

INSTITUTO FINLAY

Niveles de antitoxina tetánica y diftérica en recién nacidos y niños preescolares cubanos

Dr. Rolando Felipe Ochoa Azze,¹ Lic. Juan Carlos Martínez Rodríguez,² Lic. Xenia Rosa Ferriol Marchena³ y Dr. Franklin Tomás Sotolongo Padrón⁴

RESUMEN

Se realizaron 2 estudios aleatorios para evaluar por ELISA los niveles de antitoxina tetánica y diftérica inducidos por vacunación, así como para detectar poblaciones no protegidas. El primer estudio se realizó en 1 356 niños preescolares entre 1 y 5 años de edad de todas las provincias de Cuba, y el segundo en 311 recién nacidos de Ciudad de La Habana. Niveles no adecuados de antitoxina tetánica y diftérica (< 0,1 UI/mL) fueron encontrados solo en 23 (1,70 %) y 239 niños (17,62 %), respectivamente. En ambos casos, los menores valores se observaron a los 4 y 5 años de edad antes del refuerzo con la vacuna difteria-tétanos. Se pudo concluir que los niveles de antitoxina tetánica y diftérica en niños preescolares cubanos eran apropiados para la prevención de estas enfermedades. Se observaron niveles excelentes de antitoxina tetánica en los recién nacidos, 87,78 % con valores de larga duración (> 1,0 UI/mL), lo que avala el programa cubano de vacunación para la eliminación del tétanos neonatal. Sin embargo, niveles de antitoxina diftérica inferiores a 0,1 UI/mL fueron detectados en 51,12 % de los recién nacidos evaluados, esto los hace susceptibles a la difteria.

Palabras clave: Tétanos, difteria, antitoxina, vacunación, ELISA.

El tétanos es aún un grave problema de salud, que dentro del grupo de las enfermedades prevenibles por la vacunación se erige como la tercera causa de muerte en el mundo, únicamente superado por la hepatitis B y el sarampión. El tétanos neonatal persiste en mayor o menor medida en muchos países en vías de desarrollo, lo que se ha relacionado con prácticas inadecuadas durante el parto, así como con el bajo nivel de antitoxina tetánica en las madres y por consiguiente con una pobre transferencia pasiva al feto durante el embarazo.¹⁻³

La difteria ha resurgido en muchos países de forma epidémica, afectando principalmente a los adultos que han perdido la inmunidad inducida por

vacunas, y a los niños no inmunizados.⁴⁻⁷ La brecha de la inmunidad en los adultos y la presencia de un gran número de niños susceptibles y adolescentes, ha creado las bases para estas epidemias, tal y como fue reportado recientemente para los estados que surgieron de la antigua Unión Soviética y los países de la Europa Oriental. El resurgimiento epidémico de la difteria ha alertado sobre la necesidad del estudio del nivel de inmunidad contra esta enfermedad en diferentes áreas geográficas y poblaciones.⁴⁻⁷

La vacunación es un procedimiento muy efectivo para el control de ambas enfermedades, pues garantiza el mantenimiento de niveles de antitoxina protectores en la población, que permitan

¹ Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Inmunología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar.

² Investigador Agregado. Tecnólogo de I Nivel.

³ Investigador Auxiliar.

⁴ Especialista de II Grado en Microbiología. Profesor Auxiliar.

prevenir brotes.^{2,5,8} El programa cubano de vacunación emplea una serie primaria de 3 dosis de la vacuna triple difteria-pertussis-tétanos (DPT) durante el primer año de vida. Una cuarta dosis de DPT es administrada entre el primer y segundo año de edad, y una quinta dosis de la vacuna difteria-tétanos (DT) cuando el niño se incorpora a la escuela. Refuerzos con toxoide tetánico (TT) son aplicados cada 10 años hasta los 60 años de edad, y luego cada 5 años. Las embarazadas son inmunizadas en el sexto mes de su embarazo con TT.⁹ La cobertura nacional de vacunación se elevó a 90 % a inicios de la década de los años 70,⁹ como resultado el tétanos neonatal y la difteria desaparecieron en 1972 y 1979, respectivamente. Sin embargo, han persistido algunos casos aislados de tétanos⁹ y existe inquietud en relación con la reemergencia de la difteria en diversos países y el nivel inmunitario de la población cubana.^{4-7,9}

El estudio de los niveles de antitoxina es necesario para la evaluación de programas de vacunación y la detección de poblaciones no protegidas,^{9,10} por ello, el perfil de inmunidad en los recién nacidos y niños preescolares cubanos fue estudiado mediante la determinación de los niveles de antitoxina tetánica y diftérica con técnicas inmunoenzimáticas.

MÉTODOS

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizaron 2 estudios aleatorios para la evaluación de los niveles de antitoxina tetánica y diftérica. El primer estudio en niños preescolares entre 1 y 5 años de edad, seleccionados de todas las provincias de Cuba durante 2001. Se estimó que el tamaño de la muestra debía tener como mínimo 1 152 niños; asumiendo una seroprevalencia de antitoxinas detectables de 80 %, 95 % de confiabilidad, una precisión de 5 %, así como teniendo en cuenta el carácter estratificado del muestreo.¹¹ El reclutamiento fue adicionalmente aumentado para compensar posibles pérdidas, siendo finalmente de 1 356 niños.

El segundo estudio se realizó en recién nacidos en 2002 en Ciudad de La Habana. El cálculo del tamaño de la muestra se basó en una sero-

prevalencia de antitoxinas detectables de 60 %, 95 % de confiabilidad y una precisión de 10 %.¹¹ El tamaño estimado fue de 256. El reclutamiento también fue aumentado hasta 311 recién nacidos.

La aprobación y el control del cumplimiento de los requisitos éticos para ambos estudios se realizaron por el Comité Ético para las Investigaciones en humanos del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Se brindó información a los padres sobre los objetivos del estudio y se obtuvo de estos el consentimiento informado por escrito.¹²

El cumplimiento del esquema de vacunación, para los niños del primer estudio, fue chequeado en las tarjetas individuales e historias clínicas.

Se realizó una extracción de sangre a cada niño incluido en ambos estudios y las muestras de suero que se obtuvieron fueron almacenadas a – 20 °C hasta su procesamiento.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTITOXINA TETÁNICA Y ANTITOXINA DIFTÉRICA

Se emplearon técnicas inmunoenzimáticas indirectas en fase sólida (ELISA) validadas y que correlacionan con las pruebas de neutralización *in vivo* para la detección de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica.^{13,14} Para la validación, cuantificación e impresión de los resultados se empleó el paquete de programas ELISA de los Centros para el Control de las Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia, EUA.¹⁵

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

La media geométrica (MG) y los intervalos de confianza (IC) a 95 % fueron calculados para cada una de las distribuciones de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica después de la transformación logarítmica de las unidades de antitoxina.

Los resultados fueron clasificados según el nivel de antitoxina: < 0,1 UI/mL -niveles de antitoxina no adecuados para conferir protección; 0,1-1,0 UI/mL –niveles de antitoxina para una protección confiable; y >1,0 UI/mL –niveles de antitoxina para una protección confiable de larga duración.^{5,8,16,17-19}

Para el análisis estadístico se emplearon la prueba de Análisis de Varianza, la prueba exacta de Fisher y la prueba de Rangos Múltiples. En todos los casos se consideró un error de primer tipo $\alpha = 0,05$. La normalidad de las distribuciones analizadas se comprobó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, para los métodos paramétricos de estimación y prueba de hipótesis.

RESULTADOS

Todos los niños con 1 año cumplido habían sido vacunados con las 3 dosis planificadas de DPT, así como los de 2 años con las 4 dosis previstas. Cuando el grupo de 5 años de edad fue dividido en aquellos no vacunados (5A) o vacunados (5B) mediante la dosis de refuerzo con la vacuna DT, 84 niños fueron clasificados como vacunados y 165 como aún no vacunados.

La mayor parte de los niños estudiados presentaron niveles adecuados de antitoxina tetánica, entre ellos 879 (64,82 %) con niveles de protección de larga duración. Valores no adecuados para conferir protección fueron encontrados solamente en 23 niños (1,70 %) (tabla 1).

TABLA 1. Distribución de los niveles de antitoxina tetánica en niños preescolares cubanos durante 2001

Edad (años)	N	Número (porcentaje)		
		<0,1 UI/mL	0,1-1,0 UI/mL	>1,0 UI/mL
1	242	1 (0,41)	57 (23,55)	184 (76,03)
2	268	0 (0,00)	28 (10,45)	240 (89,55)
3	283	2 (0,71)	87 (30,74)	194 (68,55)
4	314	10 (3,18)	160 (50,96)	144 (45,86)
5A	165	10 (6,06)	117 (70,91)	38 (23,03)
5B	84	0 (0,00)	5 (5,95)	79 (94,05)
Total	1 356	23 (1,70)	454 (33,48)	879 (64,82)

N: Número de niños estudiados por edad; 5A años: Niños de 5 años de edad antes de recibir la dosis de refuerzo con DT; 5B años: Niños de 5 años de edad después de recibir la dosis de refuerzo con DT.

En cambio, niveles no confiables de antitoxina diftérica se detectaron en un grupo mayor de 239 niños (17,62 %) (tabla 2). Sin embargo, se observaron adecuados valores durante el primer y segundo años de edad; con solo 20 (8,26 %) y 10 niños (3,73 %) respectivamente, con niveles de antitoxina inferiores a 0,1 UI/mL.

TABLA 2. Distribución de los niveles de antitoxina diftérica en niños preescolares cubanos durante 2001

Edad (años)	N	Número (porcentaje)		
		<0,1 UI/mL	0,1-1,0 UI/mL	>1,0 UI/mL
1	242	20 (8,26)	131 (54,13)	91 (37,60)
2	268	10 (3,73)	120 (44,78)	138 (51,49)
3	283	51 (18,02)	172 (60,78)	60 (21,20)
4	314	88 (28,03)	215 (68,47)	11 (3,50)
5A	165	68 (41,21)	96 (58,18)	1 (0,61)
5B	84	2 (2,38)	18 (21,43)	64 (76,19)
Total	1 356	239 (17,62)	752 (55,46)	365 (26,92)

N: Número de niños estudiados por edad; 5A años: Niños de 5 años de edad antes de recibir la dosis de refuerzo con DT; 5B años: Niños de 5 años de edad después de recibir la dosis de refuerzo con DT.

Los menores valores, tanto para el tétanos como para la difteria, se observaron a los 4 y 5 años de edad antes del refuerzo con DT ($p < 0,001$). Se observó claramente en el grupo 5B ($p < 0,001$) el efecto de refuerzo después de la vacunación con DT (tablas 1, 2 y 3).

TABLA 3. Media geométrica e intervalos de confianza a 95 % de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica en niños preescolares cubanos durante 2001

Edad (años)	Antitoxina tetánica		Antitoxina diftérica	
	MG (UI/mL)	IC 95 % (UI/mL)	MG (UI/mL)	IC 95 % (UI/mL)
1	2,53	2,15 - 2,97	0,63	0,52 - 0,76
2	3,15	2,52 - 3,53	0,91	0,80 - 1,04
3	1,42	1,26 - 1,59	0,33	0,29 - 0,39
4	0,84	0,76 - 0,93	0,17	0,15 - 0,19
5A	0,66	0,58 - 0,75	0,13	0,11 - 0,15
5B	6,30	4,87 - 8,15	2,25	1,52 - 3,33
Total	1,51	1,42 - 1,61	0,35	0,32 - 0,37

MG: Media geométrica; IC: Intervalo de confianza; 5A años: Niños de 5 años de edad antes de recibir la dosis de refuerzo con DT; 5B años: Niños de 5 años de edad después de recibir la dosis de refuerzo con DT.

TABLA 4. Distribución de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica en 311 recién nacidos de Ciudad de La Habana, 2002

	N	Número (porcentaje)		
		< 0,1 UI/mL	0,1-1,0 UI/mL	> 1,0 UI/mL
Antitoxina tetánica	311	0 (0,00)	38 (12,22)	273 (87,78)
Antitoxina diftérica	311	159 (51,12)	148 (47,59)	4 (1,29)

N: número de recién nacidos estudiados.

En el grupo de los recién nacidos se encontraron niveles excelentes de antitoxina tetánica, 87,78 % con valores correspondientes a protección de larga duración (tabla 4). La MG fue de 4,16 UI/mL, y el IC 95 % de 3,65-4,74 UI/mL.

Niveles de antitoxina diftérica inferiores a 0,1 UI/mL fueron detectados en 51,12 % de los recién nacidos estudiados. Solo 4 (1,29 %) presentaron niveles de antitoxina correspondientes a la protección de larga duración (tabla 4). La MG fue de 0,09 UI/mL, y el IC 95 % de 0,08-0,10 UI/mL.

DISCUSIÓN

La evaluación de la inmunidad al tétanos y la difteria es muy importante para conocer la efectividad de la vacunación. Niveles de antitoxina mayores que 0,01 UI/mL se han correlacionado con protección, especialmente si pruebas de neutralización *in vivo* son usadas.^{1,3-10,16-19} Sin embargo, cuando se emplean ELISAs, se considera como umbral de confiabilidad para conferir protección, los niveles de antitoxina a partir de 0,1 UI/mL.^{1,3-10,16-19} Los ELISAs han sido muy útiles además para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas de toxoides y para estudios seroepidemiológicos, por su simplicidad, el gran número de muestras que pueden ser procesadas y la elevada precisión y exactitud de sus resultados.^{1,3-10,16-19}

Mediante la revisión de las historias clínicas o tarjetas de vacunación, se corroboró que el esquema básico de vacunación con DPT a los 3, 4, 5 y 17 meses de edad fue cumplido en los niños entre 1 y 5 años de edad evaluados durante este estudio. A pesar del comportamiento excelente en el control de esas enfermedades, este esquema se modificó en los últimos años para comenzar a inducir inmunidad en estadios más tempranos de vida.⁹ El esquema cubano actual, a los 2, 4, 6 y 18 meses de edad, es similar al empleado en muchos países desarrollados.^{5,6,8,9,17,19}

Este primer estudio nacional fue diseñado para evaluar los niveles de antitoxina en niños preescolares, es decir, antes del refuerzo con DT, lo que generalmente tiene lugar en Cuba a los 6 años de edad; sin embargo, algunos niños de 5 años se incorporan a la escuela y por lo tanto

son inmunizados, lo que explica que en la investigación alrededor de la tercera parte de los niños de esta edad cumplían con esta condición, debido a ello este grupo fue analizado teniendo en cuenta los antecedentes de vacunación.

Los niveles de antitoxina tetánica y diftérica en los niños preescolares, demostrados en esta investigación, se corresponden con el esquema de vacunación empleado;⁹ muy elevados a los 2 años de edad, momento en que es completada la serie primaria de 4 dosis de vacuna. Los niveles de antitoxina más bajos se encontraron a los 4 y 5 años de edad antes del refuerzo con DT. Aunque diferentes niveles de antitoxina han sido demostrados en otras investigaciones, de manera general el comportamiento es similar al descrito en este estudio; un incremento inicial en correspondencia con las 4 primeras dosis, que declina luego lentamente hasta la quinta dosis que induce una fuerte respuesta inmune,^{5,7,8,10,16,19} con predominio de los niveles de antitoxina correspondientes a la protección confiable de larga duración; es decir de al menos 10 años, resultado coherente con el refuerzo programado en el esquema de vacunación cubano entre los 13 y 14 años de edad y los refuerzos ulteriores.

Todas las embarazadas cubanas son inmunizadas con TT.⁹ La antitoxina tetánica transferida al feto, le brinda protección al niño durante los primeros meses de vida. Este nivel de inmunidad pasiva pudiera interferir parcialmente con la respuesta a las primeras dosis de DPT, sin embargo, a partir de la tercera el estímulo antigénico es elevado, razón adicional que apoya el esquema actual de vacunación, al diferir la tercera dosis hasta los 6 meses de edad.^{3,8} El tétanos neonatal ha desaparecido en Cuba debido a la alta tasa de inmunidad contra el tétanos en los recién nacidos, como se ha demostrado en esta investigación. Se puede afirmar que la estrategia de vacunación empleada es adecuada para este fin. Sin embargo, se detectaron niveles insuficientes de antitoxina diftérica entre el grupo estudiado de recién nacidos, lo que podría incrementar el riesgo de infección.^{3,5,20}

En la aparición de brotes epidémicos de difteria han incidido varios factores, entre ellos la ausencia de un adecuado nivel inmunitario en la población, la magnitud de la exposición y virulencia del bacilo de la difteria, así como la deficiente situación

socioeconómica, que por una parte limita las campañas de vacunación y por otro hace críticas las medidas higiénico-epidemiológicas necesarias para limitar la enfermedad. De ahí que la difteria, como enfermedad, estuviera restringida por mucho tiempo a la población menor de 15 años en los países subdesarrollados. Se puede decir que los que sobreviven a esta enfermedad en los países más pobres adquieren la inmunidad de forma natural, la cual se mantiene por la exposición antigénica continuada, por lo que prácticamente no aparecen brotes epidémicos más allá de la adolescencia. Sin embargo en los países industrializados, los altos niveles de inmunización en niños han provocado la disminución de la circulación del *Corynebacterium diphtheriae*, por lo que hay menos posibilidades de reforzar la inmunidad por exposición natural, apareciendo grupos de individuos adultos no inmunes con condiciones ideales para brotes epidémicos. En las décadas de los años 80 y 90 se detectó que en algunos de estos países, menos de 50 % de los adultos presentaban una adecuada inmunidad contra la difteria, lo que explica en gran medida la reemergencia de esta enfermedad.^{4-7,10,17} Este perfil de inmunidad debe ser similar en Cuba y pudiera explicar los bajos niveles de antitoxina diftérica en los recién nacidos, que no pueden adquirirla adecuadamente de sus madres. Ante este resultado llama la atención que la difteria no haya resurgido en Cuba. Los autores de este trabajo consideran, por tanto, que debe valorarse la introducción de la vacuna difteria-tétanos formulación para adultos en lugar de TT en el esquema cubano de vacunación y en aquellos países con niveles de antitoxina similares a las demostradas en este estudio.

Esta investigación demuestra que los niveles de antitoxina tetánica y diftérica en niños preescolares cubanos son adecuados para la prevención de estas enfermedades, y que el programa de inmunización empleado en Cuba para la eliminación del tétanos neonatal es apropiado. Sin embargo, los niveles de antitoxina diftérica son insuficientes en los recién nacidos, lo que los hace susceptibles a la difteria.

Levels of tetanic and diphtheric antitoxins in Cuban newborns and young children

SUMMARY

Two randomized cross-sectional studies were carried out in 1 356 children aged 1-5 years selected from all Cuban Provinces, and in 311 newborns from Havana City. These studies were designed for the evaluation of tetanus and diphtheria antitoxin levels elicited by vaccination, by means of ELISA, and for the detection of susceptible populations. No reliable levels of tetanic and diphtheric antitoxins (< 0.1 IU/mL) were found in 23 (1.70 %) and 239 (17.63 %) children respectively. Before bivalent booster vaccine, the 4 and 5-years-old children were the less protected from both tetanus and diphtheria. Our results support that the diphtheria and tetanus antitoxin levels in Cuban children aged 1-5 years are suitable to prevent these diseases. Excellent tetanic antitoxin levels were detected in the newborns since 87.78 % of them showed tetanic antitoxin values above long-term protection level (> 1.0 IU/mL); therefore the vaccination program for the elimination of neonatal tetanus is suitable. However, diphtheria susceptibility was detected in newborns because diphtheric antitoxin levels < 0.1 IU/mL were found in 51.12 % of the sampled newborns.

Key words: tetanus, diphtheria, antitoxin, vaccination, ELISA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Field manual for neonatal tetanus elimination. Geneva: World Health Organization; 1999.
2. Greenwood B. Maternal immunisation in developing countries. *Vaccine* 2003;21(24):3436-41.
3. Vandelaer J, Birmingham M, Gasse F, Kurian M, Shaw C, Garnier S. Tetanus in developing countries: an update on the maternal and neonatal tetanus elimination initiative. *Vaccine* 2003;21(24):3442-5.
4. Hasselhorn HM, Nubling M, Tiller W, Hoffman F. Factors influencing immunity against diphtheria in adults. *Vaccine* 1998;16(1):70-5.
5. Galazka AM. The immunological basis for immunization series. Module 2. Diphtheria. Geneva: World Health Organization; 1996.
6. Ronne T, Valentells R, Tarum S, Griskevica A, Wachmann CH, Aggerbeck H, et al. Immune response to diphtheria booster vaccine in the Baltic states. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 1):213-9.
7. Beyazova U, Guler E, Yucel A, Sahin F. Diphtheria immunity of different age groups in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2002;55(2):52-4.
8. Galazka AM. The immunological basis for immunization series. Module 3. Tetanus. Geneva: World Health Organization; 1996.
9. Ministerio de Salud Pública. Cuba, Anuario Estadístico de Salud 2002. Ciudad de La Habana: MINSAP; 2003.
10. Maple PA, Jones CS, Wall EC, Vyse B, Edmunds WJ, Andrews NJ, et al. Immunity to diphtheria and tetanus in England and Wales. *Vaccine* 2000;19(2-3):167-73.
11. Lwanga SK, Lemeshow S. Determinación del tamaño de las muestras en los estudios sanitarios. Manual Práctico. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1991.
12. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *Bull World Health Organ* 2001;79(4):373-4.

13. Ochoa R, Martínez JC, Fajardo EM, Álvarez E, Estrada E, García AM, et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. *VacciMonitor* 2000;9(4):16-21.
 14. Martínez Rodríguez JC, Ochoa Azze R, Cruces Perón A, Fajardo EM, Álvarez Figueredo E, Ferriol Marchena X, et al. Validation of an ELISA for the quantitation of diphtheria antitoxin in human serum. *Biotecnología Aplicada* 2000;17(3):183-6.
 15. Plikaytis BD, Carlone GM, Turner SH, Gheesling LL, Holder PF. Program ELISA user's manual. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1993.
 16. Jackson LA, Falls S, Yu O, George J, Pietrobon PJ, Rubanowice D, et al. Diphtheria antitoxin levels among children primed with a diphtheria and tetanus toxoids and acellular pertussis vaccine lot with a subpotent diphtheria toxoid component. *J Infect Dis* 2001;183(11):1698-700.
 17. Melker HE de, van den Hof S, Berbers GA, Conyn-van Spaendonck MA. Evaluation of the national immunisation programme in the Netherlands: immunity to diphtheria, tetanus, poliomyelitis, measles, mumps, rubella and *Haemophilus influenzae* type b. *Vaccine* 2003;21(7-8):716-20.
 18. Miller E, Ashworth LA, Redhead K, Thornton C, Waight PA, Coleman T. Effect of schedule on reactogenicity and antibody persistence of acellular and whole-cell pertussis vaccines: value of laboratory tests as predictors of clinical performance. *Vaccine* 1997;15(1):51-60.
 19. Tiru M, Hallander HO, Gustafsson L, Storsaeter J, Olin P. Diphtheria antitoxin response to DTP vaccines used in Swedish pertussis vaccine trials, persistence and projection for timing of booster. *Vaccine* 2000;18(21):2295-306.
 20. Bjorkholm B, Granstrom M, Taranger J, Wahl M, Hagberg L. Influence of high titers of maternal antibody on the serologic response of infants to diphtheria vaccination at three, five and twelve months of age. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14(10):846-50.
- Recibido: 8 de marzo de 2005. Aprobado: 28 de diciembre de 2005.
 Dr. *Rolando Felipe Ochoa Azze*. Instituto Finlay. Avenida 27 No 19805. municipio La Lisa. Ciudad de La Habana. Cuba. AP 16017. CP 11600. Correo electrónico: ochoa@finlay.edu.cu