

Seminario 10 2017

Memoria inmunológica y vacunas

Inmunidad

La inmunidad frente a un antígeno puede ser lograda de forma



NATURAL: Por infección



PASIVA: Por transferencia de Acs o células



ACTIVA: Por administración de un Ag

Inmunización Pasiva

- **Transferencia de anticuerpos IV o IM**

Protección temporaria (\pm 1 mes)

Objetivos de uso:

- Profilaxis pre-exposición (Igs hiperinmunes anti-hepatitis A)
- Profilaxis post-exposición (Igs hiperinmunes anti-toxoide tetánico; antirrábica)
- Terapia (Igs estándar en pacientes con inmunodeficiencias humorales)

- **Transferencia de células**

Inmunización activa

Objetivo



Inducción de respuesta adaptativa



Producción de Ac y células B y T de memoria específicas

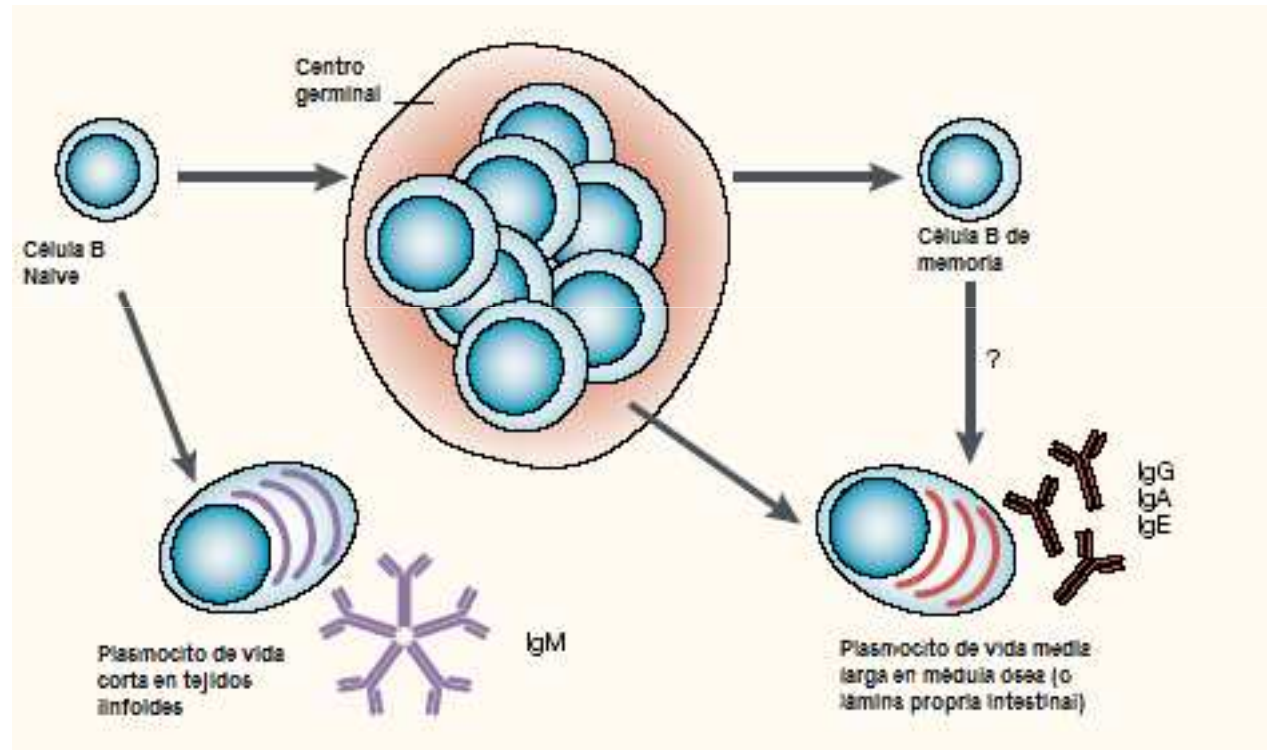


Objetivo: Respuesta rápida y eficiente ante un reencuentro con el mismo antígeno

Memoria inmunológica

**La memoria inmunológica está sustentada en anticuerpos
específicos circulantes y linfocitos T y B de memoria que
persisten en el tiempo**

En la respuesta primaria se generan plasmocitos de vida media corta que secretan IgM de baja afinidad y algunos de vida media larga provenientes de centrocitos del centro germinal



En la respuesta secundaria se activan linfocitos B de memoria que pueden o no generar un nuevo centro germinal y dan origen a plasmocitos de vida media corta y de vida media larga que secretan Igs de isotipos IgM, IgG, IgA e IgE

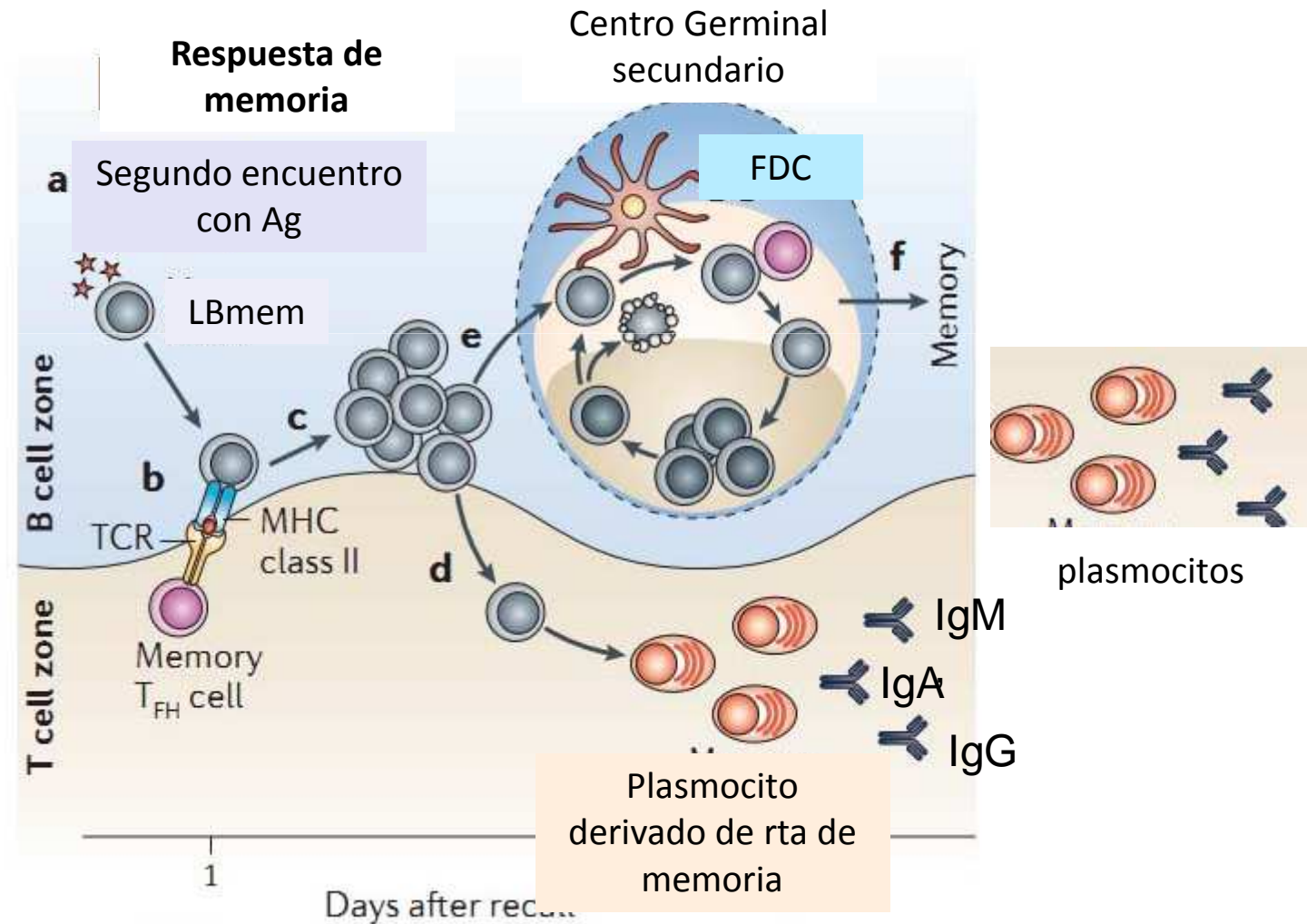
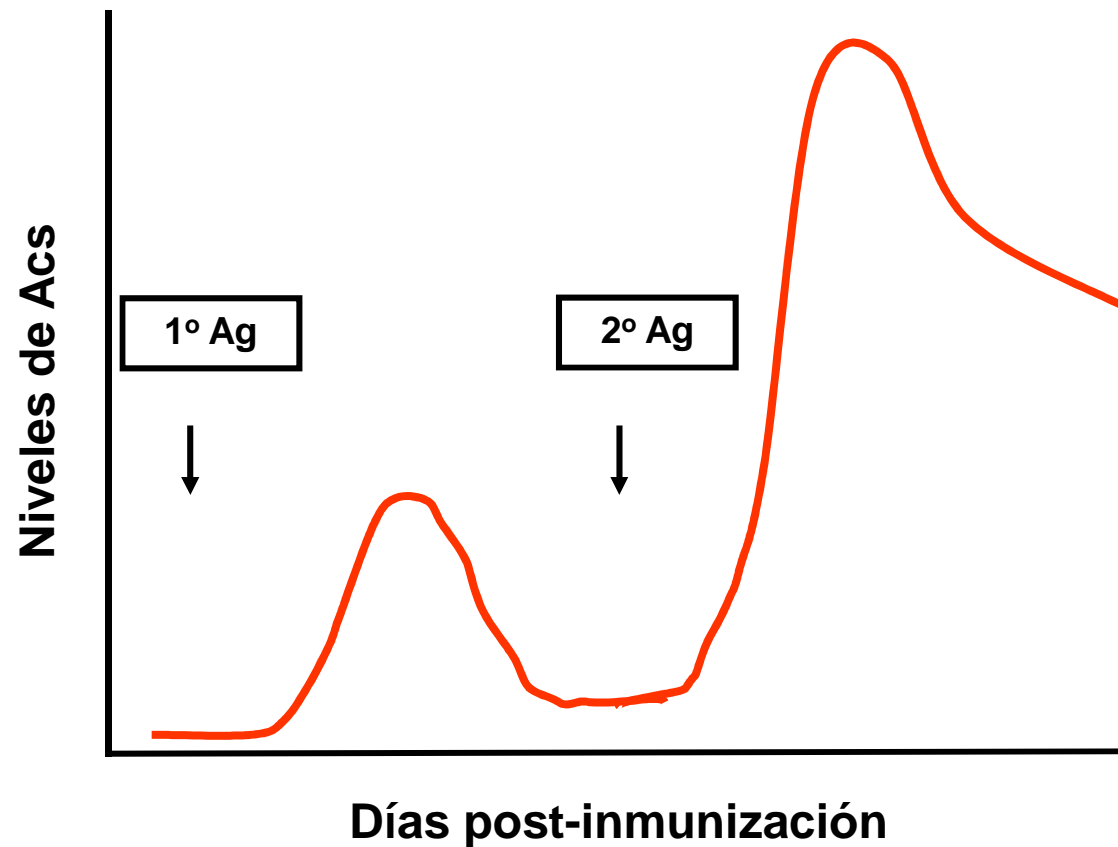


Figure 5 | **Memory response to antigen recall.**

Células B de memoria

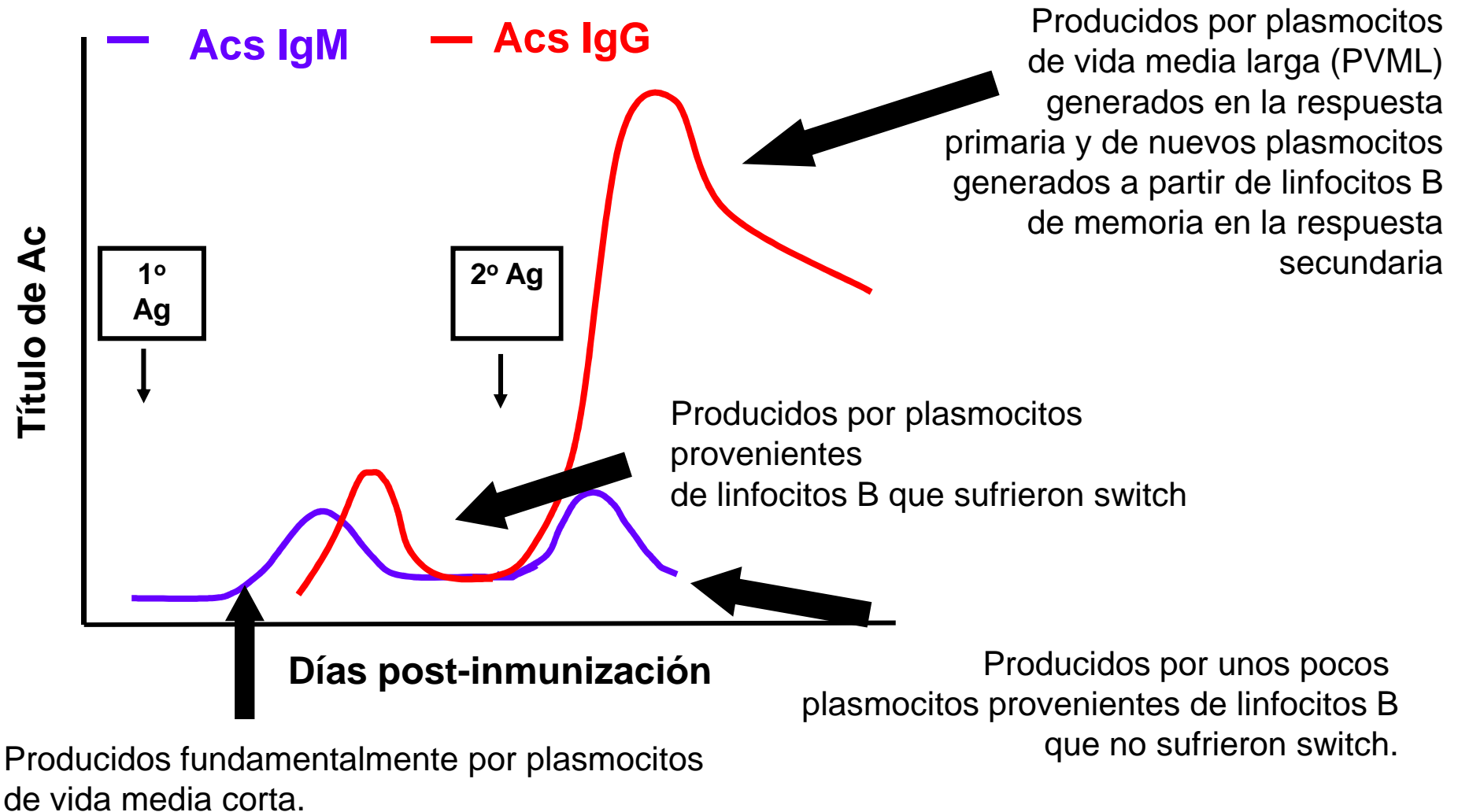
- **Se encuentran en circulación y en tejidos linfáticos secundarios.**
- **Representan el 20% de los linfocitos B circulantes en el individuo adulto. Se caracterizan por la expresión de CD27. La mayoría se encuentra en estado de reposo.**
- **Expresan BCR de alta afinidad y un número muy superior de moléculas del CMH de clase II respecto de linfocitos vírgenes**
- **Al re-exponerse al antígeno median una rápida y potente expansión clonal que resulta en la generación de un número de plasmocitos entre 8 y 10 veces mayor respecto de lo acontecido en la respuesta primaria**

Cinética de la respuesta humoral frente a Ag T-dependientes



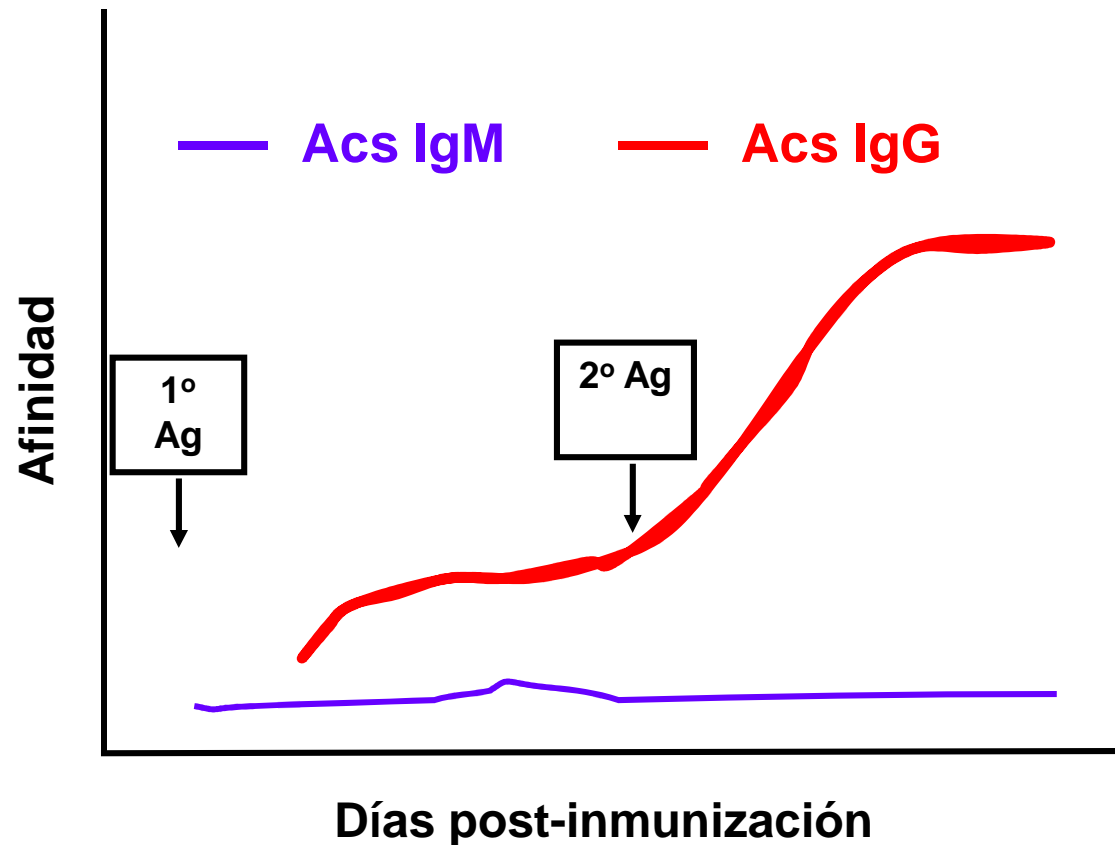
La respuesta humoral secundaria a un antígeno involucra la producción de mayores niveles de Acs debido a que se activa un número incrementado de linfocitos B específicos (linfos B de memoria expandidos durante la respuesta primaria).

Cambios cualitativos en la frecuencia de Acs entre la respuesta primaria y secundaria: Switch isotópico



Cambios cualitativos en los Ac

Rta 1° y 2°: Maduración de la afinidad



Respuesta humoral primaria y secundaria

	Primaria	Secundaria
Tiempo requerido	5-10 días	1-3 días
Intensidad	menor	mayor
Isotipos	IgM > IgG	IgG, IgA, IgE
Afinidad Ac	Baja	Alta
Inmunogéno	Hidratos de carbono, lípidos, proteínas, glico- y lipoproteínas	Proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas

¿Cuánto tiempo se extiende la memoria B?

Anticuerpos contra los agentes etiológicos de sarampión, fiebre amarilla y polio se detectan 40-75 años luego de la infección

En individuos vacunados contra la viruela se detectan niveles protectivos de anticuerpos circulantes 60 años después de la inmunización

En individuos vacunados contra difteria y tétanos los anticuerpos circulantes se reducen al 50% a los 19 y 11 años, respectivamente, luego de la inmunización

**Si la vida media de los anticuerpos IgG
es de aproximadamente 20 días**

**¿Cómo se mantiene activa la producción de
anticuerpos por décadas?**

¿Es necesaria la reexposición al Ag? NO

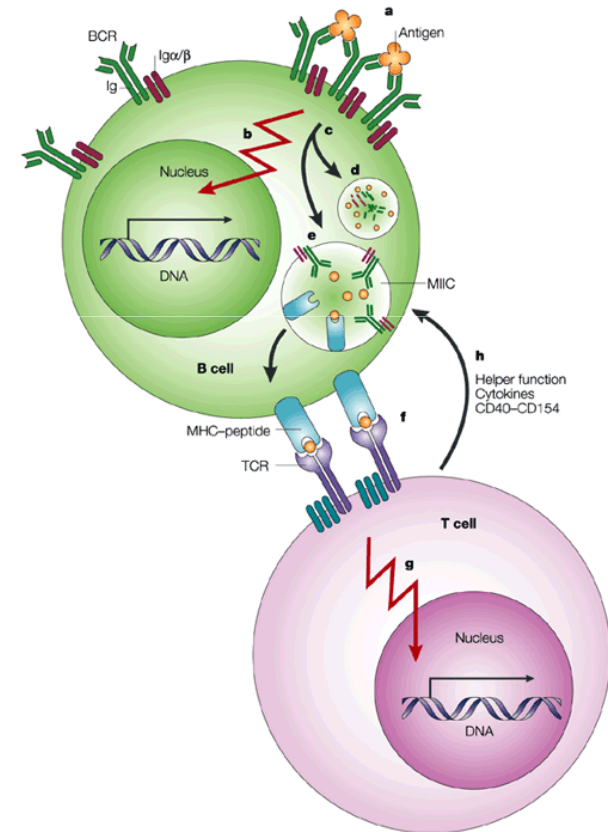
**Contribuye a sustentar la memoria la
reexposición al Ag? SI**

Las células B de memoria pueden activarse:

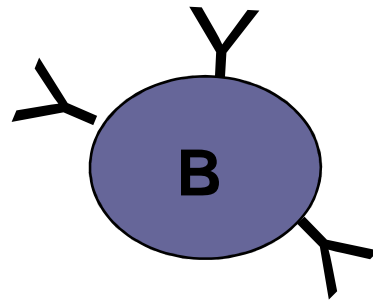
1. En respuesta a estimulación del BCR por el antígeno
2. En respuesta a la estimulación de receptores de reconocimiento de patrones o por citoquinas: estimulación “bystander”

1.- Activación de células B de memoria en respuesta a estimulación del BCR por el antígeno

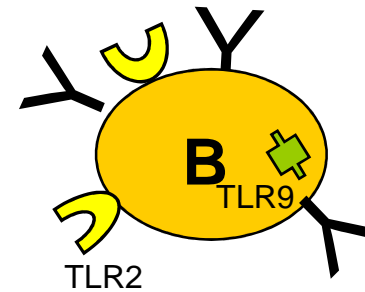
La activación es más eficiente que con las células B nativas porque el BCR tiene alta afinidad y expresan altos niveles de CMH clase II, por lo cual reciben una ayuda de las T_{FH} más intensa. El centro germinal se forma más rápidamente.



2.- Activación de células B de memoria en respuesta a la estimulación de RRP o por citoquinas: estimulación “bystander”



Linfocito B virgen
no expresa TLRs



Linfocito B activado o de
memoria

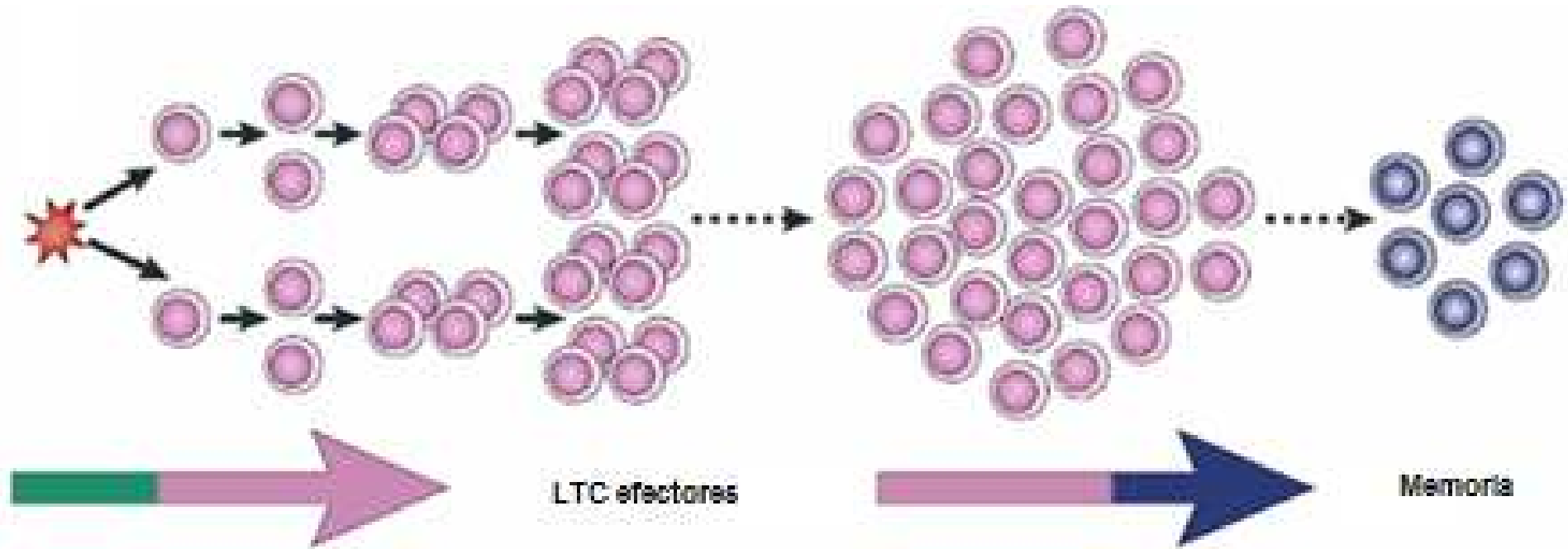


Proliferación y
diferenciación a
plasmocitos.

La memoria humoral se mantiene en el tiempo por:

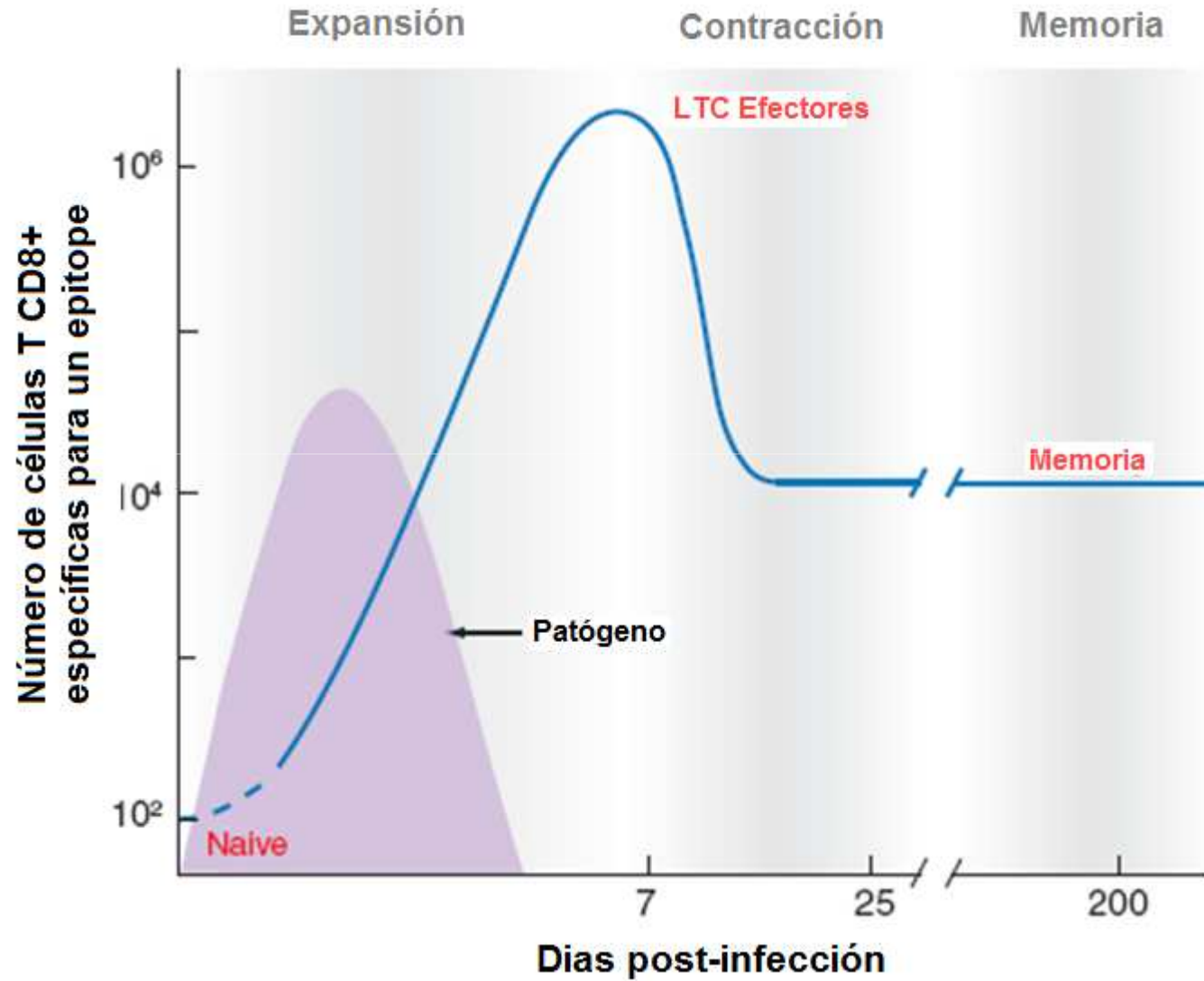
- Generación de plasmocitos a partir de células B de memoria activadas por el antígeno en forma periódica.
- Generación de plasmocitos a partir de células B de memoria activadas por estimulación de RRP o por citoquinas.
- Supervivencia sostenida de plasmocitos en microambientes particulares.

¿Cómo se generan los linfocitos T de memoria?



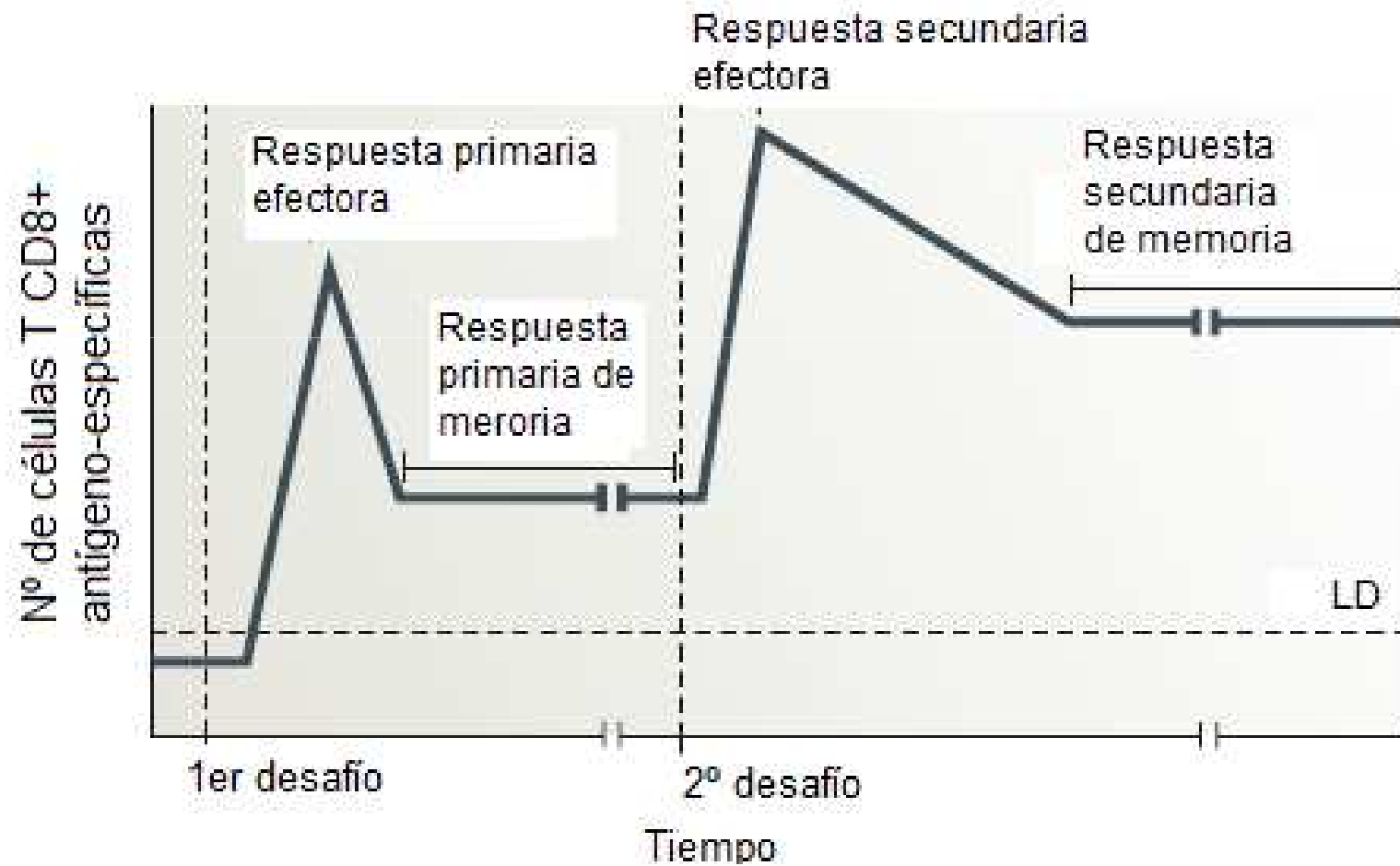
Dado que sólo a lo sumo unos cientos de linfocitos T vírgenes serán específicos para un Ag dado, se requiere una potente respuesta proliferativa de las células específicas frente a un patógeno a fin de combatir una infección ocasionada por él. Un precursor origina más de 10.000 células hijas (más de 13 divisiones celulares en 5-8 días)

Generación de memoria T



Modificado de Annu Rev Immunol 25:171, 2007

Cinética de la respuesta CD8 primaria y secundaria a una infección e impacto del número de encuentros con el antígeno



Las células T de memoria pueden activarse y proliferar:

- En respuesta a la estimulación por el antígeno presentado por CPA profesionales (para CD4+) y CPA profesionales y no profesionales (para CD8+)
- En respuesta a la estimulación por citoquinas como IL-18, IL-12 e interferones de tipo I producidas en respuesta a infecciones por otros microorganismos
- En respuesta a citoquinas homeostáticas (IL-7 e IL-15) provistas por células estromales. Es decir, aún en ausencia de Ag pueden persistir por proliferación homeostática.

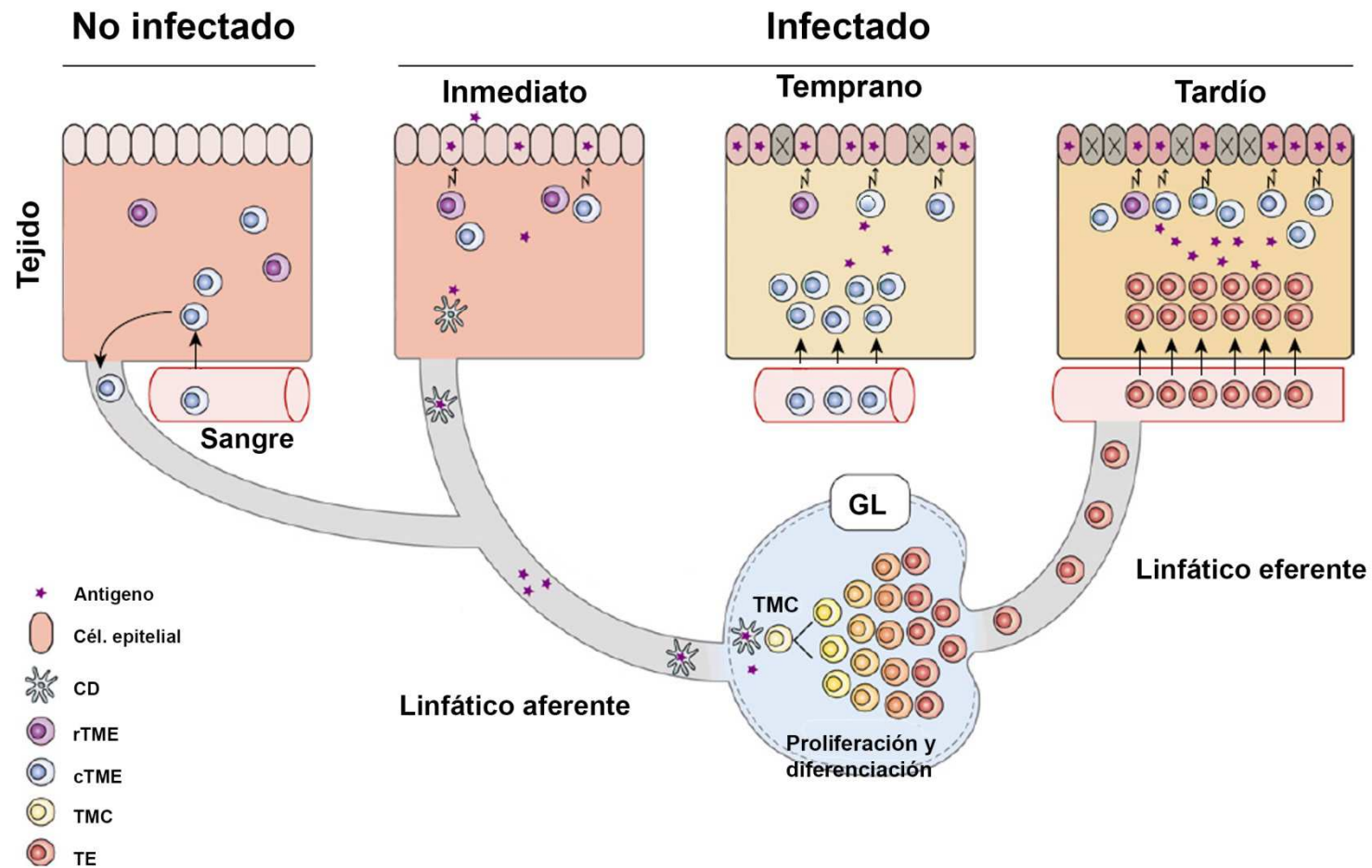
¿En que se sustenta la memoria de células T?

Dos poblaciones de células de memoria

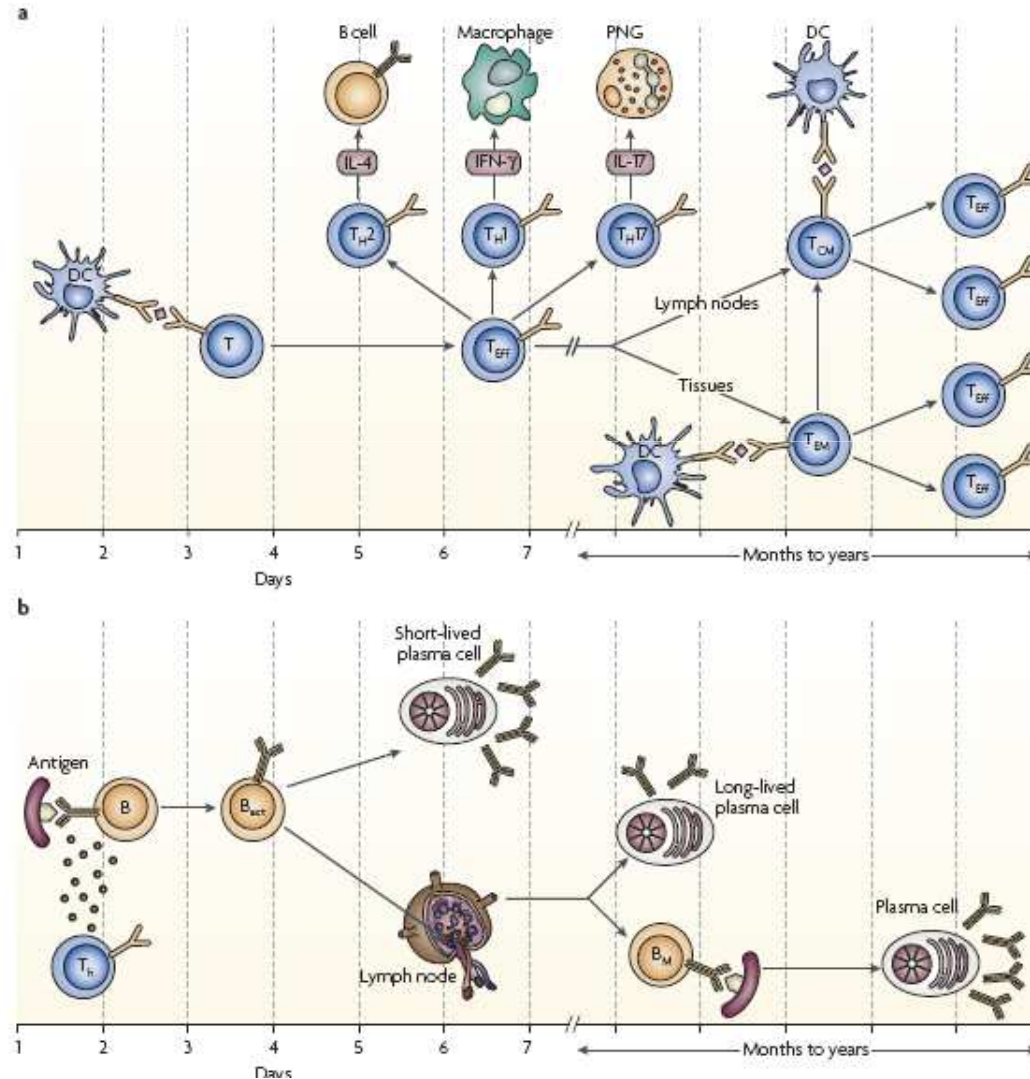
- **Células T de memoria centrales T_{MC}** (CCR7+, L-selectina+)
- **Células T de memoria efectoras cT_{ME}** (CCR7-, L-selectina- con receptores de homing que les permiten ingresar a distintos tejidos periféricos).

Algunas de ellas recirculan ya que reexpresan CCR7 y así ingresan a ganglios a través de vasos linfáticos aferentes y salen luego por vasos linfáticos eferentes y ducto torácico a circulación. Otras células forman poblaciones estables en ciertos tejidos y son llamadas **Células T de memoria efectoras residentes; rT_{ME}** (expresan moléculas de adhesión que determinan su persistencia en el tejido). Un ejemplo lo constituyen los linfocitos CD8 $\alpha\beta$ intraepiteliales.

Dinámica de la respuesta T secundaria en tejidos periféricos



Resumen memoria





Vacunas



El origen de las vacunas



- Pueblos primitivos se inmunizaban contra el veneno de serpientes.
- Variolización en China e India.
- E. Jenner 1778 → observó que las ordeñadoras que se habían contagiado la viruela de la vaca no adquirían la viruela.
1796 → inoculó a James Phipps con linfa de una lesión de una ordeñadora que había adquirido la viruela de la vaca!!!
2 meses después desafió al niño con material de una pústula de viruela
El niño estuvo protegido frente a la enfermedad
- 1877 → Pasteur desarrolló una vacuna atenuada a 42°C preparada con cultivos de *B. anthrax*. Su vacuna protegía a las ovejas del carbunco.

¿Qué tipo de respuesta inmune inducida por una vacuna conferirá protección frente a un microorganismo?

- Microorganismos extracelulares con una fase en sangre crucial para la patogénesis (viremia o bacteriemia):
Respuesta Humoral
- Microorganismos que ingresan por mucosas: **Producción de IgA secretoria neutralizante**
- Microorganismo intracelulares: **Respuesta celular y humoral**

Clasificación de vacunas utilizadas en la actualidad

Vacunas atenuadas

- Microorganismos vivos que carecen de virulencia y no resultan patogénicos para individuos inmunocompetentes, pero pueden ocasionar patología en individuos inmunocomprometidos

Vacunas inactivadas

- Microorganismos totales o enteros
- Vacunas formuladas sobre la base de componentes del patógeno:
 - Vacunas con componentes modificados (toxoides)
 - Vacunas con antígenos recombinantes
 - Vacunas con antígenos purificados (proteínas o polisacáridos del patógeno)
 - Vacunas conjugadas

Clasificación de vacunas utilizadas en la actualidad

Vacunas atenuadas

- Pueden mimetizar el tipo de respuesta inmune inducida por el patógeno, merced a la capacidad del microorganismo atenuado de replicar en el individuo vacunado
- Inducen tanto una respuesta celular como humoral
- En muchos casos una sola dosis induce una buena inmunogenicidad. Sin embargo, dependiendo de la edad en la que se apliquen o cuando se está en plan de erradicación, se recomiendan refuerzos
- Están contraindicadas en individuos inmunocomprometidos

Vacunas inactivadas

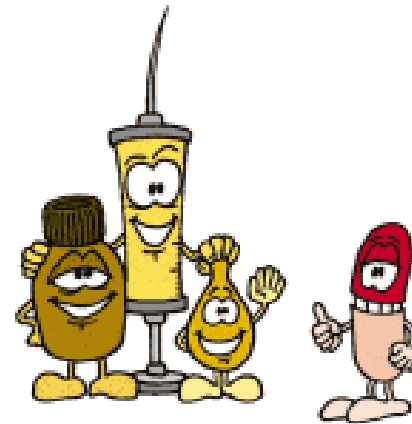
- Por su incapacidad de replicar, inducen una respuesta inmune de menor intensidad y duración que la inducida por las vacunas atenuadas
- Se requieren varias dosis para alcanzar niveles protectivos y sostenidos de protección
- No representan riesgos para individuos inmunocomprometidos

	Vacunas anti-bacterianas	
	Atenuadas	Inactivadas
Células enteras	BCG Tifoidea oral Cólera oral	Tos convulsa Tifoidea parenteral
Acelular		Tos convulsa
Toxoides		Difteria Tétanos
Polisacáridos		Meningococo Neumococo 23-valente
Conjugadas		Meningococo Neumococo conjugada 7-, 10- y 13-valente Haemofilus influenza B

	Vacunas anti-virales	
	Atenuadas	Inactivadas
Virus enteros	Polio oral (PVO) Varicela Sarampión Rubéola Parotiditis Fiebre amarilla Fiebre Hemorrágica Argentina	Polio parenteral (PVI) Gripe Hepatitis A Rabia
Subunidades		Influenza Hepatitis B

Requerimientos de una vacuna exitosa

- Segura
- Estable
- Económica
- Alta tasa de respuesta
- Debe prevenir la infección o en su defecto la enfermedad
- Debe proveer protección duradera con bajo número de inmunizaciones
- Debe previene la transmisión



Poliomielitis

- Enfermedad ocasionada por poliovirus (enterovirus) de tipos 1, 2 y 3.
- El hombre es el único reservorio y el contagio se produce de persona a persona.
- Principal puerta de entrada: Boca. Se encuentra en orofaringe a las 24 hs. Una semana más tarde se instala en el tejido linfático del intestino y se lo aísla en heces.
- Transmisión oral-oral, una a dos semanas después de la infección y fecal-oral, una a seis semanas después.
- **Forma paralítica:** El virus accede al cerebro, se disemina por el mismo y por la médula por vía neuronal, destruyendo focalmente la “sustancia gris” con afectación de neuronas motoras y autónomas. Los virus desaparecen rápidamente pero las reacciones inflamatorias persisten por varios meses. Los afectados pueden quedar con secuelas leves o con parálisis permanente.

Comparación de la respuesta inducida por las dos vacunas antipoliomielíticas usadas en la actualidad

Sabín o antipoliomielítica oral	Salk o antipoliomielítica parenteral
<p>Incluye cepas de virus poliomielíticos vivos y atenuados de los tipos I, II y III.</p> <p>El virus replica en orofaringe y en intestino, induciendo una respuesta humoral con producción de IgA secretoria en mucosas.</p> <p>El virus se excreta con las heces. La vacuna es infecciosa para el entorno (por cada vacunado se inmunizarían 10 contactos); útil epidemiológicamente en países con alta incidencia porque restringe o bloquea la transmisión de virus salvaje.</p> <p>Con muy baja frecuencia, puede ocasionar Parálisis Asociada a Vacuna (PPAV) en vacunados y en personas que han estado en contacto con ellos, especialmente adultos susceptibles e inmunodeprimidos. El riesgo es mayor con la primera dosis (1 caso por 1.400.000-3.400.000 dosis) y para los contactos (1 caso por 6.700.000 dosis).</p> <p>Está contraindicada en individuos inmunocomprometidos (inmunodeficientes y pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores) y embarazadas.</p> <p>No debe administrarse a convivientes con pacientes inmunocomprometidos</p>	<p>Incluye los tres poliovirus inactivados</p> <p>Se aplica en forma subcutánea o intramuscular y produce inmunidad sistémica a través de anticuerpos circulantes. Los mismos pueden prevenir la excreción viral faríngea, pero es menos efectiva para prevenir la infección intestinal. Los anticuerpos previenen la infección de SNC.</p> <p>Es muy efectiva como inmunización individual (100% de eficacia), pero no constituye una barrera epidemiológica.</p>

Vacunas con componentes modificados (toxoides). Ejemplo: vacuna antitetánica

Tétanos: enfermedad neurológica severa ocasionada por *Clostridium tetani* caracterizada por contracturas musculares graves y dolorosas, provocadas por la neurotoxina (tetanospasmina) liberada por la bacteria.

Clostridium tetani: Huésped habitual del intestino animal y humano. Se encuentra también en el suelo. La infección ocurre por ingreso de esporas en heridas o el cordón umbilical en el recién nacido.

Vacuna antitetánica:

- Toxoide (toxina cuya actividad tóxica ha sido suprimida, pero conserva su inmunogenicidad).
- Induce anticuerpos sistémicos capaces de neutralizar a la neurotoxina en caso de infección. Esto evita que la misma se una a células blanco antes de que se active la respuesta inmune frente al patógeno.
- Luego del esquema de vacunación los niveles protectivos de anticuerpos persisten 10 años.

Vacunas con antígenos recombinantes

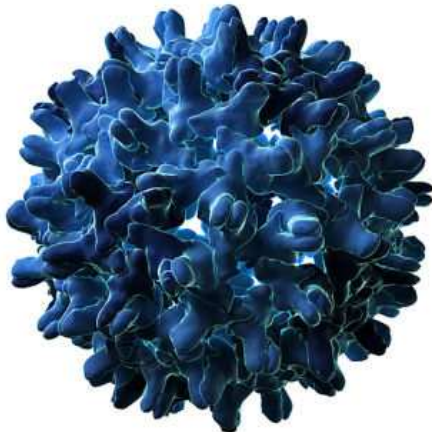
Ejemplo: vacuna anti-hepatitis B

Contiene el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg) elaborado por ingeniería genética.

El gen es insertado en una levadura que se reproduce conteniendo el HBsAg. Luego el antígeno es purificado

La vacuna es altamente efectiva ya que administrada en forma apropiada, induce protección en el 95% de los individuos.

Se administra con sales de aluminio como adyuvante.

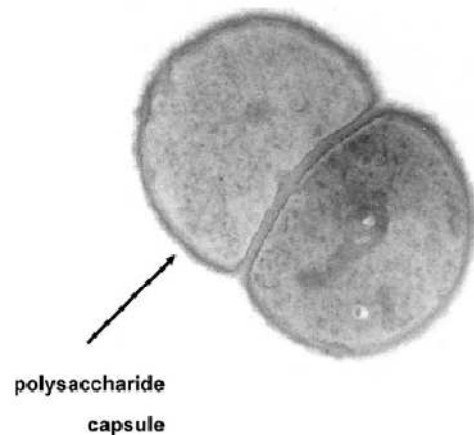


SCIENCEPHOTOLIBRARY



Vacunas con antígenos purificados

Ejemplo: Vacuna polisacarídica anti-pneumocócica

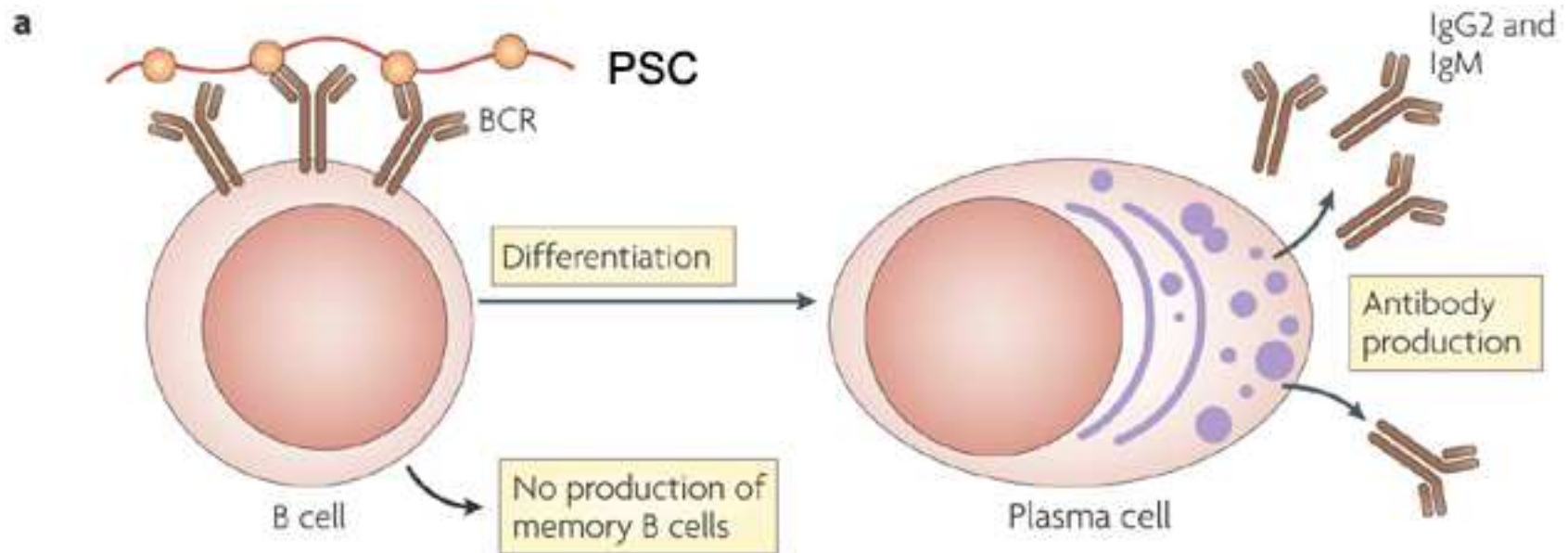


Los polisacáridos capsulares son antígenos
T -independientes



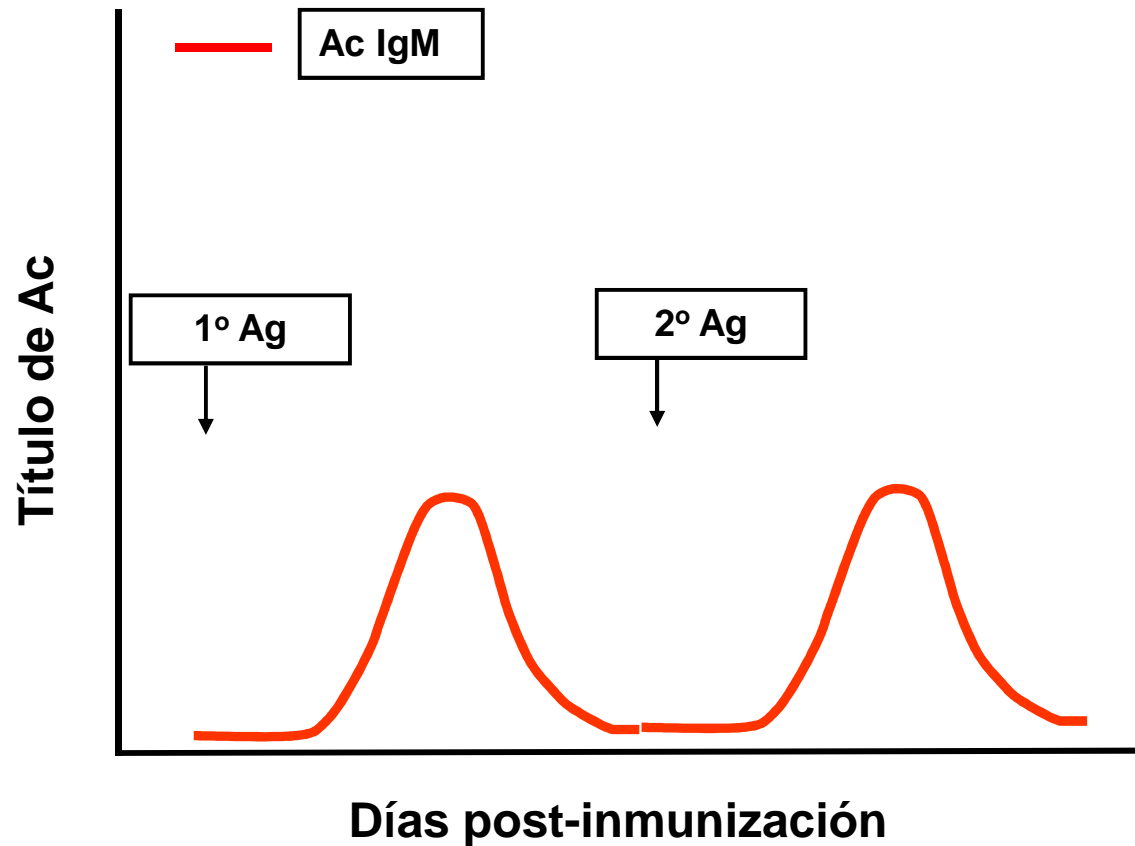
Sólo activan a linfocitos B2M y linfocitos B1

Fig. 1. Scanning electron microscope image of *Streptococcus pneumoniae*.



Cinética de la respuesta humoral frente a Ag T-independientes

- Principalmente Ac IgM
- No Rta secundaria
- No hay maduración de afinidad



Vacunas con antígenos purificados

Ejemplo: Vacuna polisacarídica anti-pneumocócica

Streptococcus pneumoniae (comúnmente llamado neumococo)

Se conocen 90 serotipos basados en el polisacárido capsular

Vacuna polivalente elaborada con antígenos polisacáridos purificados obtenidos de 23 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados por ser los aislamientos predominantes en infecciones invasivas

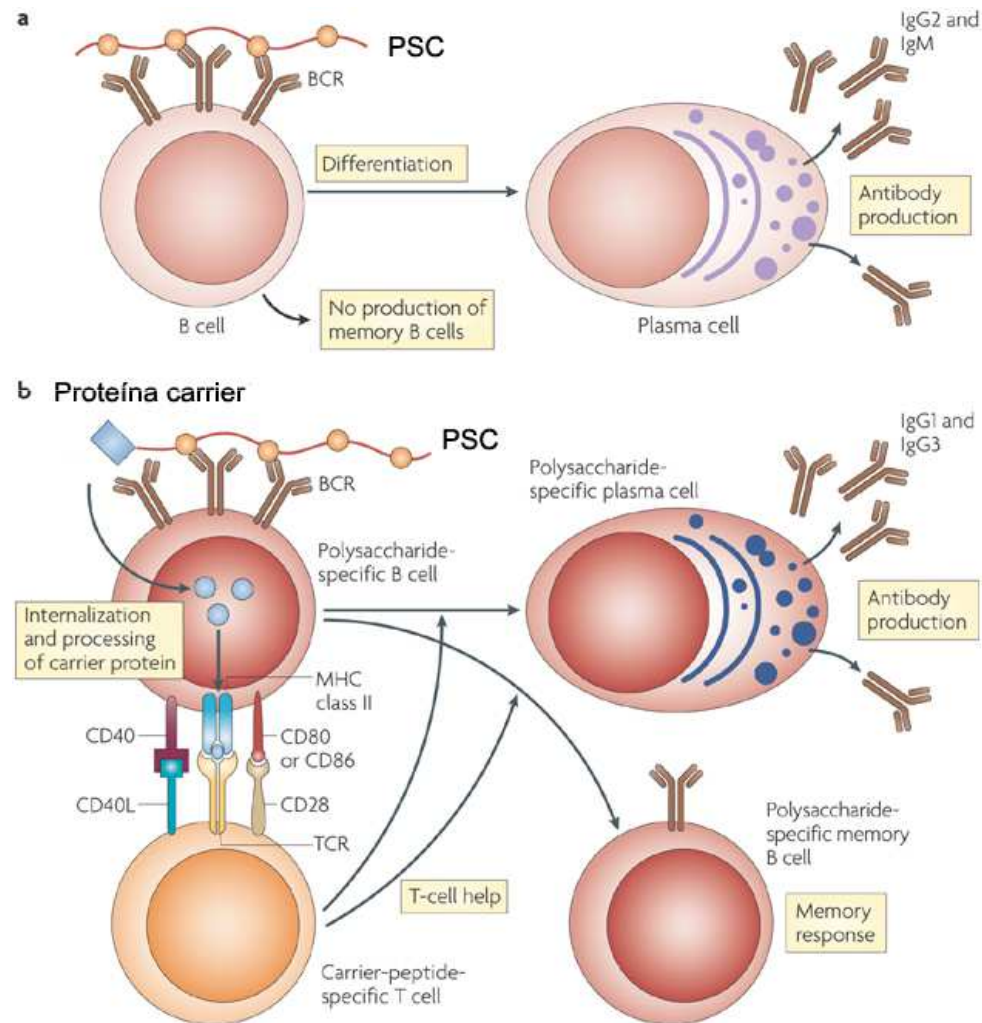
- **NO** puede ser aplicada en menores de 2 años de edad (grupo etáreo que representa al 80% de los pacientes con infecciones graves por esta bacteria)
- Indicada si el paciente va a ser sometido a una esplenectomía

Estrategia para inmunizar a menores de dos años con polisacáridos capsulares: **Vacunas conjugadas**

Vacuna conjugada
PSC conjugado a carrier



Respuesta al PSC
T-dependiente



Vacunas conjugadas incluidas en el calendario nacional de vacunación

Vacuna conjugada *anti-Haemophilus influenzae b*

Vacuna conjugada anti-pneumocócica (13-valente)

Cubre un espectro importante de los serotipos prevalentes en la Argentina

Los polisacáridos capsulares (PSC) son conjugados al toxoide tetánico o al toxoide diftérico que funcionan como carriers

Protección inducida por la vacuna:

Estimula la producción de anticuerpos anti-PSC que permiten opsonizar a la bacteria y eliminarla por fagocitosis

Indicadas en niños menores de dos años

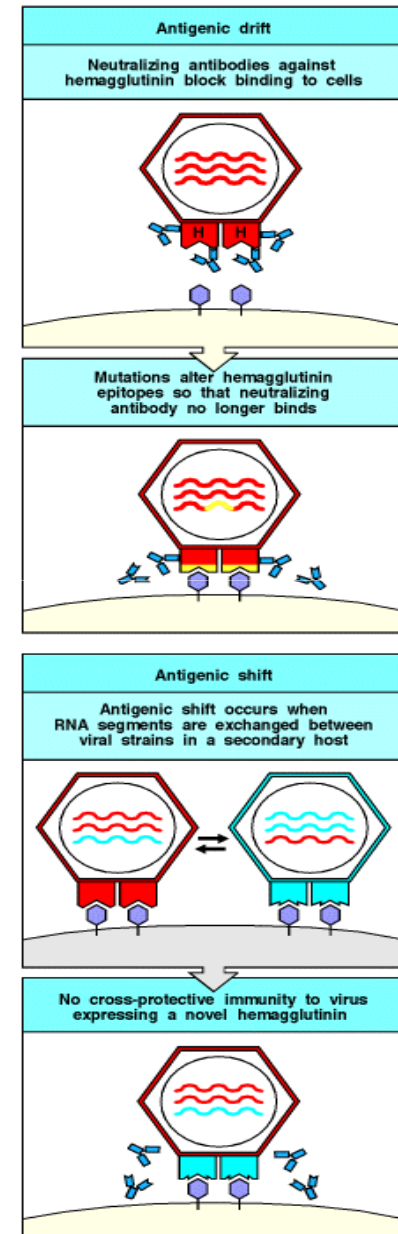
Vacunas inactivadas

Ejemplo: vacuna antigripal

- Contiene 3 cepas de virus de la gripe (dos del tipo A una del tipo B) fraccionado (subvirión), inactivado y purificado, obtenidas en cultivos celulares de embrión de pollo.
- Debido a la alta variabilidad antigénica del virus y a la declinación del título de anticuerpos, debe renovarse anualmente incluyendo las nuevas cepas circulantes.
- La protección conferida se correlaciona con los títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina y neuraminidasa (antígenos inmunodominantes)

En USA se encuentra también autorizada una vacuna a virus vivos atenuados de aplicación intranasal con buena respuesta de mucosas.

En este caso, la respuesta mediada por linfocitos T CD8+ contra Ag más conservados del virus también es importante para la protección



La mayor parte de las vacunas licenciadas confieren protección merced a su capacidad de inducir una respuesta humoral

La respuesta humoral es esencial para la protección frente a:

- Toxinas;
- Bacterias capsuladas;
- Algunos virus



La protección se correlaciona

- ✓ No sólo con los niveles de anticuerpos producidos sino también con la afinidad de los mismos
- ✓ El sitio anatómico donde se provee la protección (sistémica o mucosas)

Los anticuerpos proveen protección neutralizando la acción de toxinas o induciendo la fagocitosis y destrucción de microorganismos infectantes antes de que ocasionen patología

La respuesta celular es responsable de la protección conferida por algunas vacunas

Vacuna BCG (Bacilo Calmette-Guérin)

Vacuna BCG

Tuberculosis: Enfermedad producida por *M. tuberculosis*
1,7 millones mueren anualmente en el mundo por esta enfermedad

Vacuna BCG: formulada con una cepa atenuada derivada de *M. bovis*

La vacuna NO induce producción de anticuerpos protectivos pero sí una respuesta T CD4+ productora de IFN- γ . También induce la activación de linfocitos T CD8+

- Evita la diseminación por vía hematológica (bacteriemia) que se produce en la primoinfección natural por *M. tuberculosis*.
- 70-80% eficacia par proteger de formas severas de tuberculosis en la infancia, particularmente meningitis tuberculosa (debe aplicarse antes del egreso del recién nacido de la maternidad).
- La protección contra la enfermedad pulmonar (más común en adultos) varía en distintas regiones del mundo.
- Duración de la inmunidad ~10 años
- NO debe aplicarse a individuos inmunocomprometidos

Algunos ejemplos de protección inducida en humanos luego de la administración pasiva de anticuerpos generados en individuos vacunados

Microorganismo o enfermedad	Evidencia del efecto de la administración pasiva de anticuerpos
Tétanos	La administración pasiva de Acs y los anticuerpos maternos son muy efectivos. Pueden proveer protección post-exposición en individuos (y el bebé) no vacunados.
Difteria	La administración pasiva de Acs previene la intoxicación, no se sabe su efecto sobre la infección.
Sarampión	La administración pasiva de Acs puede prevenir la enfermedad y la transmisión a los contactos susceptibles.
Rabia	Ig anti-rábica es utilizada en conjunto con la vacuna para neutralizar el virus en el sitio de entrada y prevenir la diseminación al SNC.
Hepatitis B	HIBG tiene un 80-90% de eficacia para prevenir la recurrencia de la infección en individuos con alto riesgo trasplantados del hígado.

Las vacunas acelulares, las recombinantes, las vacunas que incluyen toxoides y las conjugadas suelen ser débilmente inmunogénicas

Se las debe administrar junto con adyuvantes

Son sustancias que potencian la respuesta inmune al antígeno coadministrado

Componentes de una vacuna
Inactivada a subunidades



Adyuvante universalmente empleado: sales de aluminio

Adyuvantes más recientemente incorporado a vacunas:
Monofosforil lípido A (derivado no tóxico del LPS)

Adyuvantes aprobados para vacunas de uso en humanos

Adyuvante	Formulación	Tipo de respuesta inmune que promueve	Vacunas
Sales de aluminio	Sales minerales	Th2, humoral	Triple bacteriana, cuádruple, hepatitis A, hepatitis B, HPV, pneumocócica polisacáridica
MF59	Emulsión de aceite en agua	Th2	Influenza, HSV, HBV
MPL	Monofosforil lipido A	Th1	HBV, HPV
rTCB	Toxina colérica - Subunidad B recombinante	Th2 en mucosas	Cólera

¿Cómo actúan los adyuvantes?

Modulando la distribución del antígeno

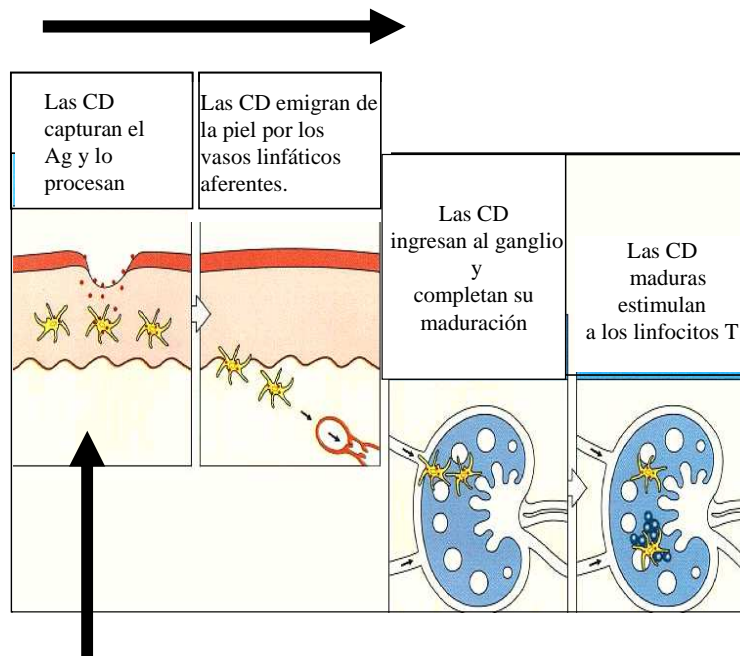
- Facilitando la internalización del Ag por CPA.
- Incrementando la vida media y accesibilidad del Ag en el sitio de inyección (efecto depot).
- Transformando al antígeno en multivalente para potenciar la activación B.

Potenciando la capacidad de activar una respuesta adaptativa y modulando el tipo de respuesta

- Estimulando el reclutamiento de precursores o de células dendríticas al sitio de vacunación.
- Estimulando la maduración de CD (aumentando su capacidad presentadora) o aumentando su capacidad de secretar citoquinas
- Activando a linfocitos B.

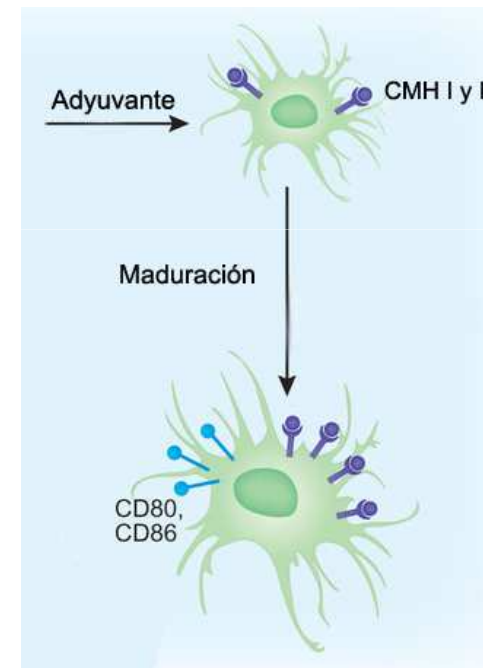
Modos de acción de algunos adyuvantes

Aumentando la maduración
y migración a OLS

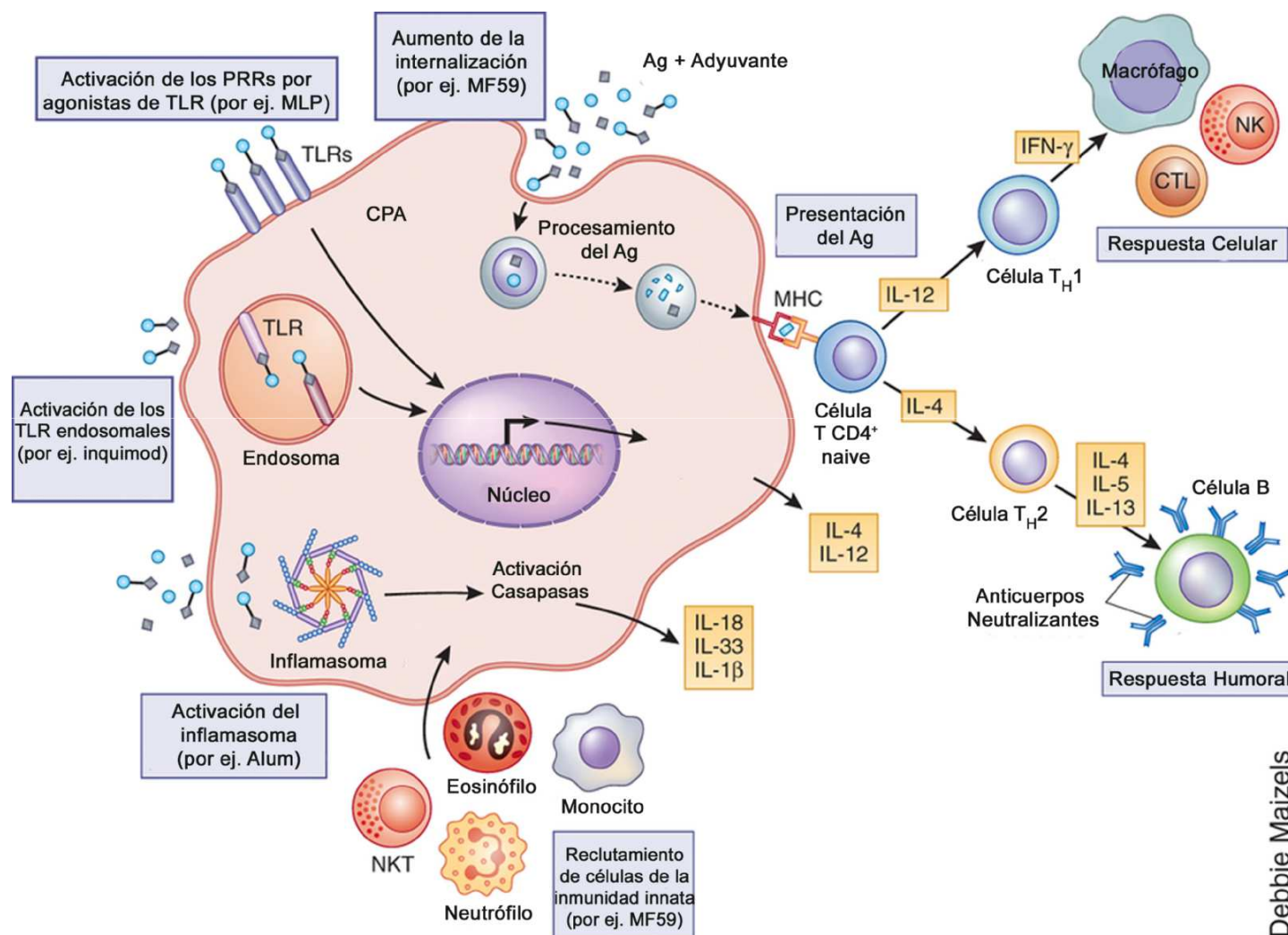


Promoviendo el reclutamiento de
monocitos y precursores de CDs
desde sangre periférica al sitio de vacunación

Aumentando la maduración
(capacidad de presentación antigénica)



Mecanismos de acción de adyuvantes conocidos



Debbie Maizels

¿Por qué las vacunas inactivadas requieren de adyuvantes y las atenuadas no?

Las vacunas atenuadas contienen adyuvantes endógenos: PAMPs del propio microorganismo

Adyuvantes endógenos en vacunas atenuadas	
Vacuna	Adyuvantes endógenos
Antirrábica	ARNsc, ARNdc, ADN CpG
Antipoliomielítica	ARNsc, ARNdc, ADN CpG
Antipaperas, antirubeólica y sarampionosa	ARNsc, ARNdc, ADN CpG
Anti-varicela	ARNsc, ARNdc, ADN CpG
Anti-Fiebre amarilla	ARNsc, ARNdc, ADN CpG
BCG	Peptidoglicano, LPS, CpG,

¿Cómo se desarrollan y evalúan las vacunas?

• Objetivos

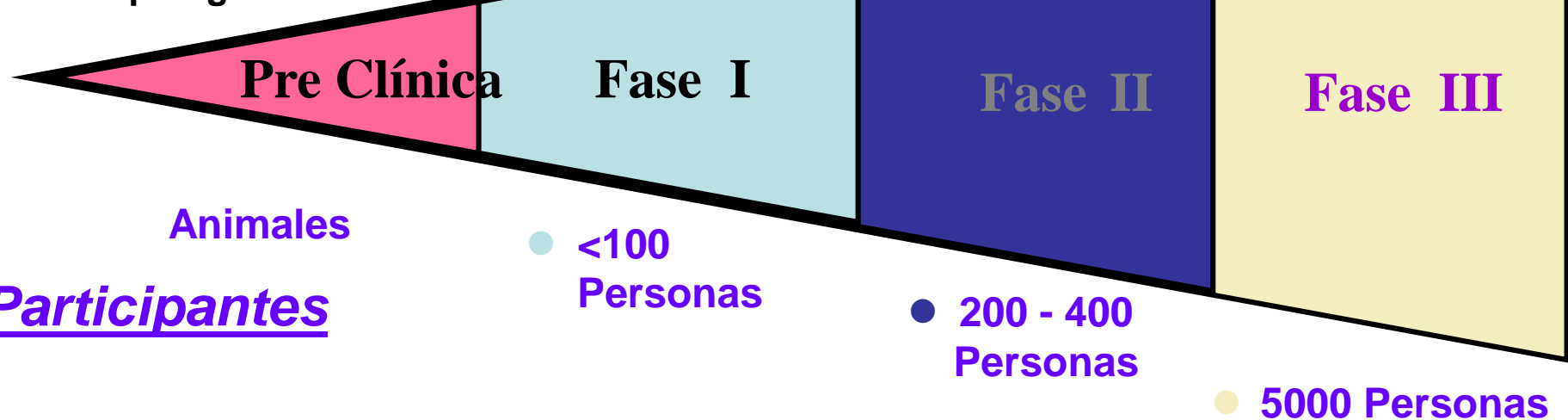
- Induce una respuesta inmunológica?
- Protege ante el desafío con el patógeno?

- Es segura?
- Qué respuesta

inmune induce?

- Es apropiada la dosis?
- Es segura?
- Qué grado de inmunidad logra?

- Funciona?



• Participantes

CALENDARIO NACIONAL DE VACUNACIÓN

El Estado Nacional garantiza:
vacunas **GRATUITAS** en centros de salud
y hospitales públicos de todo el país

Edad	DTG (1)	Segundo E HE (2)	Neumococo Conjugado (3)	Pentavalente DTG-HE-3a (4)	Conjuga DTG-4a (5)	Sóten OPV (6)	Triplo Vid SRP (7)	Gripe (8)	Hepatitis A (9)	Triplo bacteriano con DTP (10)	Difteria bacteriana d (11)	VPH (12)	Polio oral SRP (13)	Polio inactiva (14)	Tubo Hemaglobina Acetato FAM (15)
Nacimiento	1 ^{ra} dosis (8)														
2 meses			1 ^{ra} dosis	1 ^{ra} dosis		1 ^{ra} dosis									
4 meses			2 ^a dosis	2 ^a dosis		2 ^a dosis									
6 meses				3 ^a dosis		3 ^a dosis									
12 meses			Refuerzo				1 ^{ra} dosis	Segunda dosis (9)	1 ^{ra} dosis					1 ^{ra} dosis	
18 meses															
24 meses					1 ^{ra} Refuerzo										
5-6 años						Refuerzo	2 ^a Refuerzo								
11 años		Unica o completa segunda (2)								Refuerzo		3 dosis (1)			3 ^a dosis
A partir de los 15 años															
16 años											Refuerzo (3)				Refuerzo
Cada 10 años											Refuerzo				
Embarazadas															
Postparto															
Personas de salud		3 dosis													

- (1) Dosis de refuerzo de la vacuna.
(2) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(3) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(4) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(5) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(6) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(7) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(8) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(9) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(10) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(11) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(12) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(13) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(14) Si se ha vacunado 12 meses de vida.
(15) Si se ha vacunado 12 meses de vida.

