Pan SJ, Decker MD, Johnson DR, Greenberg DP, Kirkland KB, et al. Immune responses in infants whose mothers received Tdap vaccine during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:1257–60. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182a09b6a>.
- [21] Ladhani SN, Andrews NJ, Southern J, Jones CE, Amirthalingam G, Waight PA, et al. Antibody responses after primary immunization in infants born to women receiving a pertussis-containing vaccine during pregnancy: single arm observational study with a historical comparator. *Clin Infect Dis* 2015;61:1637–44. <https://doi.org/10.1093/cid/civ695>.
- [22] Maertens K, Hoang TT, Nguyen TD, Cabore RN, Duong TH, Huygen K, et al. The effect of maternal pertussis immunization on infant vaccine responses to a booster pertussis-containing vaccine in Vietnam. *Clin Infect Dis* 2016;63: S197–204. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw551>.
- [23] Cabore RN, Maertens K, Dobly A, Leuridan E, Van Damme P, Huygen K. Influence of maternal vaccination against diphtheria, tetanus, and pertussis on the avidity of infant antibody responses to a pertussis containing vaccine in Belgium. *Virulence* 2017;8:1245–54. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1296998>.
- [24] Perrett KP, Halperin SA, Nolan T, Martínez Pancorbo C, Tapiero B, Martínón-Torres F, et al. Pertussis immunization during pregnancy: evidence from a large multi-country randomized placebo-controlled trial assessing immunogenicity, reactogenicity and safety of diphtheria-tetanus-three-component acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 2019 (in press).
- [25] Melville-Smith ME, Seagroatt VA, Watkins JT. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the toxin neutralization test in mice as a method for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand* 1983;11:137–44.
- [26] Camargo ME, Silveira L, Furuta JA, Oliveira EP, Germek OA. Immunoenzymatic assay of anti-diphtheric toxin antibodies in human serum. *J Clin Microbiol* 1984;20:772–4.
- [27] Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1055–65. <https://doi.org/10.1128/cvi.00131-10>.
- [28] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1991;40:1–25.

- [29] Jack AD, Hall AJ, Maine N, Mendy M, Whittle HC. What level of hepatitis B antibody is protective?. *J Infect Dis* 1999;179:489–92. <https://doi.org/10.1086/314578>.
- [30] World Health Organization Expanded Programme on Immunization. Guidelines for WHO/EPI collaborative studies on poliomyelitis: standard procedure for determining immunity to poliovirus using the microneutralization test, 1993 [accessed 12 April 2019]. <http://www.who.int/iris/handle/10665/70486>.
- [31] Kayhty H, Peltola H, Karanko V, Makela PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1983;147:1100.
- [32] Anderson P. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1984;149:1034–5.
- [33] Feyssaguet M, Bellanger A, Nozay F, Friel D, Merck E, Verlant V, et al. Comparison between a new multiplex electrochemiluminescence assay and the WHO reference enzyme-linked immunosorbent assay to measure serum antibodies against pneumococcal serotype-specific polysaccharides. *Vaccine* 2019;37:2208–15. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.03.011>.
- [34] Siber GR, Chang I, Baker S, Fernsten P, O'Brien KL, Santosham M, et al. Estimating the protective concentration of anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibodies. *Vaccine* 2007;25:3816–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.119>.
- [35] Edwards KM. Maternal antibodies and infant immune responses to vaccines. *Vaccine* 2015;33:6469–72. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.085>.
- [36] Niewiesk S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol* 2014;5:446. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00446>.
- [37] Maertens K, Burbidge P, Van Damme P, Goldblatt D, Leuridan E. Pneumococcal immune response in infants whose mothers received tetanus, diphtheria and acellular pertussis vaccination during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:1186–92. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001601>.
- [38] Voysey M, Kelly DF, Fanshawe TR, Sadarangani M, O'Brien KL, Perera R, et al. the influence of maternally derived antibody and infant age at vaccination on infant vaccine responses : an individual participant meta-analysis. *JAMA Pediatr* 2017;171:637–46. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0638>.
- [39] Becker-Dreps S, Butler AM, McGrath LJ, Boggess KA, Weber DJ, Li D, et al. Effectiveness of prenatal tetanus, diphtheria, acellular pertussis vaccination in the prevention of infant pertussis in the U.S. *Am J Prev Med* 2018;55:159–66. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.04.013>.



Impact of maternal diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccination on pertussis booster immune responses in toddlers: Follow-up of a randomized trial



Federico Martínón-Torres^{a,b}, Scott A. Halperin^c, Terry Nolan^{d,1}, Bruce Tapiéro^e, Kirsten P. Perrett^{d,2}, Ignacio Salamanca de la Cueva^f, José García-Sicilia^g, Zbynek Stranak^h, Otto G. Vanderkooiⁱ, Pavel Kosina^j, Sarka Rumlarova^j, Miia Virta^k, Jose M. Merino Arribas^l, Mariano Miranda-Valdivieso^m, Begoña Arias Novasⁿ, Jan Bozensky^o, María José Cilleruelo Ortega^p, Jose Tomas Ramos Amador^q, Manuel Baca^r, Esperanza Escribano Palomino^s, Gian Vincenzo Zuccotti^t, Jan Janota^u, Paola Giovanna Marchisio^{v,w}, Lusine Kostanyan^x, Nadia Meyer^{x,*}, Maria Angeles Ceregido^x, Brigitte Cheuvart^x, Sherine O. Kuriyakose^y, Narcisa Mesaros^x

^a Hospital Clínico Universitario de Santiago, Pediatría Clínica, Infectológica y Traslacional, 15706 Santiago de Compostela, Spain

^b Genetics, Vaccines and Pediatrics Research Group, University of Santiago de Compostela, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain

^c Dalhousie University, Canadian Center for Vaccinology, Halifax, NS B3K 6R8, Canada

^d Murdoch Children's Research Institute, and the Melbourne School of Population and Global Health at The University of Melbourne, Melbourne, VIC 3052, Australia

^e CHU Sainte Justine, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1C5, Canada

^f Instituto Hispalense de Pediatría, Unidad de Investigación, 41014 Seville, Spain

^g Hospital Universitario Madrid Sanchinarro, Servicio de Pediatría, 28050 Madrid, Spain

^h Institute for the Care of Mother and Child, Neonatology Department, 147 00 Prague, Czech Republic

ⁱ Alberta Children's Hospital, University of Calgary, Departments of Pediatrics, Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, Pathology and Laboratory Medicine and Community Health Sciences, Alberta Children's Hospital Research Institute, Alberta, Calgary AB T3B 6A8, Canada

^j University Hospital, Department of Infectious Diseases, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^k Tampere Vaccine Research Center, Tampere University, 33100 Tampere, Finland

^l Nuevo Hospital Universitario de Burgos, Departamento de Pediatría, 09006 Burgos, Spain

^m Hospital de Antequera, Servicio de Pediatría, 29200 Antequera, Spain

ⁿ Hospital Universitario Sanitas La Zarzuela, Servicio de Pediatría, 28023 Aravaca, Spain

^o Vitkovice Hospital, Pediatrics Department, 703 00 Ostrava, Czech Republic

^p Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Servicio de Pediatría, 28222 Madrid, Spain

^q Departamento de Salud Pública y Materno-Infantil, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain

^r Hospital Quiron Malaga, Departamento de Pediatría y Neonatología, 29004 Malaga, Spain

^s Hospital Universitario La Paz, Servicio de Neonatología, 28046 Madrid, Spain

^t Ospedale dei Bambini Vittore Buzzi, and University of Milan, 20154 Milan, Italy

^u Thomayer Hospital Prague, Department of Neonatology, 140 59 Prague, Czech Republic

^v Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, 20122 Milan, Italy

^w Università degli Studi di Milano, 20122 Milan, Italy

^x GSK, Vaccines, 1300 Wavre, Belgium

^y GSK, Vaccines, Bangalore-560001, India

Abbreviations: AE, adverse event; ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; CPS, capsular polysaccharide; DTaP-HepB-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-three-component acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus/Haemophilus influenzae type b vaccine; DU, D antigen units; ECL, electrochemiluminescence; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FHA, filamentous hemagglutinin; GMC, geometric mean concentration; GMT, geometric mean titer; HBs, hepatitis B surface antigen; Hib, Haemophilus influenzae type b; IPV, inactivated poliovirus; IU, international units; PCV13, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; PRN, pertactin; PRP, polyribosylribitol phosphate; PT, pertussis toxoid; SAE, serious adverse event; Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine; TT, tetanus toxoid; TVC, total vaccinated cohort; UK, United Kingdom; US, United States; WHO, World Health Organization.

* Corresponding author at: GSK, Avenue Fleming 20, 1300 Wavre, Belgium.

E-mail address: nadia.x.meyer@gsk.com (N. Meyer).

¹ Current affiliation: Doherty Institute, The University of Melbourne, Melbourne, VIC 3000, Australia.

² Current affiliation: Department of Paediatrics, The University of Melbourne, Melbourne, VIC 3052, Australia.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.02.001>

0264-410X/© 2021 GlaxoSmithKline Biologicals SA. Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2020

Received in revised form 26 November 2020

Accepted 2 February 2021

Available online 19 February 2021

Keywords:

Tdap vaccine

Pertussis

Maternal immunization

Blunting

Toddlers

Booster

ABSTRACT

Background: Transplacentally transferred antibodies induced by maternal pertussis vaccination interfere with infant immune responses to pertussis primary vaccination. We evaluated whether this interference remains in toddlers after booster vaccination.

Methods: In a prior phase IV, observer-blind, placebo-controlled, randomized study (NCT02377349), pregnant women in Australia, Canada and Europe received intramuscular tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-three-component acellular pertussis vaccine (Tdap group) or placebo (control group) at 27^{0/7}–36^{6/7} weeks' gestation, with crossover immunization postpartum. Their infants were primed (study NCT02422264) and boosted (at 11–18 months; current study NCT02853929) with diphtheria-tetanus-three-component acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus/*Haemophilus influenzae* type b vaccine (DTaP-HepB-IPV/Hib) and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. Immunogenicity before and after booster vaccination, and reactogenicity and safety of the booster were evaluated descriptively.

Results: 263 (Tdap group) and 277 (control group) toddlers received a DTaP-HepB-IPV/Hib booster. Pre-booster vaccination, observed geometric mean concentrations (GMCs) for the three pertussis antigens and diphtheria were 1.4–1.5-fold higher in controls than in the Tdap group. No differences were observed for the other DTaP-HepB-IPV/Hib antigens. One month post-booster vaccination, booster response rates for pertussis antigens were $\geq 92.1\%$ and seroprotection rates for the other DTaP-HepB-IPV/Hib antigens were $\geq 99.2\%$ in both groups (primary objective). Higher post-booster GMCs were observed in controls versus the Tdap group for anti-filamentous hemagglutinin (1.2-fold), anti-pertussis toxoid (1.5-fold) and anti-diphtheria (1.4-fold). GMCs for the other DTaP-HepB-IPV/Hib antigens were similar between groups. Serious adverse events were reported for three toddlers (controls, not vaccination-related). One death occurred pre-booster (Tdap group, not vaccination-related).

Conclusions: As a consequence of interference of maternal pertussis antibodies with infant immune responses to pertussis primary vaccination, pertussis antibody concentrations were still lower in toddlers from Tdap-vaccinated mothers before DTaP-HepB-IPV/Hib booster vaccination. After the booster, antibody concentrations were lower for filamentous hemagglutinin and pertussis toxoid but not for pertactin. The clinical significance of this interference requires further evaluation.

Clinical Trial Registration.

ClinicalTrials.gov: NCT02853929.

© 2021 GlaxoSmithKline Biologicals SA. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Vaccination of women during pregnancy (maternal immunization) is increasingly being recommended as a strategy to protect young infants from infectious diseases [1]. The strategy relies on boosting pathogen-specific maternal antibodies, which are then transferred through the placenta to the fetus and enhance passive immunity during the infant's first vulnerable months of life, before protection through routine infant immunization is established [1]. One target for maternal immunization is pertussis (whooping cough), a contagious respiratory tract infection which has its highest burden in infants < 3 months [2–4]. Pertussis vaccination of pregnant women was first recommended in the United States (US) and the United Kingdom (UK) nearly a decade ago, in response to the resurgence of pertussis disease in the general population and multiple deaths in infants [5,6]. It is now implemented in several industrialized and developing countries [7] and recommended by the World Health Organization (WHO) in settings with high pertussis-related infant morbidity or mortality [8]. Several studies have shown that maternal pertussis vaccination has a favorable safety profile, results in efficient placental transfer of pertussis-specific antibodies and provides high effectiveness (69%–93%) against pertussis in infants < 2–3 months [7,9–19].

We performed a large, placebo-controlled, randomized maternal immunization trial with tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-three-component acellular pertussis vaccine (Tdap), which confirmed that high levels of pertussis antibodies were transferred from mother to infant after vaccination during pregnancy [20]. However, a follow-up study in infants showed that maternal pertussis antibodies interfered with infant immune

responses to routine primary vaccination with diphtheria-tetanus-three-component acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine (DTaP-HepB-IPV/Hib), as evident from lower antibody concentrations to pertussis antigens in infants from mothers who received Tdap during pregnancy compared to those who did not [21]. This was in line with results from prior studies with Tdap vaccines showing interference of maternal antibodies with infant immune responses [22–30]. The current paper describes the results of a subsequent follow-up study of our maternal immunization trial, in which we evaluated whether antibody concentrations in toddlers from Tdap-vaccinated mothers remain lower after a DTaP-HepB-IPV/Hib booster dose.

2. Methods

2.1. Study design and participants

We previously performed a phase IV, observer-blind, randomized, placebo-controlled maternal immunization trial (ClinicalTrials.gov: NCT02377349), in which pregnant women in Australia, Canada, Czech Republic, Finland, Italy and Spain received either Tdap (*Boostrix*, GSK; Tdap group) or placebo (control group) at 27^{0/7}–36^{6/7} weeks' gestation and crossover administration within 72 h postpartum (Fig. 1) [20]. In a follow-up study ("infant study", NCT02422264), infants born to these women received 2 or 3 doses of DTaP-HepB-IPV/Hib (*Infanrix Hexa*, GSK) and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13, *Prevnar 13*, Pfizer Inc.) according to national/local immunization schedules: 2 doses at 2 and 4 or at

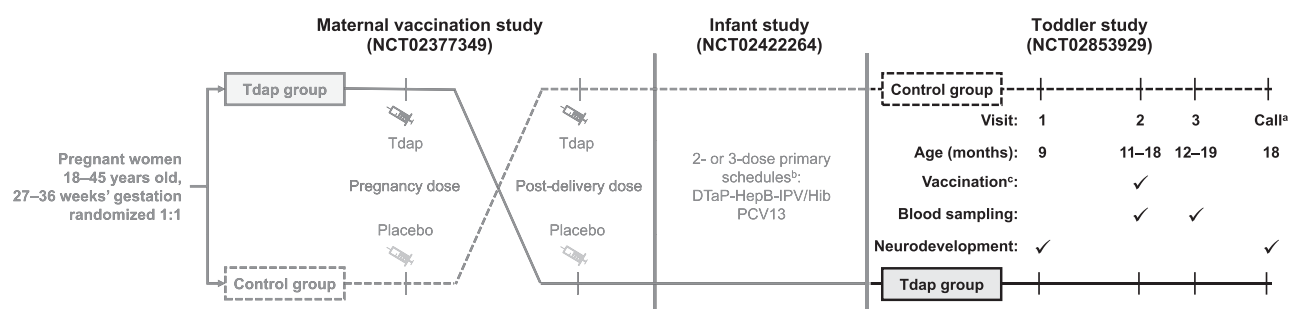


Fig. 1. Study design. DTaP-HepB-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-three-component acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus/*Haemophilus influenzae* type b vaccine; PCV13, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine. ^aIf the booster vaccination visit (visit 2) or post-booster vaccination blood sampling visit (visit 3) took place at 18 months of age, the Ages and Stages Questionnaire-3 (ASQ-3) was preferentially completed during that visit. If visit 3 was completed before 18 months of age, the study staff contacted the parents/legally acceptable representatives to complete the ASQ-3 at 18 months of age via phone. For the Czech Republic, the call at 18 months could be replaced by a clinic visit if preferred by the study team. ^b2- or 3-dose primary vaccination schedules according to national/local schedules (2 and 4 months [Spain]; 3 and 5 months [Finland, Italy]; 2, 4 and 6 months [Australia, Canada, Spain]; 2, 3 and 4 months [Czech Republic]). ^cBooster vaccination with DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 according to national/local schedules.

3 and 5 months; 3 doses at 2, 4 and 6 or at 2, 3 and 4 months of age (Fig. 1) [21]. In the present follow-up study (“toddler study”, NCT02853929), toddlers received a DTaP-HepB-IPV/Hib booster dose, co-administered with PCV13 at 11–18 months of age, according to national/local immunization schedules. The toddler study comprised three visits (at 9, 11–18 and 12–19 months) and, for some, a phone contact at 18 months of age (Fig. 1 and “2.5 Safety assessments” section for further details).

Healthy 9-month-old infants, who were born to mothers from the maternal immunization trial [20], had completed their primary vaccination per protocol in the infant study [21] and whose parents/legally acceptable representatives had provided written informed consent, were enrolled in the toddler study between September 2016 and May 2018. Infants were excluded if they had received prior booster vaccination against diphtheria, tetanus, pertussis, poliovirus, hepatitis B, Hib or pneumococcus or had a history of the corresponding diseases since the end of the infant study. Inclusion and exclusion criteria are detailed in the Supplementary methods.

Group allocation (Tdap or control) was based on that of the mothers in the maternal immunization trial [20]. The toddler study was open label as all toddlers received the same vaccines. Personnel evaluating study endpoints and performing laboratory testing remained blinded to the mothers’ treatment allocation.

The study was conducted according to the principles of Good Clinical Practice, the Declaration of Helsinki and applicable regulations. The centers’ ethics committees (Supplementary material) approved the protocol and other study-related documents. An independent data monitoring committee oversaw the participants’ safety.

2.2. Vaccines

Each 0.5 mL dose of DTaP-HepB-IPV/Hib contained ≥ 30 international units (IU) diphtheria toxoid; ≥ 40 IU tetanus toxoid (TT); 25 μ g filamentous hemagglutinin (FHA); 8 μ g pertactin (PRN); 25 μ g pertussis toxoid (PT); 10 μ g hepatitis B surface antigen (HBs); 40 D antigen units (DU) IPV type 1 (Mahoney strain); 8 DU IPV type 2 (MEF-1 strain); 32 DU IPV type 3 (Saukett strain); and 700 μ g Al^{3+} , provided as liquid component and mixed with lyophilized Hib-TT (10 μ g Hib polyribosylribitol phosphate [PRP], ~ 25 μ g TT and 0.12 mg aluminum as salts). PCV13 contained 2.2 μ g capsular polysaccharide (CPS) of serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9 V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F, and 4.4 μ g CPS of serotype 6B (each conjugated to diphtheria toxoid variant, CRM₁₉₇), and

125 μ g Al^{3+} . DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 were injected intramuscularly in opposite thighs or deltoids.

2.3. Objectives

The primary objective was to assess booster response rates for pertussis antigens and seroprotection rates for the other DTaP-HepB-IPV/Hib antigens 1 month post-booster. Booster response was defined as a post-vaccination antibody concentration ≥ 4 times the assay cut-off for toddlers with a pre-vaccination concentration below the assay cut-off, a post-vaccination concentration ≥ 4 times the pre-vaccination concentration for toddlers with a pre-vaccination concentration between the assay cut-off and < 4 times the assay cut-off, or a post-vaccination concentration ≥ 2 times the pre-vaccination concentration for toddlers with a pre-vaccination concentration ≥ 4 times the assay cut-off.

Secondary objectives were to assess the immune response to DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 booster vaccination in terms of antibody concentrations/titers for all vaccine antigens and pertussis seropositivity 1 month post-booster (defined as antibody concentrations greater than or equal to the assay cut-offs); and antibody persistence after DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 primary vaccination in terms of pre-booster antibody concentrations/titers for all vaccine antigens.

The safety and reactogenicity of both vaccines in terms of solicited and unsolicited adverse events (AEs) and serious adverse events (SAEs); and the toddlers’ neurodevelopmental status at 9 and 18 months of age were also evaluated as secondary objectives.

2.4. Immunogenicity assessments

Blood samples were collected immediately before and 1 month after the booster dose (allowed interval: 21–48 days between booster and blood draw). Antibodies against pertussis antigens, diphtheria, tetanus and Hib PRP were quantified using validated enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Assay cut-offs defining seropositivity were 2.046 IU/mL (anti-FHA), 2.187 IU/mL (anti-PRN), 2.693 IU/mL (anti-PT), 0.057 IU/mL (anti-diphtheria), 0.043 IU/mL (anti-tetanus) and 0.066 μ g/mL (anti-PRP). Seroprotection cut-offs were 0.1 IU/mL for diphtheria and tetanus [31,32] and 0.15 μ g/mL and 1.0 μ g/mL for short- and long-term protection, respectively, for Hib PRP [33,34]. There is no established correlate of protection for pertussis [35]. Anti-HBs antibodies were quantified with a commercial chemiluminescence

immunoassay (ADVIA Centaur anti-HBs2, Siemens Healthcare). The assay cut-off was 6.2 mIU/mL and seroprotection cut-off 10 mIU/mL [35–37]. Anti-poliovirus types 1, 2 and 3 antibodies were quantified with a microneutralization test [38]. Antibody titers ≥ 8 ED₅₀ were considered protective. Serotype-specific anti-pneumococcal CPS antibodies (for the PCV13 serotypes) were quantified using validated multiplex electrochemiluminescence (ECL) assays [39]. A threshold of 0.35 μ g/mL for the ECL assays is considered equivalent to the 0.35 μ g/mL PCV licensure threshold established for the WHO pneumococcal reference ELISA [39,40]. All assays were performed at GSK, Rixensart/Wavre, Belgium.

2.5. Safety assessments

The participants' parents/legally acceptable representatives received diary cards at the booster vaccination visit to record solicited local and general AEs and body temperature on the day of vaccination and 3 subsequent days (days 0–3) and unsolicited AEs occurring on days 0–30. The diary cards were returned at the next visit, AEs were discussed with the investigator and transcribed onto electronic case report forms. Large injection site reactions (defined as any local swelling with a diameter > 50 mm, any noticeable diffuse injection site swelling [diameter not measurable] or any noticeable increased circumference of the injected limb) occurring on days 0–3 post-booster were also recorded. SAEs were collected from booster vaccination until each participant's last visit/phone contact. (S)AEs leading to study withdrawal were recorded from enrollment until study end.

The intensity of solicited and unsolicited AEs was graded on a scale from 1 (mild) to 3 (severe). Definitions of grade 3 AEs were crying when the limb was moved or the limb being spontaneously painful (pain); diameter > 20 mm (swelling, redness); crying inconsolably or preventing normal activity (irritability); not eating at all (loss of appetite); temperature ≥ 39.0 °C (fever); preventing normal activity (drowsiness, unsolicited AEs). The investigators assessed the causality between each (S)AE and vaccination based on their clinical judgement. Solicited local AEs were all considered causally related.

Together with the investigators, the participants' parents/legally acceptable representatives completed a standardized developmental screening tool (Ages & Stages Questionnaire, third edition [ASQ-3]) that assesses five neurodevelopmental domains: communication, gross motor, fine motor, problem solving and personal-social skills [41]. This was done at 9 months of age (max. 9 months + 30 days) during the first visit and at 18 months of age (± 30 days), either during the second visit (booster vaccination) or third visit (blood draw), or during a separate phone call if the second and third visits occurred before 18 months. Participants with a score below the cut-off for any of the five domains were referred to a developmental specialist for a formal neurodevelopmental assessment using the Bayley Scale for Infant Development, version III (BSID-III), which assesses cognitive, language, motor, social-emotional and adaptive behaviors [42].

An overview of all congenital anomalies reported in the maternal immunization trial and the infant and toddler studies as AE or pre-existing condition in the infants' medical history is also presented.

2.6. Statistical analyses

All endpoints were analyzed descriptively, i.e., no tests of statistical significance were performed. Claims of interference were guided by observed differences in antibody GMCs between the Tdap and the control group and consistency with other published studies. Sample size calculations for the maternal immunization trial were described previously [20]. The sample size of the current

toddler study was not based on power-based calculations. Instead, the cohort of the toddler study consisted of all available, eligible infants from the preceding infant study, which depended on the number of mothers enrolled in the maternal immunization trial. Primary immunogenicity analyses were performed on the according-to-protocol (ATP) cohort for immunogenicity (all eligible participants who complied with protocol-defined procedures and intervals and had post-booster immunogenicity results available for at least one antigen). A second analysis based on the total vaccinated cohort (TVC, all toddlers who received the DTaP-HepB-IPV/Hib booster) was also performed to complement the ATP analysis. Seroprotection, seropositivity and booster response rates were calculated with exact 95% confidence intervals (CIs). Geometric mean antibody concentrations and titers (GMCs, GMTs) were calculated with 95% CIs by taking the anti-log of the mean of the log₁₀ concentration or titer transformations. Antibody concentrations/titers below the assay cut-offs were given arbitrary values of half the cut-offs for GMC/GMT calculations. We performed subgroup analyses by primary vaccination dose schedule (2-dose and 3-dose), gestational age (27–32 and 33–36 weeks) and mother's age (18–24, 25–34 and 35–45 years) at maternal vaccination.

Safety analyses were performed on the TVC. Percentages of toddlers with solicited AEs, unsolicited AEs or congenital anomalies were calculated with exact 95% CIs. The analysis of neurodevelopmental status was performed on the total enrolled cohort (to account for participants who withdrew between the first and second visit). The proportion of participants with scores below the cut-off for each and any of the ASQ-3 domains, the proportion referred for BSID-III neurodevelopmental evaluation and those with at least one indicator of neurodevelopmental impairment using BSID-III were calculated.

Analyses were performed using SAS Drug Development (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Study population

Of the 686 infants born to women enrolled in the maternal immunization study [20] and 592 infants completing the infant study [21], 551 were enrolled in the current toddler study: 270 whose mothers had received Tdap and 281 whose mothers had received placebo during pregnancy (Fig. 2). 540 toddlers received the DTaP-HepB-IPV/Hib booster, 536 completed the study and 479 were included in the ATP cohort for immunogenicity (Fig. 2). Demographic characteristics were comparable between groups (Table 1). The mean age at booster vaccination was 15 months.

3.2. Immunogenicity

Results are shown for the primary analyses on the ATP cohort for immunogenicity. Results for the TVC were very similar to those for the ATP cohort and the same overall conclusions could be drawn.

3.2.1. Antibody persistence after the DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 primary series (pre-booster)

Before the DTaP-HepB-IPV/Hib booster, observed antibody GMCs for FHA, PRN, PT and diphtheria were higher in the control than in the Tdap group (approximately 1.4- to 1.5-fold). GMCs for the other DTaP-HepB-IPV/Hib antigens were comparable between groups (Tables 2 and 3). Comparable proportions of toddlers in both groups were seroprotected against diphtheria, tetanus, hepatitis B, polio and Hib (Table 3). The proportions of toddlers with pneumococcal antibody concentrations ≥ 0.35 μ g/mL

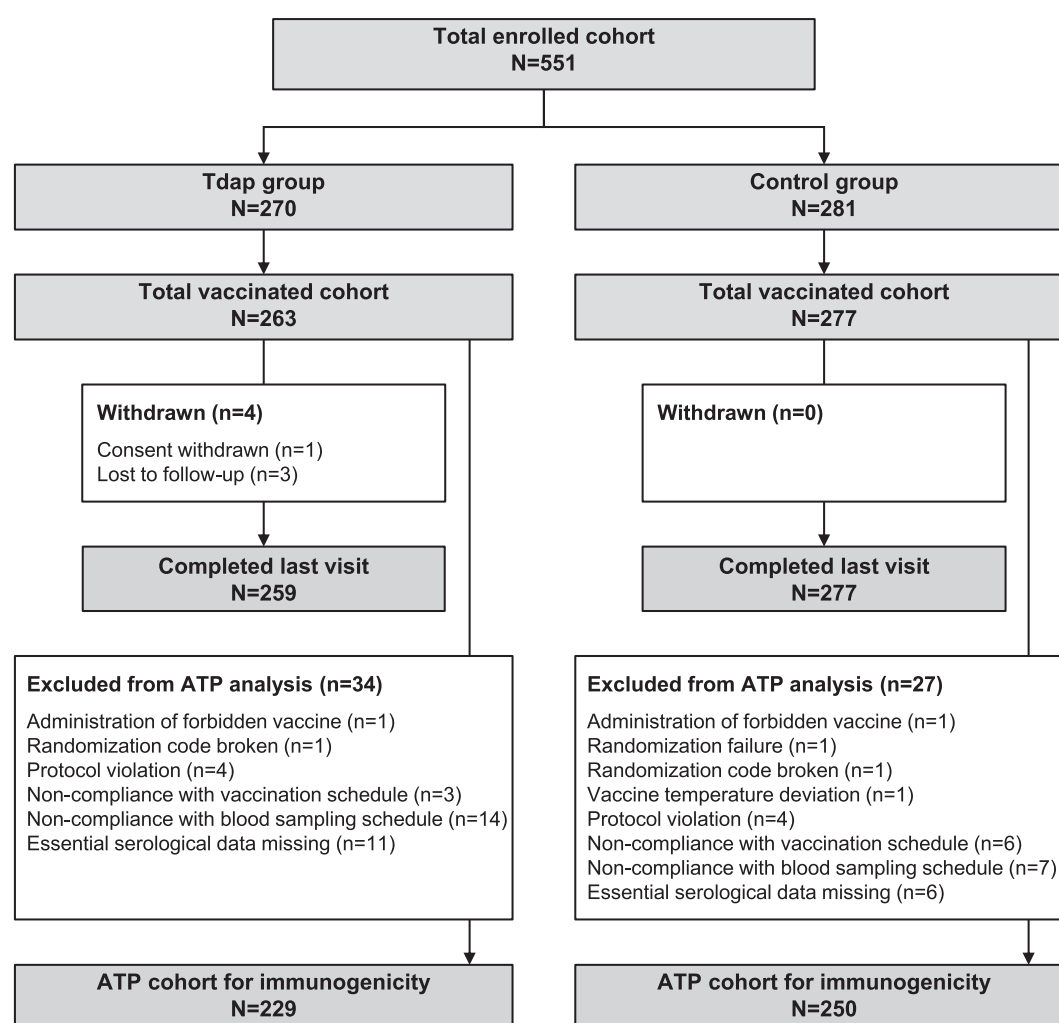


Fig. 2. Participant flow diagram. ATP, according-to-protocol; N, number of toddlers per cohort/group; n, number of toddlers with the specified elimination code assigned (excluding those for whom a lower elimination code number was assigned; elimination codes from the maternal immunization trial and the primary vaccination follow-up study carried forward into the booster vaccination follow-up study); Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine.

and pneumococcal antibody GMCs were similar between groups for most PCV13 serotypes (Table 4).

3.2.2. Response to the DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 booster doses

Substantial increases in antibody GMCs were observed from pre- to post-booster for each DTaP-HepB-IPV-Hib antigen in both groups (pertussis antigens: 13.6- versus 11.3-fold [anti-FHA], 48.4- versus 27.3-fold [anti-PRN], 11.9- versus 12.7-fold [anti-PT] in the Tdap versus the control group, respectively) (Tables 2 and 3). Accordingly, pertussis booster response rates were similarly high in both groups: 92.1%–98.1% (Tdap) and 96.7%–99.6% (control) (Table 2), as were seroprotection rates for the other DTaP-HepB-IPV/Hib antigens: $\geq 99.5\%$ (Tdap) and $\geq 99.2\%$ (control) (Table 3). Higher post-booster antibody GMCs were observed in controls than in the Tdap group for anti-FHA (1.2-fold), anti-PT (1.5-fold) and anti-diphtheria (1.4-fold). GMCs for the other DTaP-HepB-IPV/Hib antigens were similar between groups (Tables 2 and 3).

Fig. 3 shows pertussis antibody GMCs in the two groups from before the pregnancy dose until the post-booster timepoint.

At least 98.1% of toddlers in the Tdap group and $\geq 98.7\%$ in the control group had post-booster pneumococcal antibody concentrations ≥ 0.35 $\mu\text{g/mL}$ for each PCV13 serotype, except

serotype 3 (Tdap: 79.3%; control: 79.6%) (Table 4). Pneumococcal antibody GMCs were similar between groups (Table 4).

3.2.3. Subgroup analyses

Subgroup analyses by primary series dose schedule, or by gestational or maternal age at the pregnancy dose did not indicate that lower post-booster immunogenicity after maternal Tdap immunization was specific to some subgroups (Supplementary tables 1–3 and not shown). In each subgroup, observed post-booster antibody GMCs for FHA, PT and diphtheria tended to be higher in the control versus the Tdap group.

3.3. Reactogenicity and safety

Solicited AEs were reported at similar rates in both groups, with redness at the DTaP-HepB-IPV/Hib injection site being the most common local (Tdap: 49.0%; control: 53.5%) and irritability the most common general solicited AE (Tdap: 63.2%; control: 68.4%) (Table 5). A minority of toddlers experienced grade 3 solicited AEs (Table 5). Large injection site reactions occurred in two toddlers in the Tdap group and three in the control at the DTaP-HepB-IPV/Hib site and in one toddler in each group at the PCV13 site. Reporting rates for unsolicited AEs were also similar

Table 1
Characteristics of participants in the total vaccinated cohort.

Parameter	Tdap group (N = 263)	Control group (N = 277)
Country, n (%)		
Australia	12 (4.6)	12 (4.3)
Canada	66 (25.1)	74 (26.7)
Czech Republic	32 (12.2)	35 (12.6)
Finland	20 (7.6)	29 (10.5)
Italy	4 (1.5)	4 (1.4)
Spain	129 (49.0)	123 (44.4)
Mean age $\pm$ SD at booster vaccination, months		
Overall	15.1 $\pm$ 2.5	14.9 $\pm$ 2.5
Australia	17.1	17.1
Canada	15.3	15.4
Czech Republic	12.9	13.2
Finland	12.3	12.3
Italy	11.8	11.5
Spain	16.7	16.6
Female sex, n (%)	122 (46.4)	125 (45.1)
Ethnic origin, n (%)		
White ^a	240 (91.3)	262 (94.6)
Asian	3 (1.1)	0 (0.0)
African/African American	4 (1.5)	8 (2.9)
Other	16 (6.1)	7 (2.5)
DTaP-HepB-IPV/Hib primary vaccination schedule, n (%)		
2-dose	26 (9.9)	36 (13.0)
3, 5 months	24 (9.1)	33 (11.9)
2, 4 months	2 (0.8)	3 (1.1)
3-dose	237 (90.1)	241 (87.0)
2, 4, 6 months	205 (77.9)	206 (74.4)
2, 3, 4 months	32 (12.2)	35 (12.6)
Maternal age category at pregnancy dose, n (%)		
18–24 years	4 (1.5)	12 (4.3)
25–34 years	164 (62.4)	172 (62.1)
35–45 years	95 (36.1)	93 (33.6)
Gestational age category at pregnancy dose, n (%)		
27–32 weeks	156 (59.3)	165 (59.6)
33–36 weeks	107 (40.7)	112 (40.4)

DTaP-HepB-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b vaccine; N, total number of infants per group; n (%), number (percentage) of infants in the specified category; SD, standard deviation; Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine.

^a Includes White – Caucasian/European heritage (majority) and White – Arabic/North African heritage (1 in Tdap and 3 in control group).

Table 2

Booster response rates, seropositivity rates and geometric mean concentrations for pertussis antibodies in toddlers before and 1 month after booster vaccination (ATP cohort for immunogenicity).

Antibody (Cut-off)	Time-point	Tdap group					Control group				
		N	Booster response ^a , % (95% CI)	N'	Sero-positivity, % (95% CI)	GMC, IU/mL (95% CI)	N	Booster response ^a , % (95% CI)	N'	Sero-positivity, % (95% CI)	GMC, IU/mL (95% CI)
Anti-FHA (2.046 IU/mL)	Pre	na	na	223	96.4 (93.1–98.4)	11.2 (9.6–13.1)	na	na	244	98.8 (96.4–99.7)	16.5 (14.4–18.8)
	Post	215	96.7 (93.4–98.7)	221	100 (98.3–100)	152.5 (136.3–170.6)	241	96.7 (93.6–98.6)	247	100 (98.5–100)	187.2 (172.7–202.9)
Anti-PRN (2.187 IU/mL)	Pre	na	na	223	83.9 (78.4–88.4)	6.9 (5.8–8.2)	na	na	244	87.3 (82.5–91.2)	9.6 (8.3–11.2)
	Post	214	98.1 (95.3–99.5)	220	100 (98.3–100)	333.9 (285.4–390.7)	241	99.6 (97.7–100)	247	100 (98.5–100)	262.3 (230.9–298.1)
Anti-PT (2.693 IU/mL)	Pre	na	na	223	68.6 (62.1–74.6)	4.4 (3.8–5.0)	na	na	244	82.4 (77.0–86.9)	6.3 (5.5–7.1)
	Post	215	92.1 (87.6–95.3)	221	99.5 (97.5–100)	52.4 (46.9–58.4)	241	97.5 (94.7–99.1)	247	100 (98.5–100)	80.3 (73.3–88.1)

%, percentage of toddlers who mounted a vaccine response or were seropositive (antibody concentration equal to or above the specified assay cut-offs); ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; FHA, filamentous hemagglutinin; GMC, geometric mean concentration; IU, international unit; N, number of toddlers with pre- and post-vaccination results available; N', number of toddlers with results available at the specified timepoint; na, not applicable; PRN, pertactin; PT, pertussis toxin; Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine.

^a Booster response to FHA, PRN and PT was defined as a post-vaccination concentration $\geq 4\times$ the assay cut-off for toddlers with a pre-vaccination concentration $< 4\times$ assay cut-off, a post-vaccination concentration $\geq 4\times$ the pre-vaccination concentration for toddlers with a pre-vaccination concentration between the assay cut-off and $< 4\times$ the assay cut-off, a post-vaccination concentration $\geq 2\times$ the pre-vaccination concentration for toddlers with a pre-vaccination concentration $\geq 4\times$ the assay cut-off.

between groups (Tdap: 35.7%; control: 40.1%), as were those for grade 3 AEs and AEs related to booster vaccination (Table 5). The most common related AEs were vomiting in the Tdap group (4 [1.5%] toddlers) and injection site mass in the control group (2 [0.7%] toddlers). No grade 3 unsolicited AEs were considered vaccination-related.

After the booster dose, three SAEs were reported in three toddlers in the control group (periorbital cellulitis [resolved after 13 days], pneumonia [resolved after 11 days] and sleep apnea syndrome [resolved after 133 days]). None of these were deemed vaccination-related. Before the booster dose, there was one fatality in the Tdap group: a 16-month-old toddler with congenital cytomegalovirus died as a result of several complications (enterovirus gastroenteritis, encephalopathy, astrovirus gastroenteritis, shock, increased intracranial pressure, dehydration and rhabdomyolysis). None of these complications were considered related to prior vaccination. This was the only participant who was withdrawn from the study due to an SAE.

During the maternal immunization trial, the infant and toddler studies, congenital anomalies were reported for 35 participants (10.4%, 95% CI 7.3–14.1%) in the Tdap group and 44 (12.9%, 9.5–16.9%) in the control group (Supplementary table 4). The most common congenital anomaly in both groups was atrial septal defect (Tdap: 1.5%, 0.5–3.4%; control: 2.3%, 1.0–4.6%).

At either 9 or 18 months of age, 11.5% of toddlers in the Tdap group and 11.0% in the control group had an ASQ-3 score below to cut-off for at least one neurodevelopmental domain; 40.0% and 52.9%, respectively, were referred for formal neurodevelopmental evaluation (based on BSID-III) and 4.6% and 5.8%, respectively, had at least one indicator of neurodevelopmental delay.

Supplementary Fig. 1 represents a plain language summary, summarizing the findings and highlighting their clinical relevance.

4. Discussion

This study showed that—as a consequence of the interference of maternally transferred Tdap-induced antibodies with the infant immune response to pertussis and diphtheria primary vaccination (as observed in the infant study [21])—antibody concentrations for

Table 3

Seroprotection rates and geometric mean concentrations or titers for diphtheria, tetanus, hepatitis B, poliovirus and Hib antibodies in toddlers before and 1 month after booster vaccination (ATP cohort for immunogenicity).

Antibody (Cut-off)	Time-points	Tdap group			Control group		
		N	Seroprotection, % (95% CI)	GMC or GMT (95% CI)	N	Seroprotection, % (95% CI)	GMC or GMT (95% CI)
Anti-D (0.1 IU/mL)	Pre	223	81.2 (75.4–86.1)	0.21 (0.18–0.23)	244	90.2 (85.7–93.6)	0.32 (0.29–0.36)
	Post	221	100 (98.3–100)	6.11 (5.58–6.70)	247	100 (98.5–100)	8.40 (7.69–9.17)
Anti-T (0.1 IU/mL)	Pre	223	96.4 (93.1–98.4)	0.75 (0.65–0.88)	244	95.1 (91.6–97.4)	0.58 (0.51–0.66)
	Post	221	100 (98.3–100)	8.20 (7.32–9.18)	247	100 (98.5–100)	6.76 (6.14–7.43)
Anti-HBs (10 mIU/mL)	Pre	219	94.1 (90.1–96.8)	158.7 (129.9–194.0)	243	94.2 (90.5–96.8)	193.4 (158.4–236.1)
	Post	216	99.5 (97.4–100)	4858.3 (3918.4–6023.7)	241	99.2 (97.0–99.9)	5031.2 (4072.7–6215.4)
Anti-polio 1 (8 ED50)	Pre	213	88.3 (83.2–92.3)	64.9 (52.0–80.9)	237	89.5 (84.8–93.1)	83.3 (67.7–102.5)
	Post	204	100 (98.2–100)	1611.7 (1381.2–1880.6)	228	100 (98.4–100)	1532.1 (1322.2–1775.3)
Anti-polio 2 (8 ED50)	Pre	210	89.5 (84.6–93.3)	71.7 (57.6–89.4)	236	91.1 (86.7–94.4)	79.2 (64.4–97.5)
	Post	201	100 (98.2–100)	2232.4 (1931.2–2580.5)	227	100 (98.4–100)	2371.2 (2097.9–2680.1)
Anti-polio 3 (8 ED50)	Pre	205	91.7 (87.1–95.1)	106.0 (84.1–133.4)	226	95.1 (91.5–97.5)	118.4 (97.0–144.5)
	Post	188	100 (98.1–100)	2944.6 (2529.4–3427.9)	210	100 (98.3–100)	2891.8 (2496.2–3350.2)
Anti-PRP (0.15 µg/mL)	Pre	222	72.5 (66.1–78.3)	0.37 (0.30–0.45)	244	68.0 (61.8–73.8)	0.29 (0.24–0.35)
	Post	221	100 (98.3–100)	26.19 (22.61–30.33)	247	99.6 (97.8–100)	19.71 (16.89–23.01)
Anti-PRP (1.0 µg/mL)	Pre	222	22.5 (17.2–28.6)		244	17.6 (13.1–23.0)	
	Post	221	99.5 (97.5–100)		247	97.6 (94.8–99.1)	

%, percentage of toddlers with antibody concentrations equal to or above the specified seroprotection cut-offs; ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; D, diphtheria; ED50, effective dose causing 50% effect; GMC, geometric mean concentration; GMT, geometric mean titer; HBs, hepatitis B surface antigen; Hib, *Haemophilus influenzae* type b; polio 1–3, poliovirus types 1–3; (m)IU, (milli)international unit; N, number of toddlers with available results; PRP, Hib polyribosylribitol phosphate; T, tetanus; Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine.

Table 4

Percentages of toddlers with pneumococcal serotype-specific antibody concentrations ≥ 0.35 µg/mL and geometric mean concentrations before and 1 month after booster vaccination (ATP cohort for immunogenicity).

Vaccine serotype	Time-point	Tdap group			Control group		
		N	% ≥ 0.35 µg/mL (95% CI)	GMC, µg/mL (95% CI)	N	% ≥ 0.35 µg/mL (95% CI)	GMC, µg/mL (95% CI)
1	Pre	211	28.9 (22.9–35.5)	0.22 (0.19–0.24)	232	39.2 (32.9–45.8)	0.27 (0.24–0.30)
	Post	208	100 (98.2–100)	3.22 (2.88–3.60)	236	100 (98.4–100)	3.64 (3.28–4.04)
3	Pre	211	3.8 (1.7–7.3)	0.08 (0.07–0.09)	232	5.2 (2.7–8.9)	0.10 (0.09–0.11)
	Post	208	79.3 (73.2–84.6)	0.59 (0.53–0.65)	235	79.6 (73.8–84.5)	0.62 (0.57–0.69)
4	Pre	209	13.4 (9.1–18.8)	0.15 (0.13–0.16)	232	27.2 (21.5–33.4)	0.19 (0.17–0.22)
	Post	208	99.5 (97.4–100)	2.91 (2.54–3.33)	234	99.1 (96.9–99.9)	3.28 (2.89–3.72)
5	Pre	211	47.4 (40.5–54.4)	0.33 (0.29–0.37)	229	54.1 (47.5–60.7)	0.34 (0.31–0.38)
	Post	204	100 (98.2–100)	2.66 (2.39–2.97)	229	99.1 (96.9–99.9)	2.81 (2.52–3.14)
6A	Pre	211	53.1 (46.1–60.0)	0.38 (0.33–0.43)	232	62.9 (56.4–69.2)	0.44 (0.39–0.50)
	Post	208	100 (98.2–100)	9.07 (8.05–10.22)	236	100 (98.4–100)	9.49 (8.45–10.67)
6B	Pre	211	45.5 (38.6–52.5)	0.29 (0.25–0.33)	232	49.6 (43.0–56.2)	0.33 (0.29–0.38)
	Post	208	100 (98.2–100)	7.83 (6.82–8.98)	236	99.6 (97.7–100)	8.00 (7.06–9.06)
7F	Pre	211	69.7 (63.0–75.8)	0.49 (0.44–0.54)	232	75.4 (69.4–80.8)	0.56 (0.51–0.61)
	Post	208	100 (98.2–100)	5.00 (4.55–5.50)	235	100 (98.4–100)	4.96 (4.50–5.48)
9 V	Pre	211	33.6 (27.3–40.5)	0.26 (0.23–0.29)	232	45.7 (39.2–52.3)	0.32 (0.28–0.36)
	Post	208	100 (98.2–100)	3.74 (3.35–4.16)	235	100 (98.4–100)	3.91 (3.52–4.35)
14	Pre	211	87.2 (81.9–91.4)	0.97 (0.85–1.11)	232	88.8 (84.0–92.5)	1.19 (1.04–1.37)
	Post	208	100 (98.2–100)	10.36 (9.22–11.64)	236	100 (98.4–100)	11.62 (10.34–13.06)
18C	Pre	211	19.9 (14.7–25.9)	0.19 (0.17–0.21)	232	34.1 (28.0–40.5)	0.23 (0.21–0.26)
	Post	208	99.5 (97.4–100)	3.23 (2.86–3.65)	236	100 (98.4–100)	3.57 (3.21–3.98)
19A	Pre	211	40.8 (34.1–47.7)	0.32 (0.27–0.37)	232	50.9 (44.2–57.5)	0.37 (0.32–0.43)
	Post	208	100 (98.2–100)	7.90 (7.06–8.83)	236	100 (98.4–100)	8.68 (7.82–9.63)
19F	Pre	211	49.3 (42.4–56.2)	0.37 (0.32–0.43)	232	61.6 (55.0–67.9)	0.47 (0.41–0.55)
	Post	208	100 (98.2–100)	7.66 (6.84–8.57)	236	100 (98.4–100)	8.63 (7.75–9.62)
23F	Pre	210	15.7 (11.1–21.4)	0.14 (0.12–0.16)	229	25.3 (19.8–31.5)	0.19 (0.16–0.22)
	Post	207	98.1 (95.1–99.5)	2.07 (1.83–2.34)	235	98.7 (96.3–99.7)	2.38 (2.10–2.69)

%, percentage of toddlers with antibody concentrations ≥ 0.35 µg/mL; ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; GMC, geometric mean concentration; N, number of toddlers with available results; Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine.

these antigens were still lower in toddlers from Tdap-vaccinated mothers before DTaP-HepB-IPV/Hib booster vaccination. After the booster, differences in antibody concentrations between toddlers from the Tdap versus the control group were still apparent for FHA, PT and diphtheria but not for PRN. While observed anti-FHA, anti-PT and anti-diphtheria antibody GMCs were lower in toddlers born to mothers who had received Tdap during pregnancy compared to mothers who had not, pre- to post-booster GMC increases were similarly high in both groups, as were booster response (for pertussis antigens) and seroprotection rates (for

diphtheria), indicating induction of immune memory in infants born to Tdap-vaccinated mothers.

For diphtheria, as all toddlers achieved seroprotective antibody levels after the booster dose, the clinical significance of the lower antibody GMCs is likely limited. For pertussis, the clinical relevance is difficult to ascertain since no correlate of protection has been established [35] and only humoral responses were assessed. Effectiveness studies in the UK and the US, and UK pertussis disease surveillance data do not indicate an increased risk of pertussis disease in the first and second years of life in infants and toddlers

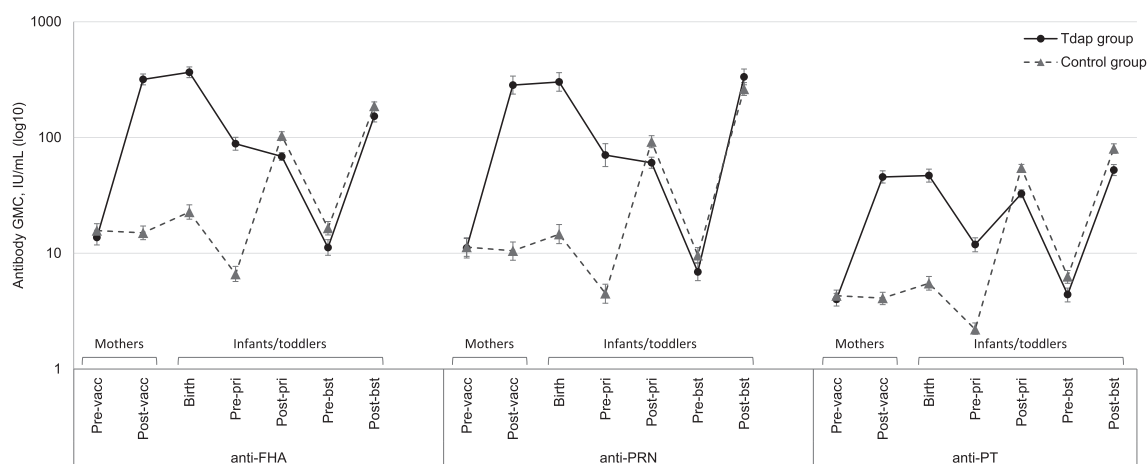


Fig. 3. Geometric mean concentrations for pertussis antibodies in mothers before and after the pregnancy dose and in infants and toddlers before and after primary and booster vaccination (ATP cohorts for immunogenicity). ATP, according-to-protocol; FHA, filamentous hemagglutinin; GMC, geometric mean concentration; IU, international unit; PRN, pertactin; PT, pertussis toxin; Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine. Error bars depict 95% confidence intervals. Timepoints: before and 30 days after the pregnancy dose (pre-vacc and post-vacc), birth (infant cord blood), before and 1 month after 2-dose or 3-dose primary vaccination (pre-pri and post-pri), before and 1 month after booster vaccination (pre-bst and post-bst).

Table 5
Solicited and unsolicited adverse events after booster vaccination (total vaccinated cohort).

Adverse event	Tdap group		Control group	
	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
		(N = 257)		(N = 275)
Pain				
Any	119	46.3 (40.1–52.6)	137	49.8 (43.8–55.9)
Grade 3	8	3.1 (1.4–6.0)	12	4.4 (2.3–7.5)
Redness				
Any	126	49.0 (42.8–55.3)	147	53.5 (47.4–59.5)
>20 mm	21	8.2 (5.1–12.2)	24	8.7 (5.7–12.7)
Swelling				
Any	103	40.1 (34.0–46.3)	106	38.5 (32.8–44.6)
>20 mm	16	6.2 (3.6–9.9)	16	5.8 (3.4–9.3)
		(N = 257)		(N = 274)
Pain				
Any	113	44.0 (37.8–50.3)	124	45.3 (39.3–51.4)
Grade 3	8	3.1 (1.4–6.0)	16	5.8 (3.4–9.3)
Redness				
Any	120	46.7 (40.5–53.0)	132	48.2 (42.1–54.3)
>20 mm	14	5.4 (3.0–9.0)	14	5.1 (2.8–8.4)
Swelling				
Any	87	33.9 (28.1–40.0)	86	31.4 (25.9–37.2)
>20 mm	9	3.5 (1.6–6.5)	15	5.5 (3.1–8.9)
		(N = 258)		(N = 275)
Drowsiness				
Any	128	49.6 (43.4–55.9)	138	50.2 (44.1–56.2)
Grade 3	5	1.9 (0.6–4.5)	7	2.5 (1.0–5.2)
Irritability				
Any	163	63.2 (57.0–69.1)	188	68.4 (62.5–73.8)
Grade 3	13	5.0 (2.7–8.5)	28	10.2 (6.9–14.4)
Loss of appetite				
Any	104	40.3 (34.3–46.6)	116	42.2 (36.3–48.3)
Grade 3	10	3.9 (1.9–7.0)	10	3.6 (1.8–6.6)
Fever^a				
Any	73	28.3 (22.9–34.2)	85	30.9 (25.5–36.7)
>39.0 °C	7	2.7 (1.1–5.5)	7	2.5 (1.0–5.2)
		(N = 263)		(N = 277)
Any	94	35.7 (29.9–41.9)	111	40.1 (34.3–46.1)
Grade 3	19	7.2 (4.4–11.1)	16	5.8 (3.3–9.2)
Related	10	3.8 (1.8–6.9)	10	3.6 (1.7–6.5)

AE, adverse event; CI, confidence interval; DTaP-HepB-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b vaccine; N, number of toddlers with the documented dose (for solicited AEs) or with the administered dose (for unsolicited AEs); n/%, number/percentage of toddlers for whom the specified AE was reported at least once during the follow-up period; PCV13, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; Tdap, tetanus-reduced-antigen-content diphtheria-acellular pertussis vaccine.

^a Any fever was defined as a temperature ≥ 37.5 °C (oral, axillary, tympanic), or ≥ 38.0 °C (rectal).

born to mothers vaccinated with pertussis-containing vaccines during pregnancy [13,14,43,44]. A transmission model by Bento and Rohani showed that maternal immunization is an effective strategy to protect newborns, but—depending on the settings—if maternal antibodies interfere with infant immune responses, increases in pertussis disease can be expected in older children, with a decade's (or more) delay [45]. Therefore, continuous surveillance is needed to monitor the pertussis incidence in different age groups in countries with maternal pertussis immunization programs. This will further elucidate the clinical impact of maternal immunization on protection conferred by pediatric vaccines in infants and toddlers. In addition, further research is needed to fully understand other factors that can influence clinical protection through maternal immunization. These include the immune response of pregnant woman to different vaccine antigens, the relevance of the quantity and composition of the antigens in inducing functional vaccine-specific immune responses, the optimal timing of vaccine administration in pregnancy, the duration of vaccine-induced protection in the mothers and their infants, and the role of breastmilk antibodies in protecting infants [46].

Our results are in line with those from randomized maternal immunization trials in Canada and the Netherlands, showing significantly lower antibody GMCs for FHA and PT (and PRN, in the Dutch trial only) after pertussis booster vaccination in toddlers born to women vaccinated versus not vaccinated with 5-component or 3-component Tdap during pregnancy [22,23]. A prospective cohort study in Belgium showed significantly lower post-booster anti-PT GMCs in toddlers from 3-component Tdap-vaccinated mothers versus unvaccinated mothers [47]. In other smaller studies, non-significant trends for lower post-booster antibody GMCs for some or all pertussis antigens were apparent in toddlers born to Tdap-vaccinated versus unvaccinated mothers [24,28,29]. A recent review considered the observed interference as a class effect of pertussis-containing vaccines, regardless of the type of maternal or childhood vaccine used [48].

Based on our subgroup analyses, interference was apparent regardless of the primary series dose schedule and the gestational and maternal age at the pregnancy Tdap dose; however, the small sample size in some of these subgroups limits interpretation of these analyses.

In the infant study, we found no evidence for interference of Tdap-induced maternal antibodies with the immune response to tetanus, hepatitis B, poliovirus or Hib, nor with the response to pneumococcal conjugates [21]. Likewise, in the toddler study, no interference was observed for these antigens prior to or after DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 booster vaccination. While this is largely in line with previous studies [23,49,50], some have shown higher post-primary or post-booster tetanus responses [25,26,28,29] and lower responses to a number of pneumococcal conjugates after the primary infant series [26,49–51], which mostly disappeared post-booster [49,51].

The reactogenicity and safety profiles of the DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 booster doses in toddlers did not change depending on the exposure/non-exposure to Tdap during pregnancy. Solicited and unsolicited AE rates were similar between groups, no vaccination-related SAEs were reported and no differences were observed in terms of neurodevelopment and congenital anomalies.

Limitations of our study include a limited generalizability because the study was performed in high-income countries and mothers were mostly white Caucasian with low-risk pregnancies. In addition, because our study was descriptive and no adjustments for multiple comparisons were made, the observed differences between toddlers from mothers who received Tdap during pregnancy compared to after pregnancy cannot be taken as evidence of statistically significant differences between these two groups.

5. Conclusion

Our randomized, placebo-controlled maternal immunization trial and follow-up infant and toddler studies showed that Tdap-induced pertussis antibodies were transferred efficiently from vaccinated mothers to their infants and persisted in infants during their first vulnerable months of life. However, these antibodies caused interference with the immune response to pertussis primary vaccination, the effect of which was still apparent before boosting for the three pertussis antigens and after boosting for FHA and PT. The clinical relevance of this interference requires further evaluation through continuous long-term monitoring of the pertussis incidence in older infants and children in countries with a maternal pertussis immunization program. We found no evidence for interference with the response to the other DTaP-HepB-IPV/Hib or PCV13 antigens, aside from potential minimal interference for diphtheria. The reactogenicity/safety profiles of DTaP-HepB-IPV/Hib and PCV13 in toddlers did not change depending on the exposure/non exposure to Tdap during pregnancy.

Funding

This work was supported by GlaxoSmithKline Biologicals S.A., which was the funding source, was involved in all stages of the study conduct and analysis and paid for all costs associated with the development and publishing of this manuscript.

Author contributions

MB, BC, SAH, PK, LK, SOK, FMT, NMes, TN, KPP, ZS and GVZ were involved in study conception and design. BAN, MB, JB, MAC, MJCO, EEP, JGS, SAH, JJ, PK, LK, PGM, FMT, JMMA, NMes, NMey, MMV, TN, KPP, JTRA, SR, ISC, ZS, BT, OGV, MV and GVZ performed the study or participated in data collection. MAC, BC, SAH, LK, SOK, PGM, FMT, JMMA, NMes, NMey, MMV, TN, KPP, ZS, BT, OV and MV were involved in data analysis and/or interpretation. All authors had access to the data and granted their final approval of the paper before submission.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: BAN reports grants from the GSK group of companies (GSK) and support from other vaccine manufacturers. BC, MAC, NMes, NMey and SOK are employees of GSK, and BC, MAC and NMes own GSK restricted shares. FMT, JGS, SAH, TN and KPP's institutions received grants from GSK during the conduct of the study. FMT's institution received financial and non-financial support from Abl-ynx, Astra Zeneca, GSK, Jansen, MedImmune, MSD, Novavax, Pfizer, Regeneron, Roche, Sanofi Pasteur and Seqirus outside the submitted work. SAH received honoraria for participation in ad-hoc advisory committees for GSK and Sanofi Pasteur. TN received personal fees from GSK for serving as chair of advisory committees outside the submitted work. BT's institution received grants from GSK during the conduct of the study; research grants for clinical trials were also given to his institution by Pfizer, MSD and Sanofi Pasteur. KPP received a fellowship from National Health and Medical Research Council for conducting the present work, and her institution received financial support from DBV Technologies, MedImmune, Novavax and Pfizer for conducting trials outside the submitted work. ISC has received grants and/or honoraria as a consultant/advisor or to attend conferences and practical courses from GSK, Sanofi Pasteur, MSD and Pfizer outside the submitted work. JMMA reports receiving fees and non-financial support from GSK, as well

as fees from Pfizer and MSD outside the submitted work. LK is working as consultant for GSK. MB, JB, MJCO, EEP, JJ, MMV, PK, PGM, JTRA, SR, ZS, MV, OGV and GVZ declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank all mothers and infants for participating in the study, the members of the independent data monitoring committee and all the research staff at participating centers, in particular, Dr. L Redondo-Collazo, Dr. C Rodríguez-Tenreiro, Dr. M Macías-Cortinas, and Dr. I Rivero-Calle from Hospital Clínico Universitario de Santiago; Dr. S Natalini from Hospital Universitario Madrid Sanchinarro; Dr. I Coro, from Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan; Dr. M Kacerovsky from University Hospital Hradec Kralove; and L Campora and A Kuznetsova from the safety team at GSK, Wavre.

The authors also thank Modis for editorial assistance and manuscript coordination, on behalf of GSK: Natalie Denef provided medical writing support and Quentin Deraedt coordinated the manuscript development and provided editorial support.

Trademarks

Boostrix and Infanrix Hexa are trademarks of the GSK group of companies. Prevnar 13 is a trademark of Pfizer Inc.

Data sharing

The study protocol is available at <https://www.gsk-studyregister.com/study/5350>. Anonymized individual participant data and study documents can be requested for further research from www.clinicalstudydatarequest.com.

All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship.

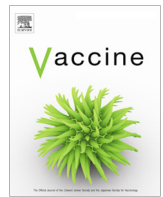
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.02.001>.

References

- Munoz FM. Current Challenges and Achievements in Maternal Immunization Research. *Front Immunol* 2018;9:436. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00436>.
- World Health Organization SAGE pertussis working group. Background paper; SAGE April 2014. http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1_Pertussis_background_FINAL4_web.pdf [accessed 27 February 2020].
- Masseria C, Martin CK, Krishnarajah G, Becker LK, Buikema A, Tan TQ. Incidence and Burden of Pertussis Among Infants Less Than 1 Year of Age. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:e54–61. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001440>.
- Kandeil W, van den Ende C, Bunge EM, Jenkins VA, Ceregado MA, Guignard A. A systematic review of the burden of pertussis disease in infants and the effectiveness of maternal immunization against pertussis. *Expert Rev Vaccines* 2020;19:621–38. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1791092>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women and persons who have or anticipate having close contact with an infant aged <12 months – Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011;60:1424–6.
- Department of Health and Social Care. Whooping Cough Vaccination Programme for Pregnant Women. <https://www.gov.uk/government/publications/whooping-cough-vaccination-programme-for-pregnant-women>. 2012 [accessed 27 February 2020].
- Gkentzi D, Katsakiori P, Marangos M, Hsia Y, Amirthalingam G, Heath PT, et al. Maternal vaccination against pertussis: a systematic review of the recent literature. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2017;102:F456–63. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-312341>.
- World Health Organization. Pertussis vaccines: WHO position paper – September 2015. *Wkly Epidemiol Rec* 2015;90:433–58.
- Vygen-Bonnet S, Hellenbrand W, Garbe E, von Kries R, Bogdan C, Heininger U, et al. Safety and effectiveness of acellular pertussis vaccination during pregnancy: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2020;20:136. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4824-3>.
- Donegan K, King B, Bryan P. Safety of pertussis vaccination in pregnant women in UK: observational study. *BMJ* 2014;349:g4219.
- Kharbanda EO, Vazquez-Benitez G, Lipkind HS, Klein NP, Cheetham TC, Naleway A, et al. Evaluation of the association of maternal pertussis vaccination with obstetric events and birth outcomes. *JAMA* 2014;312:1897–904. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14825>.
- Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Donegan K, et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet* 2014;384:1521–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60686-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60686-3).
- Amirthalingam G, Campbell H, Ribeiro S, Fry NK, Ramsay M, Miller E, et al. Sustained Effectiveness of the Maternal Pertussis Immunization Program in England 3 Years Following Introduction. *Clin Infect Dis* 2016;63:S236–43. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw559>.
- Baxter R, Bartlett J, Fireman B, Lewis E, Klein NP. Effectiveness of Vaccination During Pregnancy to Prevent Infant Pertussis. *Pediatrics* 2017;139:. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-4091>.
- Bellido-Blasco J, Guiral-Rodrigo S, Miguez-Santiyan A, Salazar-Cifre A, Gonzalez-Moran F. A case-control study to assess the effectiveness of pertussis vaccination during pregnancy on newborns, Valencian community, Spain, 1 March 2015 to 29 February 2016. *Euro Surveill* 2017;22:30545. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2017.22.22.30545>.
- Dabrera G, Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, et al. A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012–2013. *Clin Infect Dis* 2015;60:333–7. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu821>.
- Saul N, Wang K, Bag S, Baldwin H, Alexander K, Chandra M, et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in preventing infection and disease in infants: The NSW Public Health Network case-control study. *Vaccine* 2018;36:1887–92. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.047>.
- Romanin V, Acosta AM, Juarez MDV, Briere E, Sanchez SM, Cordoba BL, et al. Maternal Vaccination in Argentina: Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Vaccine Effectiveness During Pregnancy in Preventing Pertussis in Infants <2 Months of Age. *Clin Infect Dis* 2020;70:380–7. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz217>.
- Fernandes EG, Sato APS, Vaz-de-Lima LRA, Rodrigues M, Leite D, de Brito CA, et al. The effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in Brazil: A case-control study. *Vaccine* 2019;37:5481–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.03.049>.
- Perrett KP, Halperin SA, Nolan T, Martínez Pancorbo C, Tapiero B, Martín-Torres F, et al. Immunogenicity, transplacental transfer of pertussis antibodies and safety following pertussis immunization during pregnancy: Evidence from a randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine* 2020;38:2095–104. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.105>.
- Perrett KP, Halperin SA, Nolan T, Carmona Martínez A, Martín-Torres F, García-Sicilia J, et al. Impact of tetanus-diphtheria-acellular pertussis immunization during pregnancy on subsequent infant immunization seroresponses: follow-up from a large randomized placebo-controlled trial. *Vaccine* 2020;38:2105–14. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.104>.
- Barug D, Pronk I, van Houten MA, Versteegh FGA, Knol MJ, van de Kasstelee J, et al. Maternal pertussis vaccination and its effects on the immune response of infants aged up to 12 months in the Netherlands: an open-label, parallel, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2019;19:392–401. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30717-5](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30717-5).
- Halperin SA, Langley JM, Ye L, MacKinnon-Cameron D, Elsherif M, Allen VM, et al. A Randomized Controlled Trial of the Safety and Immunogenicity of Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Vaccine Immunization During Pregnancy and Subsequent Infant Immune Response. *Clin Infect Dis* 2018;67:1063–71. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy244>.
- Hardy-Fairbanks AJ, Pan SJ, Decker MD, Johnson DR, Greenberg DP, Kirkland KB, et al. Immune responses in infants whose mothers received Tdap vaccine during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:1257–60. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182a09b6a>.
- Hoang HT, Leuridan E, Maertens K, Nguyen TD, Hens N, Vu NH, et al. Pertussis vaccination during pregnancy in Vietnam: Results of a randomized controlled trial Pertussis vaccination during pregnancy 151–159. *Vaccine* 2016;34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.098>.
- Ladhani SN, Andrews NJ, Southern J, Jones CE, Amirthalingam G, Waight PA, et al. Antibody responses after primary immunization in infants born to women receiving a pertussis-containing vaccine during pregnancy: single arm observational study with a historical comparator. *Clin Infect Dis* 2015;61:1637–44. <https://doi.org/10.1093/cid/civ695>.
- Maertens K, Cabore RN, Huygen K, Hens N, Van Damme P, Leuridan E. Pertussis vaccination during pregnancy in Belgium: Results of a prospective controlled cohort study. *Vaccine* 2016;34:142–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.100>.
- Maertens K, Hoang TT, Nguyen TD, Cabore RN, Duong TH, Huygen K, et al. The Effect of Maternal Pertussis Immunization on Infant Vaccine Responses to a Booster Pertussis-Containing Vaccine in Vietnam. *Clin Infect Dis* 2016;63: S197–204. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw551>.
- Munoz FM, Bond NH, Maccato M, Pinell P, Hammill HA, Swamy GK, et al. Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis

- (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;311:1760–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3633>.
- [30] Villarreal Perez JZ, Ramirez Aranda JM, de la O Cavazos M, Zamudio Osuna MJ, Perales Davila J, Ballesteros Elizondo MR, et al. Randomized clinical trial of the safety and immunogenicity of the Tdap vaccine in pregnant Mexican women. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13:128–35. 10.1080/21645515.2016.1232786.
- [31] Camargo ME, Silveira L, Furuta JA, Oliveira EP, Germek OA. Immunoenzymatic assay of anti-diphtheric toxin antibodies in human serum. *J Clin Microbiol* 1984;20:772–4.
- [32] Melville-Smith ME, Seagroatt VA, Watkins JT. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the toxin neutralization test in mice as a method for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand* 1983;11:137–44.
- [33] Anderson P. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1984;149:1034–5.
- [34] Kayhty H, Peltola H, Karanko V, Makela PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1983;147:1100.
- [35] Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1055–65. <https://doi.org/10.1128/cvi.00131-10>.
- [36] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1991;40:1–25.
- [37] Jack AD, Hall AJ, Maine N, Mendy M, Whittle HC. What level of hepatitis B antibody is protective? *J Infect Dis* 1999;179:489–92. <https://doi.org/10.1086/314578>.
- [38] World Health Organization Expanded Programme on Immunization. Guidelines for WHO/EPI collaborative studies on poliomyelitis: standard procedure for determining immunity to poliovirus using the microneutralization test. <http://www.who.int/iris/handle/10665/70486>. 1993 [accessed 2 March 2020].
- [39] Feyssaguet M, Bellanger A, Nozay F, Friel D, Merck E, Verlant V, et al. Comparison between a new multiplex electrochemiluminescence assay and the WHO reference enzyme-linked immunosorbent assay to measure serum antibodies against pneumococcal serotype-specific polysaccharides. *Vaccine* 2019;37:2208–15. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.03.011>.
- [40] Siber GR, Chang I, Baker S, Fernsten P, O'Brien KL, Santosham M, et al. Estimating the protective concentration of anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibodies. *Vaccine* 2007;25:3816–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.119>.
- [41] Squires J, Bricker D. Ages & Stages Questionnaires®, Third Edition (ASQ-3™). A parent-completed child-monitoring system. Baltimore: Paul H. Brookes Publishing Co.; 2009.
- [42] Bayley N. *Manual for the Bayley Scales of Infant and Toddler Development*. San Antonio, TX: NCS Pearson; 2006.
- [43] Becker-Dreps S, Butler AM, McGrath LJ, Boggess KA, Weber DJ, Li D, et al. Effectiveness of Prenatal Tetanus, Diphtheria, Acellular Pertussis Vaccination in the Prevention of Infant Pertussis in the U.S. *Am J Prev Med* 2018;55:159–66. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.04.013>.
- [44] Public Health England. Pertussis: laboratory confirmed cases reported in England 2018 – Laboratory confirmed cases of pertussis (England): annual report for 2018. <https://www.gov.uk/government/publications/pertussis-laboratory-confirmed-cases-reported-in-england-2018#history>. 2018 [accessed 2 March 2020].
- [45] Bento AI, Rohani P. Forecasting Epidemiological Consequences of Maternal Immunization. *Clin Infect Dis* 2016;63:S205–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw557>.
- [46] Albrecht M, Arck PC. Vertically Transferred Immunity in Neonates: Mothers, Mechanisms and Mediators. *Front Immunol* 2020;11:555. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00555>.
- [47] Maertens K, Cabore RN, Huygen K, Vermeiren S, Hens N, Van Damme P, et al. Pertussis vaccination during pregnancy in Belgium: Follow-up of infants until 1 month after the fourth infant pertussis vaccination at 15 months of age. *Vaccine* 2016;34:3613–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.066>.
- [48] Kandeil W, Savic M, Ceregido MA, Guignard A, Kuznetsova A, Mukherjee P. Immune interference (blunting) in the context of maternal immunization with Tdap-containing vaccines: is it a class effect?. *Expert Rev Vaccines* 2020;19:341–52. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1749597>.
- [49] Barug D, Berbers GAM, van Houten MA, Kuijter M, Pronk I, Knol MJ, et al. Infant antibody levels following 10-valent pneumococcal-protein D conjugate and DTaP-Hib vaccinations in the first year of life after maternal Tdap vaccination: An open-label, parallel, randomised controlled trial. *Vaccine* 2020;38:4632–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.001>.
- [50] Zimmermann P, Perrett KP, Messina NL, Donath S, Ritz N, van der Klis FRM, et al. The Effect of Maternal Immunisation During Pregnancy on Infant Vaccine Responses. *EClinicalMedicine* 2019;13:21–30. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2019.06.010>.
- [51] Maertens K, Burbidge P, Van Damme P, Goldblatt D, Leuridan E. Pneumococcal Immune Response in Infants Whose Mothers Received Tetanus, Diphtheria and Acellular Pertussis Vaccination During Pregnancy. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:1186–92. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001601>.



Immunogenicity and safety of 11- and 12-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D-conjugate vaccines (11vPHiD-CV, 12vPHiD-CV) in infants: Results from a phase II, randomised, multicentre study



Alfonso Carmona Martínez ^a, Roman Prymula ^{b,*}, Mariano Miranda Valdivieso ^c, Maria del Carmen Otero Reigada ^d, Jose Manuel Merino Arribas ^e, Jerzy Brzostek ^f, Leszek Szenborn ^g, Renata Ruzkova ^h, Michael R. Horn ⁱ, Teresa Jackowska ^j, Fernando Centeno-Malfaz ^k, Magali Traskine ^l, Kurt Dobbelaere ^{l,1}, Dorota Borys ^l

^a Instituto Hspalense de Pediatría, C/ Manuel Siurot 45, 41013 Sevilla, Spain

^b Department of Social Medicine, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic

^c Hospital de Antequera, Avenida Poeta Muñoz Rojas, s/n, 29200 Antequera, Málaga, Spain

^d La Fe Hospital, Avinguda de Fernando Abril Martorell, 106, 46026 Valencia, Spain

^e Pediatric Department, Burgos University Hospital, Avenida Islas Baleares, s/n, 09006 Burgos, Spain

^f Health Care Establishment in Debica, Infectious Diseases Outpatient Clinic, ul. Krakowska 91, 39-200 Debica, Poland

^g Department of Paediatric Infectious Diseases, Wrocław Medical University, 2-2A, Chalubinskiego, 50-368 Wrocław, Poland

^h Pediatric Office Dr. Renata Ruzkova, Kladenska 53, Medicentrum 6, s.r.o., 160 00 Prague, Czech Republic

ⁱ Pediatric Office Dr. Med. Michael Horn, Achenweg 1, 83471 Schöna am Königssee, Germany

^j Department of Pediatrics, Centre of Postgraduate Medical Education, ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warsaw, Poland

^k Department of Pediatrics, Rio Hortega University Hospital, Calle Dulzaina, 2, 47012 Valladolid, Spain

^l GSK, Av. Fleming 20, 1300 Wavre, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2018

Received in revised form 24 June 2018

Accepted 11 July 2018

Available online 24 July 2018

Keywords:

Pneumococcal conjugate vaccine

PHiD-CV

Immunogenicity

Non-inferiority

Safety

Infants/children

ABSTRACT

Background: We assessed 2 investigational 11- and 12-valent vaccines, containing capsular polysaccharides of 10 serotypes as in the pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D-conjugate vaccine (PHiD-CV) and CRM₁₉₇-conjugated capsular polysaccharides of serotypes 19A (11-valent) or 19A and 6A (12-valent).

Methods: In this phase II, partially-blind, multicentre study (NCT01204658), healthy infants were randomised (1:1:1:1) to receive 11vPHiD-CV, 12vPHiD-CV, PHiD-CV, or 13-valent CRM₁₉₇-conjugate pneumococcal vaccine (PCV13), at 2, 3, and 4 (primary series), and 12–15 months of age (booster dose), co-administered with DTPa-HBV-IPV/Hib. Confirmatory objectives assessed non-inferiority of investigational vaccines to comparators (PHiD-CV for common serotypes; PCV13 for 19A and 6A), in terms of percentage of infants with pneumococcal antibody concentrations ≥ 0.2 µg/mL and antibody geometric mean concentrations, post-primary vaccination. Reactogenicity and safety were assessed.

Results: 951 children received ≥ 1 primary dose, 919 a booster dose. Pre-defined immunological non-inferiority criteria were met simultaneously for 9/11 11vPHiD-CV serotypes (all except 23F and 19A) and 10/12 12vPHiD-CV serotypes (all except 19A and 6A); thus, non-inferiority objectives were reached.

Abbreviations: AE, adverse event; ATP, according-to-protocol; CI, confidence interval; CRM197, non-toxic cross-reacting mutant of diphtheria toxin isolated from cultures of *Corynebacterium diphtheriae* strain C7 (β197); DTPa-HBV-IPV/Hib, diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B-inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b vaccine; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ELU, ELISA units; GMC, geometric mean concentration; GMT, geometric mean titre; IgG, immunoglobulin G; IPD, invasive pneumococcal disease; OPA, opsonophagocytic activity; PCV, pneumococcal conjugate vaccine; PHiD-CV, pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D-conjugate vaccine; SAE, serious adverse event; TT, tetanus toxoid; TVC, total vaccinated cohort; UL, upper limit; WHO, World Health Organization.

* Corresponding author.

E-mail addresses: alfonsocarmona@ihppediatrica.com (A. Carmona Martínez), prymula@fnhk.cz (R. Prymula), mariano.miranda@andaluciajunta.es (M. Miranda Valdivieso), otero_car@gva.es (M.C. Otero Reigada), jerzy_br@poczta.onet.pl (J. Brzostek), leszek.szenborn@umed.wroc.pl (L. Szenborn), druzukova@email.cz (R. Ruzkova), info@drhorn.de (M.R. Horn), tjackowska@cmkp.edu.pl (T. Jackowska), fcenotenoma@saludcastillayleon.es (F. Centeno-Malfaz), magali.x.traskine@gsk.com (M. Traskine), dorota.d.borys@gsk.com (D. Borys).

¹ Current: Medical consultant.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.023>

0264-410X/© 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

For each PHiD-CV serotype, percentages of children with antibody concentrations $\geq 0.2 \mu\text{g/mL}$ were $\geq 96.7\%$ post-primary (except 6B [$\geq 75.2\%$] and 23F [$\geq 81.1\%$]), and $\geq 98.1\%$ post-booster vaccination. For each PHiD-CV serotype except serotype 1, $\geq 81.0\%$ and $\geq 93.9\%$ of children had opsonophagocytic activity titres ≥ 8 , post-primary and booster vaccination. AEs incidence was similar across all groups. SAEs were reported for 117 children (29 in the 11vPHiD-CV group, 26 in the 12vPHiD-CV group, 38 in the PHiD-CV group and 24 in the PCV13 group); 4 SAEs were considered vaccination-related. No fatal events were recorded.

Conclusion: Addition of 19A and 6A CRM₁₉₇-conjugates did not alter immunogenicity of the PHiD-CV conjugates; for both investigational vaccines post-booster immune responses to 10 common serotypes appeared similar to those elicited by PHiD-CV. Safety and reactogenicity profiles of the investigational vaccines were comparable to PHiD-CV.

Clinical trial registry: NCT01204658.

© 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae is an important cause of childhood diseases, including acute otitis media, pneumonia, non-invasive and invasive pneumococcal disease (IPD), which together account for a large proportion of deaths in children <5 years of age worldwide [1].

Two pneumococcal conjugate vaccines (PCVs) are currently widely used and have shown effectiveness against various pneumococcal diseases: the pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D-conjugate vaccine (PHiD-CV, Synflorix, GSK) [2] and the 13-valent CRM₁₉₇-conjugate PCV (PCV13, Prevnar 13/Prevnar 13, Pfizer) [3]. These PCVs contain 10 and 13 pneumococcal antigens, respectively and additionally offer the potential to protect against vaccine-related serotypes belonging to the same serogroups as those contained in the vaccines. For example, PHiD-CV was shown to offer protection against disease due to serotype 19A through cross-reactive antibodies elicited by the 19F polysaccharide conjugate [4].

There is growing evidence showing that PHiD-CV and PCV13 have a comparable, significant impact on IPD [5,6]. However, despite their success, the burden of disease caused by serotypes not included in these vaccines remains important [7]. This could potentially be addressed by adding more polysaccharide conjugates to currently licensed formulations. However, adding additional antigens could lead to increased reactogenicity or immunological interference, as previously observed for other vaccines [8,9], and this possibility needs to be assessed.

We evaluated the immunogenicity and safety of 2 investigational 11- and 12-valent PHiD-CV vaccines that include capsular polysaccharides of serotypes 19A (11vPHiD-CV) and 6A and 19A (12vPHiD-CV) conjugated to CRM₁₉₇.

This study aimed to demonstrate immunological non-inferiority of 11vPHiD-CV and 12vPHiD-CV when compared to the 2 licensed vaccines, 1 month after a 3-dose primary vaccination.

2. Methods

2.1. Study design and participants

This was a phase II, randomised, partially-blind, multicentre study conducted in Czech Republic, Germany, Poland and Spain, between July 2012 and January 2014.

Healthy infants 6–12 weeks of age who had not been previously vaccinated against *S. pneumoniae* and did not meet any of the exclusion criteria (Supplementary Material, Text S1) were enrolled in the study, after written informed consent was obtained from parents or legally acceptable representatives.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.023>.

Infants were randomised (1:1:1:1) into 4 groups to receive 1 of the 2 investigational vaccines (11vPHiD-CV or 12vPHiD-CV), PHiD-CV, or PCV13, administered at approximately 2, 3, and 4 months (primary series) and 12–15 months of age (booster dose) (3 + 1 schedule).

Investigational study vaccines are described in Text S2. A diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B-inactivated poliovirus and *H. influenzae* type b vaccine (DTPa-HBV-IPV/Hib, Infanrix hexa, GSK) was co-administered as part of the routine immunisation programme. To comply with the national immunisation schedule, all Spanish children also received a licensed meningococcal serogroup C-tetanus toxoid conjugate vaccine, administered concomitantly with the study vaccine at approximately 2, 4 and 12–15 months of age.

Treatment allocation was performed by a central internet-based randomisation system through a minimisation algorithm accounting for study centre. The study was conducted in a partially-blinded manner: double-blind for the 3 PHiD-CV groups, but single-blind (investigators were aware of the administered vaccine) for the PCV13 group, due to differences in the vaccines' presentation.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the principles of Good Clinical Practice. The protocol, amendments, and informed consent forms were reviewed and approved by national Independent Ethics Committees. The study is registered at ClinicalTrials.gov (NCT01204658) and available at <https://www.gsk-clinicalstudyregister.com/study/116485>.

2.2. Study objectives

The first co-primary objectives were to demonstrate that 11vPHiD-CV co-administered with DTPa-HBV-IPV/Hib as a 3-dose primary vaccination course is non-inferior for at least 9 out of 11 vaccine pneumococcal serotypes to PHiD-CV (for 10 serotypes) or to PCV13 (for 19A) in terms of percentage of children with antibody concentrations $\geq 0.2 \mu\text{g/mL}$ and antibody geometric mean concentrations (GMCs). The second co-primary objectives assessed non-inferiority of 12vPHiD-CV in the same terms, for at least 10 out of 12 pneumococcal serotypes to PHiD-CV (for 10 serotypes) and to PCV13 (for 6A and 19A).

Secondary objectives included assessing the immune response to pneumococcal serotype-specific polysaccharides and to protein D post-primary and post-booster vaccination, antibody persistence 8–11 months after the last primary dose, and safety and reactogenicity of the 2 investigational vaccines.

2.3. Immunogenicity

Blood samples of approximately 3.5 mL (pre-vaccination) or 5 mL (1 month post-primary vaccination, pre- and 1 month post-booster vaccination) were collected and sera were stored at maximum -20°C . Pneumococcal serotype-specific immunoglobulin G (IgG) antibodies were measured by 22F-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [10]. For each group, immune responses to each serotype were expressed as antibody GMCs and the percentage of children with IgG concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$, which is equivalent to concentrations of $\geq 0.35\text{ }\mu\text{g/mL}$ as measured by the non-22F ELISA of the World Health Organization (WHO) reference laboratory [11]. Antibody opsonophagocytic activity (OPA) was measured by a killing-assay [12] and assessed as the percentage of children with titres ≥ 8 and geometric mean titres (GMTs). Anti-protein D antibodies were quantified by an in-house ELISA with a cut-off of 100 ELISA Units (ELU)/mL.

2.4. Safety and reactogenicity

All events were reported by parents or legally acceptable representatives using diary cards. Solicited local and general symptoms within 4 days post-vaccination (days 0–3), and unsolicited adverse events (AEs) within 31 days post-vaccination (days 0–30), graded by intensity, were recorded. Large swelling reactions were recorded post-booster dose. Serious adverse events (SAEs) were defined as any untoward medical occurrences that resulted in death, were life-threatening, required or prolonged hospitalisation, or resulted in disability or incapacity, and were collected throughout the study.

2.5. Statistical analyses

A total of 940 infants (235 per group) were to be enrolled. Assuming 85% of enrolled participants would be evaluable, power of the study to demonstrate non-inferiority was 97% for the first confirmatory objective and 90% for the second one (Text S3).

Immunogenicity analyses were performed on the according-to-protocol (ATP) cohorts for immunogenicity for primary or booster vaccination, which included all evaluable study participants (according to the eligibility criteria and compliance with the study procedures) with available assay results for at least 1 study vaccine component. OPA and protein D analyses were carried out on subsets of approximately 50% of randomly selected children from each group.

Non-inferiority of 11vPHiD-CV was demonstrated if the upper limit (UL) of the 2-sided 95.9% CI (1-sided $\alpha = 2.05\%$) of the difference in percentages of infants with pneumococcal antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ between comparator and investigational groups was lower than 10%, and if the UL of GMC ratios (comparator/investigational group) was below a limit of 2 for at least 9 out of 11 vaccine pneumococcal serotypes. Non-inferiority of 12vPHiD-CV was assessed as a second sequential co-primary objective using the UL of the 2-sided 95.8% CI (1-sided $\alpha = 2.08\%$), with the same non-inferiority criteria for at least 10 out of 12 serotypes. The study power was sufficient to demonstrate non-inferiority for 9/11 (for 11vPHiD-CV) or 10/12 (for 12vPHiD-CV) serotypes, in line with the WHO guidance that meeting non-inferiority criteria for each serotype contained in the candidate vaccine is not an absolute requirement [13]. All other comparisons were descriptive, and they should be interpreted with caution, since no adjustment for multiplicity was performed.

Safety and reactogenicity assessments were carried out on total vaccinated cohorts (TVCs) for primary or booster vaccination, which included all children who received at least 1 primary dose, or the booster dose, respectively. The percentages of doses

followed by solicited and unsolicited AEs, grade 3 symptoms and AEs with causal relationship to vaccination were tabulated with exact 95% CI for each group.

Analyses were performed using SAS in SAS Drug and Development web portal.

3. Results

3.1. Demographics

The TVC included 951 children for primary vaccination, and 919 for booster vaccination. Distribution among groups and reasons for exclusion from the ATP cohorts for immunogenicity are detailed in Fig. 1. The groups were balanced in terms of age and sex distribution; most participants were of White Caucasian heritage (Table S1).

3.2. Immunogenicity

3.2.1. Non-inferiority assessment

One month post-primary vaccination, for the difference between the comparator and 11vPHiD-CV group in the percentage of infants with pneumococcal antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ the ULs of the 95.9% CIs were below the non-inferiority margin for each of the 10 PHiD-CV serotypes except 23F (Fig. 2A, Table S2). Non-inferiority criteria in terms of antibody GMC ratios between the comparator and 11vPHiD-CV groups were also met for all serotypes, except 19A (Fig. 2B, Table S3). Non-inferiority of the investigational 11vPHiD-CV was therefore demonstrated.

For 10 of the 12vPHiD-CV serotypes (all except 23F and 6A), the UL of the 2-sided 95.8% CI of the difference in the percentage of children with antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ between comparator and 12vPHiD-CV vaccines was below 10%. The ULs of the 95.8% CIs of the antibody GMC ratios were below the non-inferiority margin for each of the 10 PHiD-CV serotypes, and above it for serotypes 19A and 6A (Fig. 2B, Table S3). Therefore, 12vPHiD-CV was shown to be non-inferior to comparator vaccines.

3.3. Immune response to pneumococcal serotypes and protein D

One month post-primary vaccination, for each of the 10 PHiD-CV serotypes except 6B and 23F, at least 96.7% of infants in the groups receiving the investigational vaccines had antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$. In the comparator groups, these percentages were at least 94.5%, except for serotypes 6B and 23F in the PHiD-CV group. For serotype 19A, antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ were observed in at least 95.8% of infants in both investigational groups, and for serotype 6A in 88.3% of infants in the 12vPHiD-CV group. In the comparator (PCV13) group, this percentage was 99.5% for both serotypes (Table 1).

Pre-booster dose, for each of the 10 PHiD-CV serotypes except serotype 1, at least 83.1% of infants in the investigational groups had antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$, compared to 86.4% in the PHiD-CV group (Table 1). For serotype 19A, the percentages of infants with antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ were 76.9% and 73.9% in 11vPHiD-CV and 12vPHiD-CV groups respectively, compared to 76.4% in the PCV13 group. For serotype 6A, 94.4% and 90.7% of infants in the 12vPHiD-CV and PCV13 groups, respectively, had antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Table 1).

One month post-booster vaccination, for each PHiD-CV serotype and serotype 19A, the percentages of toddlers with antibody concentrations $\geq 0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ in both investigational groups increased to at least 98.1% (Table 1).

For each of the PHiD-CV serotypes, antibody GMCs increased from pre-vaccination levels post-primary vaccination, decreased

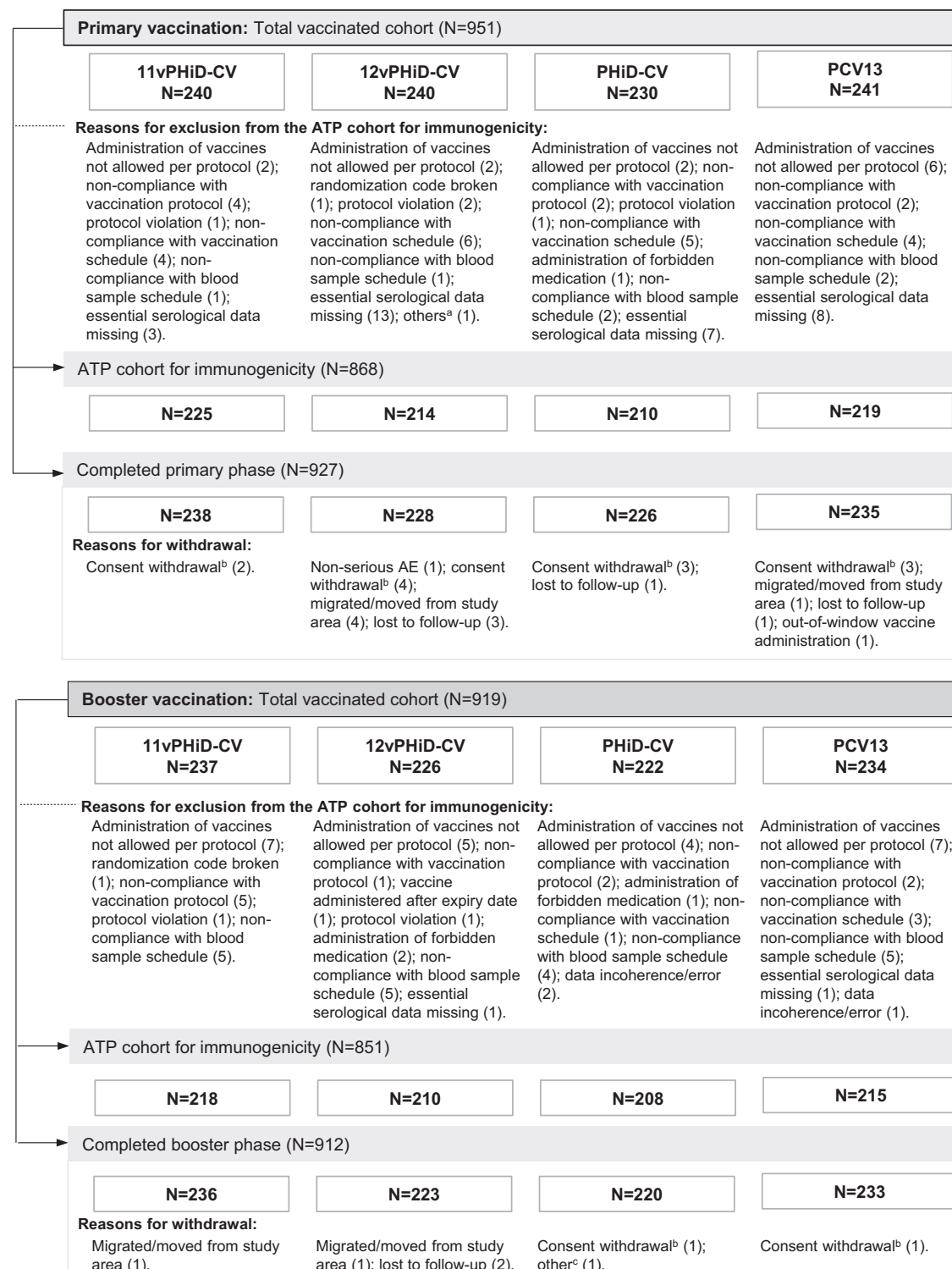


Fig. 1. Participant flow chart. N, number of infants/toddlers in each group; ATP, according-to-protocol; AE, adverse event. Note: ^a Pre-vaccination temperature too high; ^b not due to an adverse event; ^c mother not mobile.

pre-booster dose (but remained higher than at baseline), and increased again post-booster vaccination. The ranges were similar across the 3 PHiD-CV groups, except for serotype 6B post-booster dose, for which antibody GMCs were significantly higher in the 12vPHiD-CV group compared with the other 2. Antibody GMCs were considerably higher in the PCV13 than in PHiD-CV groups for serotype 19A post-primary and post-booster vaccination, and for serotype 6A post-primary vaccination, while higher pre-

booster values were observed for serotype 6A in the 12vPHiD-CV than in the PCV13 group (non-overlapping 95% CIs; Table 1).

One month post-primary vaccination, for each of the 10 PHiD-CV serotypes except serotype 1, at least 81.0% of infants receiving the investigational vaccines or PHiD-CV had OPA titres ≥ 8 . These percentages increased post-booster vaccination to at least 93.9%. For serotype 6A, all infants in the 12vPHiD-CV group had OPA titres ≥ 8 post-booster vaccination (Table 2). OPA results are not cur-

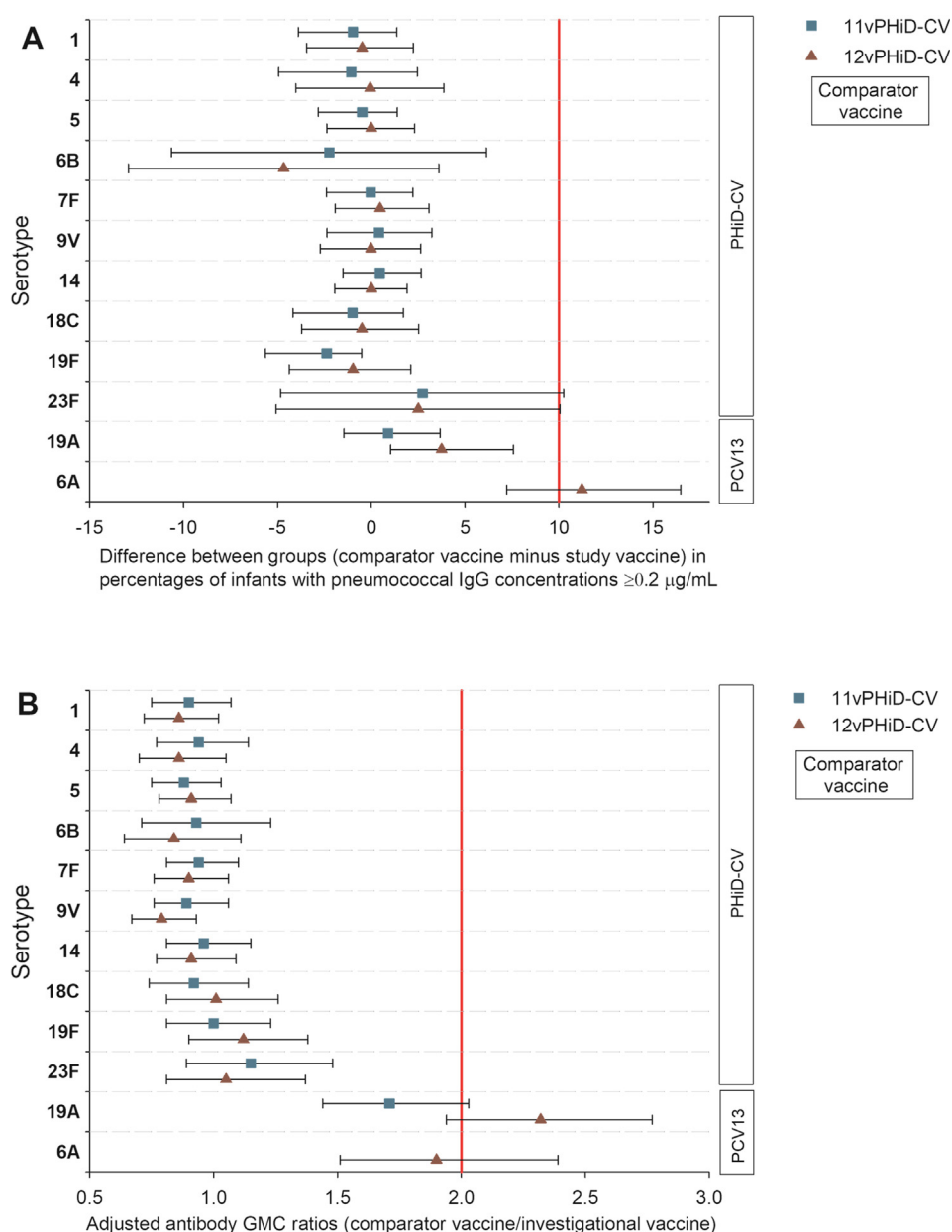


Fig. 2. Non-inferiority of 11vPHiD-CV and 12vPHiD-CV compared to PHiD-CV or PCV13 in terms of percentage of infants with antibody concentrations ≥ 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (A), and antibody GMC (B), one month after primary vaccination (according-to-protocol cohort for immunogenicity). Adjusted GMC, geometric mean concentration adjusted for baseline concentration. Note: Error bars indicate 95.9% (comparator/11vPHiD-CV) or 95.8% (comparator/12vPHiD-CV) confidence intervals. The vertical red lines indicate the non-inferiority margins for the upper limits of the confidence intervals. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

rently available for serotype 19A, but will be disclosed at a later time.

Immune responses to protein D appeared similar across the PHiD-CV groups at all timepoints (Table 3).

3.4. Safety and reactogenicity

Following primary vaccination, pain at the injection site was the most frequent local symptom, reported after 37.5–40.2% of doses in the investigational groups, and after 35.4–37.9% of comparator vaccine doses. Irritability/fussiness was the most frequently reported general symptom, after 53.5% (for PCV13) to 61.7% (for 12vPHiD-CV) of doses (Table 4). The same symptoms were the most frequently reported post-booster dose in all groups (Table 4). Slightly higher incidences of injection site pain post-booster dose

(after 47.6–54.9% of doses in all groups) compared to post-primary vaccination were observed. Grade 3 solicited symptom incidence was below 6.2% post-primary vaccination, and below 8.2% post-booster vaccination in each group (Table 4).

Six toddlers (3 each in the 12vPHiD-CV and PHiD-CV groups) had large swelling reactions at the injection site of the PCV post-booster dose.

Post-primary vaccination, at least 1 unsolicited AE was reported after 23.4–27.2% of doses in each group (Table 4). The most frequent unsolicited symptom was upper respiratory tract infection, reported following 6.9–7.4% of doses in the investigational groups, and 4.9–8.5% of doses in the comparator groups. Post-booster vaccination, unsolicited AEs were reported after 29.1–33.3% of doses in the 3 PHiD-CV groups (Table 4), with upper respiratory tract infection as the most frequent symptom, following 4.6–7.1% of

Table 1
Percentages of infants with pneumococcal serotype-specific antibody concentrations ≥ 0.2 $\mu\text{g/mL}$ and antibody GMCs, by timepoint (according-to-protocol cohort for immunogenicity).

		11vPHiD-CV			12vPHiD-CV			PHiD-CV			PCV13		
		N	% (95% CI)	GMC (95% CI)	N	% (95% CI)	GMC (95% CI)	N	% (95% CI)	GMC (95% CI)	N	% (95% CI)	GMC (95% CI)
1	Pre	219	12.8 (8.7–17.9)	0.06 (0.05–0.07)	207	17.4 (12.5–23.3)	0.06 (0.06–0.07)	203	11.8 (7.7–17.1)	0.05 (0.05–0.06)	207	10.6 (6.8–15.6)	0.05 (0.04–0.06)
	Post-pri	222	99.5 (97.5–100)	1.54 (1.37–1.74)	214	99.1 (96.7–99.9)	1.59 (1.41–1.79)	210	98.6 (95.9–99.7)	1.37 (1.21–1.54)	218	99.5 (97.5–100)	2.18 (1.97–2.42)
	Pre-bst	216	61.6 (54.7–68.1)	0.26 (0.24–0.30)	206	62.1 (55.1–68.8)	0.26 (0.24–0.30)	202	64.9 (57.8–71.4)	0.26 (0.23–0.29)	210	89.5 (84.6–93.3)	0.44 (0.40–0.48)
	Post-bst	214	100 (98.3–100)	2.49 (2.21–2.82)	203	99.5 (97.3–100)	2.18 (1.94–2.46)	201	100 (98.2–100)	2.25 (2.01–2.53)	209	100 (98.3–100)	3.84 (3.50–4.22)
4	Pre	219	11.9 (7.9–16.9)	0.05 (0.04–0.06)	208	8.7 (5.2–13.3)	0.05 (0.04–0.05)	203	8.4 (5.0–13.1)	0.04 (0.04–0.05)	209	9.1 (5.6–13.8)	0.05 (0.04–0.05)
	Post-pri	222	97.7 (94.8–99.3)	1.78 (1.56–2.02)	214	96.7 (93.4–98.7)	1.99 (1.73–2.28)	210	96.7 (93.3–98.6)	1.68 (1.47–1.93)	218	100 (98.3–100)	2.83 (2.60–3.09)
	Pre-bst	213	89.2 (84.2–93.0)	0.49 (0.44–0.54)	203	86.7 (81.2–91.0)	0.48 (0.43–0.54)	203	87.7 (82.4–91.9)	0.50 (0.45–0.56)	210	81.9 (76.0–86.9)	0.41 (0.37–0.46)
	Post-bst	214	100 (98.3–100)	3.89 (3.49–4.34)	203	100 (98.2–100)	4.18 (3.77–4.63)	202	100 (98.2–100)	4.06 (3.7–4.45)	209	100 (98.3–100)	3.86 (3.43–4.35)
5	Pre	219	14.6 (10.2–20.0)	0.07 (0.06–0.08)	208	17.3 (12.4–23.1)	0.07 (0.06–0.08)	202	16.3 (11.5–22.2)	0.07 (0.06–0.08)	210	18.6 (13.6–24.5)	0.07 (0.06–0.08)
	Post-pri	222	100 (98.4–100)	2.48 (2.24–2.74)	214	99.5 (97.4–100)	2.37 (2.13–2.64)	209	99.5 (97.4–100)	2.19 (1.97–2.44)	218	99.1 (96.7–99.9)	2.81 (2.52–3.13)
	Pre-bst	213	87.8 (82.6–91.9)	0.51 (0.46–0.57)	202	89.1 (84.0–93.0)	0.51 (0.45–0.57)	199	88.4 (83.2–92.5)	0.48 (0.43–0.53)	208	95.7 (91.9–98.0)	0.77 (0.69–0.85)
	Post-bst	215	100 (98.3–100)	3.23 (2.88–3.64)	203	100 (98.2–100)	3.31 (2.98–3.68)	202	100 (98.2–100)	3.05 (2.75–3.38)	209	100 (98.3–100)	6.84 (6.12–7.66)
6B	Pre	219	20.5 (15.4–26.5)	0.07 (0.06–0.08)	208	23.6 (18.0–29.9)	0.08 (0.06–0.09)	200	18.0 (12.9–24.0)	0.07 (0.06–0.08)	209	29.7 (23.6–36.4)	0.10 (0.08–0.12)
	Post-pri	222	77.5 (71.4–82.8)	0.51 (0.42–0.61)	214	79.9 (73.9–85.1)	0.58 (0.48–0.69)	210	75.2 (68.8–80.9)	0.48 (0.40–0.58)	218	78.4 (72.4–83.7)	0.49 (0.42–0.58)
	Pre-bst	213	83.1 (77.4–87.9)	0.57 (0.49–0.65)	202	90.6 (85.7–94.2)	0.64 (0.56–0.74)	199	86.4 (80.9–90.9)	0.59 (0.51–0.69)	209	56.5 (49.4–63.3)	0.22 (0.19–0.25)
	Post-bst	214	98.1 (95.3–99.5)	2.66 (2.34–3.03)	205	98.5 (95.8–99.7)	4.09 (3.60–4.66)	203	99.0 (96.5–99.9)	2.53 (2.24–2.86)	209	99.0 (96.6–99.9)	3.80 (3.34–4.33)
7F	Pre	220	32.7 (26.6–39.4)	0.12 (0.10–0.14)	211	38.4 (31.8–45.3)	0.13 (0.11–0.16)	202	32.7 (26.3–39.6)	0.13 (0.11–0.15)	211	32.7 (26.4–39.5)	0.11 (0.10–0.14)
	Post-pri	223	99.6 (97.5–100)	2.30 (2.10–2.52)	214	99.1 (96.7–99.9)	2.44 (2.18–2.72)	210	99.5 (97.4–100)	2.20 (1.97–2.47)	219	100 (98.3–100)	3.16 (2.91–3.43)
	Pre-bst	213	98.1 (95.3–99.5)	1.04 (0.94–1.16)	203	98.5 (95.7–99.7)	0.99 (0.89–1.10)	200	97.5 (94.3–99.2)	0.94 (0.84–1.05)	207	99.0 (96.6–99.9)	1.21 (1.11–1.32)
	Post-bst	214	100 (98.3–100)	4.88 (4.40–5.40)	203	100 (98.2–100)	4.57 (4.14–5.04)	201	100 (98.2–100)	4.31 (3.91–4.75)	209	100 (98.3–100)	6.34 (5.80–6.95)
9V	Pre	220	14.5 (10.2–19.9)	0.07 (0.06–0.07)	208	20.7 (15.4–26.8)	0.07 (0.06–0.08)	200	18.5 (13.4–24.6)	0.06 (0.05–0.07)	211	21.3 (16.0–27.5)	0.07 (0.06–0.08)
	Post-pri	222	98.6 (96.1–99.7)	1.57 (1.40–1.76)	214	99.1 (96.7–99.9)	1.77 (1.58–1.97)	210	99.0 (96.6–99.9)	1.42 (1.27–1.59)	218	100 (98.3–100)	2.27 (2.05–2.51)
	Pre-bst	213	94.8 (90.9–97.4)	0.76 (0.68–0.85)	202	98.0 (95.0–99.5)	0.77 (0.69–0.87)	198	97.0 (93.5–98.9)	0.70 (0.63–0.77)	207	93.7 (89.5–96.6)	0.53 (0.48–0.58)
	Post-bst	214	100 (98.3–100)	4.14 (3.70–4.62)	203	100 (98.2–100)	4.36 (3.93–4.84)	202	100 (98.2–100)	3.68 (3.32–4.09)	209	100 (98.3–100)	5.83 (5.26–6.46)
14	Pre	219	77.6 (71.5–83.0)	0.57 (0.48–0.68)	209	76.6 (70.2–82.1)	0.55 (0.46–0.65)	201	75.1 (68.6–80.9)	0.47 (0.39–0.56)	207	78.3 (72.0–83.7)	0.58 (0.48–0.70)
	Post-pri	222	99.5 (97.5–100)	4.19 (3.72–4.71)	214	100 (98.3–100)	4.45 (3.95–5.00)	210	100 (98.3–100)	4.21 (3.72–4.77)	218	99.5 (97.5–100)	4.20 (3.68–4.80)
	Pre-bst	214	94.9 (91.0–97.4)	1.30 (1.11–1.53)	204	99.0 (96.5–99.9)	1.45 (1.28–1.64)	201	96.0 (92.3–98.3)	1.12 (0.97–1.30)	209	95.7 (92.0–98.0)	1.66 (1.44–1.93)
	Post-bst	213	99.5 (97.4–100)	6.17 (5.45–6.98)	203	100 (98.2–100)	6.52 (5.80–7.33)	201	99.0 (96.5–99.9)	5.75 (5.07–6.51)	209	100 (98.3–100)	10.05 (8.97–11.25)
18C	Pre	219	32.4 (26.3–39.1)	0.11 (0.09–0.13)	209	34.9 (28.5–41.8)	0.12 (0.10–0.14)	201	34.8 (28.3–41.8)	0.12 (0.10–0.14)	210	35.2 (28.8–42.1)	0.11 (0.09–0.13)
	Post-pri	222	99.1 (96.8–99.9)	2.84 (2.45–3.28)	214	98.6 (96.0–99.7)	2.56 (2.21–2.96)	210	98.1 (95.2–99.5)	2.56 (2.19–2.98)	219	100 (98.3–100)	3.17 (2.87–3.51)
	Pre-bst	212	95.8 (92.1–98.0)	0.76 (0.67–0.86)	200	91.0 (86.1–94.6)	0.68 (0.60–0.77)	195	94.9 (90.8–97.5)	0.74 (0.65–0.84)	207	95.7 (91.9–98.0)	0.59 (0.54–0.65)
	Post-bst	213	100 (98.3–100)	7.65 (6.79–8.61)	203	100 (98.2–100)	7.20 (6.39–8.11)	201	99.5 (97.3–100)	8.00 (7.06–9.06)	209	100 (98.3–100)	6.01 (5.45–6.63)
19F	Pre	219	55.7 (48.9–62.4)	0.22 (0.18–0.26)	211	59.7 (52.8–66.4)	0.24 (0.20–0.29)	202	52.5 (45.3–59.5)	0.22 (0.18–0.26)	213	58.2 (51.3–64.9)	0.23 (0.19–0.29)
	Post-pri	223	100 (98.4–100)	3.65 (3.20–4.16)	214	98.6 (96.0–99.7)	3.31 (2.91–3.76)	210	97.6 (94.5–99.2)	3.68 (3.15–4.30)	218	100 (98.3–100)	3.07 (2.83–3.34)
	Pre-bst	212	95.8 (92.1–98.0)	1.11 (0.97–1.28)	199	97.0 (93.6–98.9)	1.11 (0.96–1.29)	196	94.9 (90.8–97.5)	1.10 (0.95–1.29)	207	89.4 (84.4–93.2)	0.50 (0.44–0.57)
	Post-bst	213	100 (98.3–100)	8.67 (7.72–9.73)	203	100 (98.2–100)	8.50 (7.55–9.59)	203	100 (98.2–100)	8.22 (7.40–9.13)	209	100 (98.3–100)	6.40 (5.77–7.11)
23F	Pre	219	24.2 (18.7–30.4)	0.07 (0.06–0.09)	208	17.8 (12.8–23.7)	0.07 (0.06–0.08)	199	20.6 (15.2–26.9)	0.07 (0.06–0.09)	210	24.3 (18.6–30.7)	0.08 (0.06–0.09)
	Post-pri	222	81.1 (75.3–86.0)	0.62 (0.52–0.73)	214	81.3 (75.4–86.3)	0.69 (0.57–0.83)	210	83.8 (78.1–88.5)	0.72 (0.61–0.86)	218	94.5 (90.6–97.1)	1.59 (1.38–1.84)
	Pre-bst	214	84.6 (79.0–89.1)	0.51 (0.44–0.58)	205	84.4 (78.7–89.1)	0.54 (0.47–0.62)	198	86.4 (80.8–90.8)	0.49 (0.43–0.56)	208	72.6 (66.0–78.5)	0.34 (0.29–0.39)
	Post-bst	214	99.1 (96.7–99.9)	3.09 (2.73–3.49)	203	99.0 (96.5–99.9)	3.31 (2.93–3.73)	201	100 (98.2–100)	2.98 (2.65–3.35)	209	99.5 (97.4–100)	6.49 (5.69–7.39)
6A	Pre	222	26.1 (20.5–32.4)	0.09 (0.07–0.10)	210	27.1 (21.3–33.7)	0.08 (0.07–0.10)	204	23.5 (17.9–30.0)	0.08 (0.06–0.09)	215	34.0 (27.7–40.7)	0.11 (0.09–0.14)
	Post-pri	222	38.3 (31.9–45.0)	0.14 (0.12–0.17)	214	88.3 (83.2–92.3)	1.12 (0.93–1.34)	208	30.3 (24.1–37.0)	0.12 (0.10–0.14)	218	99.5 (97.5–100)	2.05 (1.81–2.32)
	Pre-bst	211	55.0 (48.0–61.8)	0.23 (0.19–0.27)	196	94.4 (90.2–97.2)	0.89 (0.78–1.01)	194	53.1 (45.8–60.3)	0.22 (0.18–0.26)	205	90.7 (85.9–94.3)	0.64 (0.56–0.73)
	Post-bst	212	91.0 (86.4–94.5)	1.07 (0.90–1.27)	203	100 (98.2–100)	7.94 (6.99–9.02)	200	88.0 (82.7–92.2)	0.91 (0.76–1.09)	209	100 (98.3–100)	9.31 (8.41–10.3)
19A	Pre	218	46.3 (39.6–53.2)	0.17 (0.14–0.21)	208	41.8 (35.0–48.8)	0.17 (0.14–0.20)	202	46.5 (39.5–53.7)	0.18 (0.15–0.22)	206	50.0 (43.0–57.0)	0.19 (0.16–0.24)
	Post-pri	222	98.6 (96.1–99.7)	1.63 (1.43–1.86)	214	95.8 (92.2–98.1)	1.18 (1.03–1.36)	209	47.4 (40.4–54.4)	0.18 (0.15–0.22)	219	99.5 (97.5–100)	2.67 (2.39–3.00)
	Pre-bst	212	76.9 (70.6–82.4)	0.46 (0.39–0.54)	199	73.9 (67.2–79.8)	0.36 (0.31–0.42)	197	51.3 (44.1–58.4)	0.18 (0.15–0.21)	208	76.4 (70.1–82.0)	0.42 (0.35–0.49)
	Post-bst	214	99.5 (97.4–100)	5.35 (4.67–6.13)	203	99.0 (96.5–99.9)	4.46 (3.83–5.20)	201	86.1 (80.5–90.5)	1.11 (0.91–1.35)	209	100 (98.3–100)	7.06 (6.25–7.98)

N, number of infants with available results in each group; %, percentage of infants with antibody concentration ≥ 0.2 $\mu\text{g/mL}$; GMC, geometric mean concentration; CI, confidence interval; Pre, pre-vaccination; Post-pri, 1 month post-dose 3; Pre-bst, pre-booster vaccination; Post-bst, 1 month post-booster vaccination.

Table 2
Percentages of children with pneumococcal serotype-specific OPA titres ≥ 8 and OPA GMTs^a, by timepoint (according-to-protocol cohort for immunogenicity).

	11vPHID-CV			12vPHID-CV			PHID-CV			PCV13			
	N	% (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% (95% CI)	GMT (95% CI)	
1	Post-pri	105	38.1 (28.8–48.1)	13.2 (9.6–18.2)	105	44.8 (35.0–54.8)	15.6 (11.4–21.1)	98	40.8 (31.0–51.2)	13.6 (9.9–18.6)	105	61.0 (50.9–70.3)	26.4 (19.3–36.0)
	Post-bst	99	85.9 (77.4–92.0)	192.4 (129.0–287.1)	97	87.6 (79.4–93.4)	192.4 (133.3–277.5)	96	88.5 (80.4–94.1)	216.8 (148.3–316.9)	101	88.1 (80.2–93.7)	207.6 (145.8–295.6)
4	Post-pri	103	95.1 (89.0–98.4)	527.3 (401.5–692.4)	105	99.0 (94.8–100)	609.0 (492.8–752.5)	99	99.0 (94.5–100)	616.7 (503.2–756.0)	104	100 (96.5–100)	540.1 (444.7–656.1)
	Post-bst	96	100 (96.2–100)	1455.3 (1208.9–1751.9)	96	100 (96.2–100)	1650.5 (1360.9–2001.9)	95	100 (96.2–100)	1550.5 (1230.2–1954.1)	100	100 (96.4–100)	1972.2 (1586.3–2451.9)
5	Post-pri	102	82.4 (73.6–89.2)	43.0 (32.6–56.9)	104	91.3 (84.2–96.0)	46.7 (36.8–59.3)	98	82.7 (73.7–89.6)	40.5 (30.4–54.0)	105	87.6 (79.8–93.2)	57.2 (44.3–74.0)
	Post-bst	99	93.9 (87.3–97.7)	134.5 (100.3–180.4)	96	97.9 (92.7–99.7)	133.3 (105.2–168.8)	96	94.8 (88.3–98.3)	133.4 (100.5–177.1)	100	100 (96.4–100)	269.9 (216.2–337.0)
6B	Post-pri	101	92.1 (85.0–96.5)	478.3 (345.2–662.7)	104	94.2 (87.9–97.9)	603.2 (436.9–832.8)	96	93.8 (86.9–97.7)	622.6 (444.2–872.7)	103	96.1 (90.4–98.9)	742.3 (533.9–1031.8)
	Post-bst	98	96.9 (91.3–99.4)	681.4 (520.3–892.5)	96	97.9 (92.7–99.7)	1246.4 (963.1–1613.0)	95	98.9 (94.3–100)	694.6 (546.5–882.6)	100	100 (96.4–100)	1727.9 (1406.2–2123.4)
7F	Post-pri	104	100 (96.5–100)	3515.0 (2787.1–4433.0)	103	100 (96.5–100)	4472.3 (3463.6–5774.9)	98	100 (96.3–100)	3424.1 (2631.9–4454.8)	104	100 (96.5–100)	9737.9 (7540.5–12575.8)
	Post-bst	96	100 (96.2–100)	8362.9 (6977.1–10023.9)	96	100 (96.2–100)	7516.4 (6223.0–9078.7)	96	100 (96.2–100)	7880.8 (6408.6–9691.3)	97	100 (96.3–100)	16592.6 (13909.7–19792.9)
9V	Post-pri	105	100 (96.5–100)	1212.9 (953.6–1542.6)	105	100 (96.5–100)	1629.0 (1293.0–2052.4)	98	99.0 (94.4–100)	1469.9 (1178.3–1833.6)	104	100 (96.5–100)	1614.5 (1283.9–2030.2)
	Post-bst	99	100 (96.3–100)	3406.9 (2758.2–4208.1)	97	100 (96.3–100)	3616.1 (2838.1–4607.5)	93	100 (96.1–100)	3260.6 (2620.1–4057.6)	98	100 (96.3–100)	8470.4 (6692.4–10720.8)
14	Post-pri	105	97.1 (91.9–99.4)	1000.8 (743.1–1347.9)	104	100 (96.5–100)	1699.1 (1313.8–2197.3)	97	99.0 (94.4–100)	1417.4 (1059.6–1896.0)	103	99.0 (94.7–100)	2034.4 (1513.4–2734.8)
	Post-bst	99	100 (96.3–100)	2038.4 (1594.3–2606.2)	96	100 (96.2–100)	2519.9 (1960.2–3239.6)	94	100 (96.2–100)	2285.1 (1845.9–2828.9)	100	100 (96.4–100)	2772.6 (2218.6–3464.9)
18C	Post-pri	105	81.0 (72.1–88.0)	100.9 (67.7–150.4)	102	84.3 (75.8–90.8)	131.5 (86.9–198.8)	98	81.6 (72.5–88.7)	72.0 (47.0–110.4)	102	93.1 (86.4–97.2)	145.7 (102.6–206.8)
	Post-bst	97	95.9 (89.8–98.9)	914.8 (621.8–1345.9)	95	96.8 (91.0–99.3)	781.2 (536.3–1137.8)	93	97.8 (92.4–99.7)	912.0 (605.4–1374.1)	97	99.0 (94.4–100)	610.7 (421.3–885.1)
19F	Post-pri	102	86.3 (78.0–92.3)	144.2 (101.8–204.3)	102	94.1 (87.6–97.8)	201.4 (147.2–275.4)	96	90.6 (82.9–95.6)	210.4 (143.6–308.2)	103	89.3 (81.7–94.5)	66.0 (49.8–87.5)
	Post-bst	95	97.9 (92.6–99.7)	523.9 (382.9–716.8)	96	96.9 (91.1–99.4)	565.3 (406.4–786.6)	96	99.0 (94.3–100)	759.6 (554.3–1040.8)	98	95.9 (89.9–98.9)	438.0 (312.7–613.7)
23F	Post-pri	104	90.4 (83.0–95.3)	989.6 (652.9–1499.8)	104	94.2 (87.9–97.9)	1377.9 (951.5–1995.3)	98	93.9 (87.1–97.7)	1097.3 (742.1–1622.4)	104	99.0 (94.8–100)	5136.4 (3829.2–6889.8)
	Post-bst	97	100 (96.3–100)	2562.9 (2016.3–3257.6)	96	99.0 (94.3–100)	2923.6 (2248.9–3800.9)	95	100 (96.2–100)	2600.0 (1896.8–3563.9)	97	100 (96.3–100)	24350.4 (18303.2–32395.5)
6A	Post-pri	100	48.0 (37.9–58.2)	37.4 (22.9–60.9)	103	96.1 (90.4–98.9)	1292.6 (940.3–1777.0)	94	50.0 (39.5–60.5)	36.5 (22.6–59.0)	103	99.0 (94.7–100)	2832.0 (2212.8–3624.4)
	Post-bst	95	65.3 (54.8–74.7)	116.8 (67.9–201.0)	93	100 (96.1–100)	3436.7 (2716.0–4348.5)	92	71.7 (61.4–80.6)	146.4 (87.6–244.6)	98	100 (96.3–100)	5200.7 (4134.9–6541.3)

OPA, opsonophagocytic activity; N, number of infants with available results in each group; %, percentage of infants with OPA titre ≥ 8 ; GMT, geometric mean titre; CI, confidence interval; Post-pri, 1 month post-dose 3; Post-bst, 1 month post-booster vaccination.

Note: Results for serotype 19A are not available to date, due to technical issues. Results using a newly-validated OPA assay will be disclosed when available.

Table 3Percentages of infants with anti-protein D antibody concentrations ≥ 100 ELU/mL and antibody GMCs, by timepoint (according-to-protocol cohort for immunogenicity).

	11vPHiD-CV		12vPHiD-CV		PHiD-CV		PCV13	
	N	% (95% CI)	N	% (95% CI)	N	% (95% CI)	N	% (95% CI)
Pre	112	11.6 (6.3–19.0)	104	8.7 (4.0–15.8)	101	13.9 (7.8–22.2)	107	9.3 (4.6–16.5)
Post-pri	112	99.1 (95.1–100)	106	100 (96.6–100)	103	99.0 (94.7–100)	106	17.9 (11.2–26.6)
Pre-bst	108	93.5 (87.1–97.4)	102	95.1 (88.9–98.4)	101	94.1 (87.5–97.8)	106	23.6 (15.9–32.8)
Post-bst	108	99.1 (94.9–100)	100	100 (96.4–100)	101	100 (96.4–100)	104	28.8 (20.4–38.6)
	N	GMC (95% CI)	N	GMC (95% CI)	N	GMC (95% CI)	N	GMC (95% CI)
Pre	112	57.0 (53.1–61.3)	104	55.5 (51.7–59.6)	101	60.5 (54.5–67.1)	107	55.0 (51.7–58.4)
Post-pri	112	1430.1 (1194.2–1712.7)	106	1194.2 (1017.7–1401.3)	103	1344.8 (1116.4–1619.9)	106	64.4 (57.7–71.9)
Pre-bst	108	445.9 (365.0–544.7)	102	447.6 (363.4–551.2)	101	460.0 (376.2–562.4)	106	70.9 (61.8–81.3)
Post-bst	108	1866.0 (1535.7–2267.4)	100	1835.5 (1511.5–2229.0)	101	2128.4 (1777.1–2549.2)	104	77.8 (67.1–90.1)

N, number of infants with available results; %, percentage of infants with anti-protein D antibody concentrations ≥ 100 ELU/mL; ELU, ELISA units; GMC, geometric mean concentration; CI, confidence interval; Pre, pre-vaccination; Post-pri, 1 month post-dose 3; Pre-bst, pre-booster vaccination; Post-bst, 1 month post-booster vaccination.

doses in the investigational groups and 5.6–9.0% of doses in the comparator groups.

Throughout the study, 154 SAEs were reported in 117 children: 29 children in the 11vPHiD-CV group, 26 in the 12vPHiD-CV group, 38 in the PHiD-CV group and 24 in the PCV13 group (Table 4). Four SAEs were considered by the investigator to be causally related to vaccination: 2 in the 12vPHiD-CV group (pyrexia occurring in 2 different children, 1 day post-dose 1), 1 in the 11vPHiD-CV group (head injury), and 1 in the PHiD-CV group (pyrexia on the day of dose 2). All reported SAEs were resolved by study end except for 3: retinoblastoma in the 11vPHiD-CV group, hypotonia in the PHiD-CV group, and pneumonia in the 12vPHiD-CV group (resolved with sequelae). No fatal events were reported.

4. Discussion

This study showed that the immune responses induced by the investigational 11vPHiD-CV and 12vPHiD-CV vaccines were non-inferior to the licensed comparator vaccines (PHiD-CV or PCV13) following a 3-dose primary series in infants, by meeting pre-defined serological criteria recommended by the WHO [13] for the vast majority of serotypes (9/11 for 11vPHiD-CV and 10/12 for 12vPHiD-CV). Also, immune responses to 10 serotypes common with PHiD-CV in both investigational vaccines were comparable to those induced by PHiD-CV, in terms of antibody concentrations and their functionality post-primary vaccination.

In our study, for serotype 19A, the non-inferiority criterion was met in terms of the percentage of infants with antibody concentration ≥ 0.2 $\mu\text{g/mL}$, but not in terms of antibody GMC ratios. Nevertheless, according to the WHO recommendations, meeting 1 of the 2 alternative serological criteria for non-inferiority is considered acceptable, and assessment of pneumococcal vaccines should also be made on a serotype to serotype basis, by taking into account the burden of disease associated with each serotype, together with any available effectiveness data [13]. For serotype 6A, pre-specified non-inferiority criteria were not met for 12vPHiD-CV. However, following primary vaccination, at least 96% of children had OPA titres ≥ 8 against serotype 6A in the groups receiving 12vPHiD-CV and PCV13 (overlapping 95% CIs). Moreover, all children vaccinated with 12vPHiD-CV had OPA titres ≥ 8 post-booster vaccination. Although neither of the 2 alternative serological non-inferiority criteria recommended by the WHO was met for 6A, the functionality of elicited antibodies as assessed by OPA was previously observed to better reflect effectiveness against IPD than antibody levels for several pneumococcal serotypes, including 6A [12] or 19A [14].

The addition of 19A and 6A serotype-specific CRM₁₉₇-conjugates to PHiD-CV did not seem to impact negatively the immune responses against the 10 common serotypes; the immune response elicited by 11vPHiD-CV and 12vPHiD-CV appeared simi-

lar to that induced by PHiD-CV, and was in line with previous reports on PHiD-CV co-administered with routine paediatric vaccines [15]. However, antibody GMCs for serotype 6B were higher post-booster dose in the 12vPHiD-CV group when compared with the PHiD-CV group. This may be explained by cross-reacting antibodies against 6A, despite – or maybe due to – the 2 capsular polysaccharides being conjugated to different protein carriers (protein D for 6B and CRM₁₉₇ for 6A). Since immune responses to PHiD-CV for serotype 6B are usually lower than for the other serotypes [2], the difference in carrier might play an important role towards enhancing cross-reactivity. We did not make a similar observation for 19A and 19F, also conjugated to different protein carriers (19F to TT and 19A to CRM₁₉₇), but responses to 19F were in the high ranges for both vaccines.

Eight months after completion of the primary series, antibody concentrations were similar among the 3 PHiD-CV groups for each of the 10 common pneumococcal serotypes. A trend for higher percentages of toddlers with antibody concentrations ≥ 0.2 $\mu\text{g/mL}$ and higher antibody GMCs was observed in our study in the 3 PHiD-CV groups compared to a study with a similar target population, in which PHiD-CV was co-administrated with DTPa-HBV-IPV/Hib, according to the same schedule [16].

Future development of higher-valent PCVs is a challenging task. Different approaches are being pursued, such as the addition of more serotypes to multivalent PCVs or the development of serotype-independent vaccines [17,18] using well-conserved proteins [19–22]. The emergence of non-vaccine serotypes [23–27] may be addressed by the addition of new serotypes in the vaccine composition, as done for the 2 investigational formulations containing serotypes 19A and 6A (for 12vPHiD-CV), especially since serotype 19A remains an important cause of IPD [7,28–31] and its multi-drug resistance makes it more difficult to control [32]. However, the prevalence and impact of emerging serotypes vary by region, age, and time after PCV introduction. This complicates determining which serotypes should be included into a higher-valency PCV [33].

The polysaccharide/carrier ratio in PCVs is also important and it has been discussed to impact the immune response to pneumococcal antigens and co-administered vaccines [9]. Co-administration of DTPa-HBV-IPV/Hib with PHiD-CV has been shown to increase anti-polyribosylribitol-phosphate antibody GMCs, compared to co-administration with the 7-valent PCV (PCV7) [34,35], probably due to the different nature and dosage of carrier proteins [9]. PHiD-CV includes 3 distinct proteins as carriers, and its efficacy and effectiveness was demonstrated in clinical [2] and post-marketing studies, with the latter indicating that protection against IPD extends to the vaccine-related serotype 19A [4,36,37]. Our study showed that more serotypes can be added to PHiD-CV without impacting the immune response against vaccine serotypes.

Table 4
Incidence of solicited adverse events reported within 4 days post-vaccination and unsolicited adverse events reported within 31 days post-vaccination, following the 3-dose primary series (overall/dose) and booster vaccination (total vaccinated cohort).

	11vPHiD-CV		12vPHiD-CV		PHiD-CV		PCV13	
	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
Primary vaccination								
<i>Solicited AEs</i>	N = 717		N = 697		N = 681		N = 706	
Pain	269	37.5 (34.0–41.2)	280	40.2 (36.5–43.9)	258	37.9 (34.2–41.6)	250	35.4 (31.9–39.1)
Grade 3	32	4.5 (3.1–6.2)	21	3.0 (1.9–4.6)	28	4.1 (2.7–5.9)	15	2.1 (1.2–3.5)
Redness	261	36.4 (32.9–40.0)	270	38.7 (35.1–42.5)	241	35.4 (31.8–39.1)	239	33.9 (30.4–37.5)
Grade 3	5	0.7 (0.2–1.6)	3	0.4 (0.1–1.3)	4	0.6 (0.2–1.5)	2	0.3 (0.0–1.0)
Swelling	184	25.7 (22.5–29.0)	205	29.4 (26.1–32.9)	158	23.2 (20.1–26.6)	157	22.2 (19.2–25.5)
Grade 3	5	0.7 (0.2–1.6)	12	1.7 (0.9–3.0)	14	2.1 (1.1–3.4)	6	0.8 (0.3–1.8)
Drowsiness	372	51.9 (48.2–55.6)	351	50.4 (46.6–54.1)	322	47.3 (43.5–51.1)	327	46.3 (42.6–50.1)
Grade 3	17	2.4 (1.4–3.8)	15	2.2 (1.2–3.5)	19	2.8 (1.7–4.3)	23	3.3 (2.1–4.8)
Irritability/fussiness	419	58.4 (54.7–62.1)	430	61.7 (58.0–65.3)	393	57.7 (53.9–61.5)	378	53.5 (49.8–57.3)
Grade 3	40	5.6 (4.0–7.5)	34	4.9 (3.4–6.8)	42	6.2 (4.5–8.2)	27	3.8 (2.5–5.5)
Loss of appetite	217	30.3 (26.9–33.8)	229	32.9 (29.4–36.5)	219	32.2 (28.7–35.8)	199	28.2 (24.9–31.7)
Grade 3	4	0.6 (0.2–1.4)	8	1.1 (0.5–2.2)	7	1.0 (0.4–2.1)	10	1.4 (0.7–2.6)
Fever	256	35.7 (32.2–39.3)	241	34.6 (31.0–38.2)	258	37.9 (34.2–41.6)	235	33.3 (29.8–36.9)
Grade 3	2	0.3 (0.0–1.0)	6	0.9 (0.3–1.9)	6	0.9 (0.3–1.9)	2	0.3 (0.0–1.0)
<i>Unsolicited AEs</i>	N = 718		N = 708		N = 685		N = 712	
Any	174	24.2 (21.1–27.5)	166	23.4 (20.4–26.7)	186	27.2 (23.9–30.7)	168	23.6 (20.5–26.9)
Grade 3	15	2.1 (1.2–3.4)	10	1.4 (0.7–2.6)	8	1.2 (0.5–2.3)	6	0.8 (0.3–1.8)
Any related	4	0.6 (0.2–1.4)	6	0.8 (0.3–1.8)	10	1.5 (0.7–2.7)	7	1.0 (0.4–2.0)
Grade 3	0	0.0 (0.0–0.5)	2	0.3 (0.0–1.0)	0	0.0 (0.0–0.5)	1	0.1 (0.0–0.8)
Booster vaccination								
<i>Solicited AEs</i>	N = 235		N = 224		N = 219		N = 231	
Pain	112	47.7 (41.1–54.3)	123	54.9 (48.1–61.5)	119	54.3 (47.5–61.1)	110	47.6 (41–54.3)
Grade 3	13	5.5 (3.0–9.3)	16	7.1 (4.1–11.3)	18	8.2 (4.9–12.7)	8	3.5 (1.5–6.7)
Redness	109	46.4 (39.9–53.0)	117	52.2 (45.5–58.9)	108	49.3 (42.5–56.1)	107	46.3 (39.8–53.0)
Grade 3	5	2.1 (0.7–4.9)	10	4.5 (2.2–8.1)	7	3.2 (1.3–6.5)	5	2.2 (0.7–5.0)
Swelling	84	35.7 (29.6–42.2)	88	39.3 (32.8–46.0)	89	40.6 (34.1–47.5)	85	36.8 (30.6–43.4)
Grade 3	8	3.4 (1.5–6.6)	7	3.1 (1.3–6.3)	5	2.3 (0.7–5.2)	7	3.0 (1.2–6.1)
Drowsiness	109	46.4 (39.9–53.0)	100	44.6 (38–51.4)	84	38.4 (31.9–45.1)	96	41.6 (35.1–48.2)
Grade 3	9	3.8 (1.8–7.1)	6	2.7 (1.0–5.7)	4	1.8 (0.5–4.6)	2	0.9 (0.1–3.1)
Irritability/fussiness	140	59.6 (53.0–65.9)	136	60.7 (54.0–67.2)	137	62.6 (55.8–69.0)	129	55.8 (49.2–62.4)
Grade 3	14	6.0 (3.3–9.8)	14	6.3 (3.5–10.3)	12	5.5 (2.9–9.4)	9	3.9 (1.8–7.3)
Loss of appetite	80	34.0 (28.0–40.5)	85	37.9 (31.6–44.7)	83	37.9 (31.4–44.7)	61	26.4 (20.8–32.6)
Grade 3	6	2.6 (0.9–5.5)	3	1.3 (0.3–3.9)	9	4.1 (1.9–7.7)	7	3.0 (1.2–6.1)
Fever	80	34.0 (28.0–40.5)	72	32.1 (26.1–38.7)	68	31.1 (25.0–37.6)	75	32.5 (26.5–38.9)
Grade 3	4	1.7 (0.5–4.3)	3	1.3 (0.3–3.9)	4	1.8 (0.5–4.6)	2	0.9 (0.1–3.1)
<i>Unsolicited AEs</i>	N = 237		N = 226		N = 222		N = 234	
Any	69	29.1 (23.4–35.3)	68	30.1 (24.2–36.5)	74	33.3 (27.2–40.0)	53	22.6 (17.5–28.6)
Grade 3	6	2.5 (0.9–5.4)	4	1.8 (0.5–4.5)	5	2.3 (0.7–5.2)	6	2.6 (0.9–5.5)
Any related	7	3.0 (1.2–6.0)	1	0.4 (0.0–2.4)	5	2.3 (0.7–5.2)	2	0.9 (0.1–3.1)
Grade 3	1	0.4 (0.0–2.3)	0	0.0 (0.0–1.6)	0	0.0 (0.0–1.6)	0	0.0 (0.0–1.6)
Children with reported SAEs throughout the study								
Any	29		26		38		24	
Any related	1		2		1		0	

n (%), number (percentage) of doses followed by at least one AE; CI, confidence interval; AE, adverse event; N, number of documented doses; SAE, serious adverse event. Note: Grade 3 events were defined as “cried when limb was moved/spontaneously painful” for pain at injection site, “diameter > 30 mm” for redness and swelling, “rectal temperature > 40 °C” for fever, “not eating at all” for loss of appetite, and “preventing normal activity” for all other AEs.

All solicited local reactions were considered causally related to vaccination. The causality of all other AEs was assessed by the investigator.

The results presented here will contribute to further advances in the development of PCVs. Both investigational vaccines showed a reactogenicity profile very similar to that observed for PHiD-CV. AE incidence was comparable among groups receiving PHiD-CV formulations and corresponded to previously published results [38]. However, adding more serotypes may also trigger an increase in reactogenicity, as previously shown for a 15-valent PCV [8], and a potential interference with the immune responses to other paediatric vaccines [9].

The study's main strength was its design, with sufficient power to demonstrate the 2 co-primary confirmatory objectives of immunological non-inferiority. Potential limitations of the study were the lack of evaluation of T-cell responses and of the immune responses to co-administered vaccines to assess interference with the investigational vaccines. No statistical analyses were carried

out to compare the 2 licensed vaccines. OPA was only evaluated in a subset of participants; therefore, these results should be interpreted with caution.

5. Conclusions

The investigational 11vPHiD-CV and 12vPHiD-CV vaccines given to infants as a 3 + 1 vaccination schedule showed immune responses to the 10 PHiD-CV serotypes which were at least non-inferior to those elicited by the licensed PHiD-CV. The 6A and 19A conjugates in 11vPHiD-CV and 12vPHiD-CV did not appear to negatively alter the immunogenicity of the 10 conjugates or protein D. Despite non-inferiority criteria not being met for both IgG and functional antibodies for serotypes 19A and 6A, the percentages of children with antibody concentrations over the pre-

specified threshold were high following primary vaccination. Both investigational vaccines showed acceptable reactogenicity profiles, similar to that of PHiD-CV.

6. Trademark statement

Synflorix and *Infanrix hexa* are trademarks of the GSK group of companies. *Prevnar 13/Prevenar 13* and *NeisVac-C* are trademarks of Pfizer Inc.

Acknowledgements

The authors thank the study participants and their parents. The authors would also like to acknowledge the assistance of the investigators, clinicians, study nurses and other staff members in conducting the trial. In addition, they would like to thank the serological laboratory teams of the GSK group of companies for their contribution to this study, in particular Karine Muller (Keyrus Biopharma c/o GSK) for statistical analysis, Anca Farkas, Liliana Manciu and Domenica Majorino (XPE Pharma & Science c/o GSK) for protocol and clinical report writing, Inge Delmotte (SynteractHCR Benelux NV) and Mercedes Lojo Suarez for global study management. Authors would like to thank Petronela M. Petrar (XPE Pharma & Science c/o GSK) for medical writing support and Ekaterina Ivanova (XPE Pharma & Science c/o GSK) for manuscript coordination.

Conflict of interest

DB and MT are employees of the GSK group of companies; KD was employed by the GSK group of companies; DB and KD hold shares of the GSK group of companies. For the conduct of the study: FCM, JMM and LS received personal fees from GSK group of companies and RP received grants from GSK group of companies; outside the submitted work: JMM reports personal fees from GSK group of companies, Pfizer and Sanofi Pasteur, LS reports grants from Novartis, Pfizer and Sanofi Pasteur, and grants from GSK group of companies in the past; RP reports grants from GSK group of companies, Novartis and Sanofi Pasteur, TJ reports personal fees from Pfizer. All other authors declare no conflict of interest.

Author's contribution

COR, DB, JB, KD, MT, and RP designed the study. ACM, COR, FCM, JB, JMMA, KD, LS, MH, MMV, RP, RR, and TJ acquired the data. COR, DB, JB, JMMA, KD, LS, MMV, MT, and RP analyzed the data. ACM, COR, FCM, JMMA, KD, LS, MH, RP, JB, RR, and TJ contributed to the conduct of the study. All authors reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

Funding

GlaxoSmithKline Biologicals SA was the funding source and was involved in all stages of the study conduct and analysis. GlaxoSmithKline Biologicals SA also took responsibility for all costs associated with the development and publishing of the present manuscript.

References

- [1] World Health Organization. Pneumococcal vaccines WHO position paper – 2012. *Wkly Epidemiol Rec* 2012;87:129–44.
- [2] Prymula R, Schuerman L. 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: synflorix. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:1479–500. <https://doi.org/10.1586/erv.09.113>.
- [3] Plosker GL. 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a review of its use in infants, children, and adolescents. *Paediatr Drugs* 2013;15:403–23. <https://doi.org/10.1007/s40272-013-0047-7>.
- [4] Domingues CM, Verani JR, Montenegro Renoier EI, de Cunto Brandileone MC, Flannery B, de Oliveira LH, et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. *Lancet Respir Med* 2014;2:464–71. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(14\)70060-8](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(14)70060-8).
- [5] International Vaccine Access Center (IVAC), Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. Pneumococcal conjugate vaccine (PCV) product assessment; April 2017. Available at <<http://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/ivac/resources/pcv-product-assessment-april-25-2017.pdf>> [accessed 7 March 2018].
- [6] de Oliveira LH, Camacho LA, Coutinho ES, Martinez-Silveira MS, Carvalho AF, Ruiz-Matus C, et al. Impact and effectiveness of 10 and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines on hospitalization and mortality in children aged less than 5 years in Latin American countries: a systematic review. *PLoS One* 2016;11:e0166736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166736>.
- [7] Tin Tin Htar M, Christopoulou D, Schmitt HJ. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis* 2015;15:419. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1147-x>.
- [8] McFetridge R, Meulen AS, Folkerth SD, Hoekstra JA, Dallas M, Hoover PA, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine* 2015;33:2793–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.025>.
- [9] Dagan R, Poolman J, Siegrist CA. Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review. *Vaccine* 2010;28:5513–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.026>.
- [10] Concepcion NF, Frasch CE. Pneumococcal type 22F polysaccharide adsorption improves the specificity of a pneumococcal-polysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:266–72. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.266-272.2001>.
- [11] Poolman JT, Frasch CE, Kayhty H, Lestrade P, Madhi SA, Henckaerts I. Evaluation of pneumococcal polysaccharide immunoassays using a 22F adsorption step with serum samples from infants vaccinated with conjugate vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:134–42. <https://doi.org/10.1128/cvi.00289-09>.
- [12] Henckaerts I, Durant N, De Grave D, Schuerman L, Poolman J. Validation of a routine opsonophagocytosis assay to predict invasive pneumococcal disease efficacy of conjugate vaccine in children. *Vaccine* 2007;25:2518–27. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.029>.
- [13] World Health Organization, Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. Geneva, 19–23 October 2009. Available at <http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/pneumo/Pneumo_final_23APRIL_2010.pdf?ua=1> [accessed 7 May 2018].
- [14] 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;16:376–81. <https://doi.org/10.1128/cvi.00344-08>.
- [15] Wysocki J, Tejedor JC, Grunert D, Konior R, Garcia-Sicilia J, Knuf M, et al. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) when coadministered with different *Neisseria meningitidis* serogroup C conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:S77–88. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318199f609>.
- [16] Vesikari T, Wysocki J, Chevallier B, Karvonen A, Czajka H, Arsene JP, et al. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) compared to the licensed 7vCRM vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:S66–76. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318199f8ef>.
- [17] Alderson MR. Status of research and development of pediatric vaccines for *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 2016;34:2959–61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.107>.
- [18] Ginsburg AS, Nahm MH, Khambaty FM, Alderson MR. Issues and challenges in the development of pneumococcal protein vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2012;11:279–85. <https://doi.org/10.1586/erv.12.5>.
- [19] Odutola A, Ota MO, Antonio M, Ogundare EO, Saidu Y, Foster-Nyarko E, et al. Efficacy of a novel, protein-based pneumococcal vaccine against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants: a phase 2, randomized, controlled, observer-blind study. *Vaccine* 2017;35:2531–42. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.071>.
- [20] Odutola A, Ota MO, Ogundare EO, Antonio M, Owiafe P, Worwui A, et al. Reactogenicity, safety and immunogenicity of a protein-based pneumococcal vaccine in Gambian children aged 2–4 years: a phase II randomized study. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12:393–402. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1111496>.
- [21] Prymula R, Pazdiora P, Traskine M, Ruggeberg JU, Borys D. Safety and immunogenicity of an investigational vaccine containing two common pneumococcal proteins in toddlers: a phase II randomized clinical trial. *Vaccine* 2014;32:3025–34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.066>.
- [22] Prymula R, Szentborn L, Silfverdal SA, Wysocki J, Albrecht P, Traskine M, et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of two investigational pneumococcal protein-based vaccines: results from a randomized phase II study in infants. *Vaccine* 2017;35:4603–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.008>.

- [23] Alari A, Chaussade H, Domenech De Celles M, Le Fouler L, Varon E, Opatowski L, et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on pneumococcal meningitis cases in France between 2001 and 2014: a time series analysis. *BMC Med* 2016;14:211. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0755-7>.
- [24] Chan KC, Subramanian R, Chong P, Nelson EA, Lam HS, Li AM, et al. Pneumococcal carriage in young children after introduction of PCV13 in Hong Kong. *Vaccine* 2016;34:3867–74. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.047>.
- [25] Kaur R, Casey JR, Pichichero ME. Emerging *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing the nasopharynx in children after 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in comparison to the 7-valent era, 2006–2015. *Pediatr Infect Dis J* 2016;35:901–6. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001206>.
- [26] Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Morimoto S, Ito M, Kudo K, et al. Emerging non-PCV13 serotypes of noninvasive *Streptococcus pneumoniae* with macrolide resistance genes in northern Japan. *New Microbes New Infect* 2015;9:66–72. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.11.001>.
- [27] Lindstrand A, Galanis I, Darenberg J, Morfeldt E, Naucler P, Blennow M, et al. Unaltered pneumococcal carriage prevalence due to expansion of non-vaccine types of low invasive potential 8 years after vaccine introduction in Stockholm, Sweden. *Vaccine* 2016;34:4565–71. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.07.031>.
- [28] Bareja C, Toms C, Lodo K, de Kluyver R. Invasive pneumococcal disease in Australia, 2009 and 2010. *Commun Dis Intell Q Rep* 2015;39:E265–79.
- [29] Chalmers JD, Campling J, Dicker A, Woodhead M, Madhava H. A systematic review of the burden of vaccine preventable pneumococcal disease in UK adults. *BMC Pulm Med* 2016;16:77. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0242-0>.
- [30] Imohl M, Moller J, Reinert RR, Perniciaro S, van der Linden M, Aktas O. Pneumococcal meningitis and vaccine effects in the era of conjugate vaccination: results of 20 years of nationwide surveillance in Germany. *BMC Infect Dis* 2015;15:61. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0787-1>.
- [31] van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, Imohl M. Effects of infant pneumococcal conjugate vaccination on serotype distribution in invasive pneumococcal disease among children and adults in Germany. *PLoS One* 2015;10: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131494> e0131494.
- [32] Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(Suppl. 3):16–20. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02726.x>.
- [33] Hausdorff WP, Hanage WP. Interim results of an ecological experiment - conjugate vaccination against the pneumococcus and serotype replacement. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12:358–74. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1118593>.
- [34] Knuf M, Szenborn L, Moro M, Petit C, Bernal N, Bernard L, et al. Immunogenicity of routinely used childhood vaccines when coadministered with the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV). *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:S97–S108. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318199f61b>.
- [35] van den Bergh MR, Spijkerman J, Francois N, Swinnen K, Borys D, Schuerman L, et al. Immunogenicity, safety and reactogenicity of a booster dose of the 10-valent pneumococcal nontypeable *H. influenzae* protein D conjugate vaccine coadministered with DTPa-IPV-Hib in Dutch children: a randomized controlled trial. *Pediatr Infect Dis J* 2016;35:e206–19. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001170>.
- [36] De Wals P, Lefebvre B, Markowski F, Deceuninck G, Defay F, Douville-Fradet M, et al. Impact of 2+1 pneumococcal conjugate vaccine program in the province of Quebec, Canada. *Vaccine* 2014;32:1501–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.028>.
- [37] Jokinen J, Rinta-Kokko H, Siira L, Palmu AA, Virtanen MJ, Nohynek H, et al. Impact of ten-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in Finnish children—a population-based study. *PLoS One* 2015;10:e0120290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120290>.
- [38] Chevallier B, Vesikari T, Brzostek J, Knuf M, Bernal N, Aristegui J, et al. Safety and reactogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) when coadministered with routine childhood vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:S109–18. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318199f62d>.