

Reactogenicidad e inmunogenicidad de una nueva vacuna de toxoide tetánico y diftérico con concentración reducida en adolescentes cubanos

Rolando Felipe Ochoa¹, Idalia Morelia Baró¹, Jorge Menéndez¹, Telma Triana², Mayelín Mirabal, Marlene Armesto¹, Vivian Rodríguez¹, Tania Valmaseda¹, Yovania Fernández¹, Yisabel Aranguren¹, Leidy Creadh², Rafael Domínguez³, Juan Vicente Bayolo¹, Maydelis Alvarez¹, María de los Angeles Peña¹, Meiby de la Caridad Rodríguez¹, Rosa Lidia Solís¹, Francisco Domínguez¹.

¹Instituto Finlay. Centro de Investigación – Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600, Ciudad de La Habana. Cuba. E-mail: ochoa@finlay.edu.cu

²Centro Municipal de Higiene y Epidemiología. Playa. Ciudad de La Habana. Cuba.

³Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”

Se realizó un estudio aleatorizado, controlado y a doble ciegas en 225 adolescentes cubanos entre 13 y 16 años de edad, con el objetivo de evaluar la reactogenicidad y la inmunogenicidad de una nueva vacuna de toxoide tetánico y toxoide diftérico con concentración reducida, producida en el Instituto Finlay, con respecto a su similar comercial IMOVAX dT adult de Aventis Pasteur. Se tomaron muestras de suero antes y 21 días después de la vacunación. La reactogenicidad de ambas vacunas fue similar. Los síntomas y signos, tanto locales como generales fueron moderados y aparecieron principalmente durante las primeras 72 h después de la vacunación. Todos los voluntarios vacunados alcanzaron niveles protectores ($\geq 0,1$ UI/mL) de antitoxina contra el tétanos y la difteria. El 99,25% de los inmunizados con la vacuna experimental y el 98,36% de los voluntarios del grupo control presentaron niveles de antitoxina tetánica correspondientes a una protección de larga duración ($\geq 1,0$ UI/mL); para la antitoxina diftérica se alcanzaron estos niveles en el 81,20% y 80,33% de los voluntarios en cada grupo. Los títulos medios geométricos de antitoxina tetánica (21,73 UI/mL) y antitoxina diftérica (2,55 UI/mL) inducidos por la nueva vacuna fueron superiores ($p < 0,05$) a los del grupo control: 15,55 UI/mL y 1,84 UI/mL, respectivamente.

Palabras clave: Tétanos, difteria, vacuna, reactogenicidad, inmunogenicidad, ensayos clínicos, antitoxina

Introducción

El tétanos es aún un grave problema de salud, constituye la tercera causa de muerte en el mundo entre las enfermedades inmunoprevenibles, únicamente superado por la hepatitis B y el sarampión (1, 2).

La difteria ha resurgido en forma epidémica, afectando principalmente a los adultos que han perdido la inmunidad inducida por vacunas, y a los niños no inmunizados. La brecha de la inmunidad en los adultos y la presencia de un gran número de niños susceptibles y adolescentes han creado las bases para estas epidemias, tal y como ha sucedido en los estados que surgieron de la antigua Unión Soviética y los países de la Europa Oriental (3-6).

La vacunación es un procedimiento muy efectivo para el control de ambas enfermedades, pues garantiza el mantenimiento de niveles protectores de antitoxina en la población (1, 4, 7). El Programa Cubano de Vacunación emplea una serie primaria de tres dosis de una vacuna tetravalente de difteria-pertussis-tétanos y hepatitis B, durante el primer año de vida. Una cuarta dosis de la vacuna difteria-pertussis-tétanos (DPT) entre el primer y segundo año de edad, y una quinta dosis con 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, luego cada 5 años. Las embarazadas son inmunizadas en el sexto mes de su embarazo con TT (8).

La cobertura nacional de vacunación se elevó al 90% a inicios de la década del 70 (8), como resultado el tétanos neonatal y la difteria

desaparecieron en 1972 y 1979, respectivamente. Sin embargo, en los últimos años han persistido algunos casos aislados de tétanos (8) y existe inquietud con relación a la reemergencia de la difteria en diversos países y el nivel inmunitario de nuestra población (3-6, 8, 9).

Por todo ello, el Instituto Finlay ha desarrollado una nueva vacuna de toxoide tetánico y toxoide diftérico con concentración reducida. A pesar de la experiencia acumulada con otras vacunas comerciales de análoga composición, que han demostrado fehacientemente su seguridad y eficacia (4-7, 9, 10), debe verificarse mediante ensayos clínicos que la reactogenicidad e inmunogenicidad de esta nueva vacuna sean comparables con lo reportado para vacunas similares, con el propósito ulterior de proponer su introducción en el Esquema Cubano de Vacunación en sustitución de los refuerzos con toxoide tetánico.

Métodos

Diseño del estudio: Se realizó un estudio aleatorizado, controlado, a doble ciegas, en adolescentes cubanos de 13 a 16 años de edad, entre diciembre de 2005 y marzo de 2006, reclutados en las aulas de 9no. grado de dos secundarias básicas del municipio Playa en Ciudad de La Habana, para evaluar la inmunogenicidad y la reactogenicidad de una nueva vacuna de toxoide tetánico y toxoide diftérico con concentración reducida (dT), producida en el Instituto Finlay (Lote 545), con respecto a su similar comercial IMOVAX dT adult (Lote X5281-1) de Aventis Pasteur, empleada como control. El estudio se realizó siguiendo los principios éticos recogidos en la Declaración de

Helsinki (11). La aprobación y el control del cumplimiento de estos requisitos se realizaron por el Comité Ético para las Investigaciones en Humanos del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Se brindó la información previa y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los voluntarios (11). Como criterios de exclusión se establecieron el presentar alguna enfermedad aguda o crónica, estar bajo tratamiento inmunomodulador, haber recibido alguna vacuna u otro medicamento experimental 30 días antes de comenzar el ensayo o durante su desarrollo, temperatura axilar mayor que 37,5 °C al inicio del estudio, embarazo o lactancia. Una vez obtenida la muestra se distribuyeron los sujetos aleatoriamente en dos grupos según la vacuna empleada y se inmunizaron con una dosis de 0,5 mL por vía intramuscular de la vacuna experimental o la vacuna control. Se tomaron muestras de suero antes y 21 días después de la vacunación y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Evaluación de la reactogenicidad: Se realizó por vigilancia activa durante los primeros 7 días, mediante el registro de síntomas y signos esperados y no esperados en el cuaderno de recogida de datos, previamente diseñado, así como vigilancia pasiva durante los 30 días siguientes a la vacunación. Los eventos adversos locales previstos en el estudio fueron el dolor, enrojecimiento e induración en el sitio de la inyección. Los generales incluyeron la fiebre, cefalea y el malestar general.

Evaluación de la inmunogenicidad: Se emplearon técnicas inmunoenzimáticas en fase sólida (ELISA) validadas y que correlacionan con las pruebas de neutralización *in vivo* para la detección de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica (12, 13). 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 (14).

Métodos estadísticos: Se calculó un tamaño muestral de 225 adolescentes, con una relación 2:1 entre el grupo tratado con la

vacuna experimental y el grupo control. Para la estimación del tamaño muestral se consideró que al menos un 70% de los voluntarios inmunizados superarían los niveles de anticuerpos correspondientes a una protección de larga duración ($\geq 1,0$ UI/mL), precisión del 12%, nivel de significación de 0,05 y un 20% de pérdidas. Se determinó la frecuencia de síntomas locales y generales, tanto esperados como no esperados. Se calcularon los títulos medios geométricos (TMG) antes y 21 días después de la vacunación con sus respectivos intervalos de confianza (IC) al 95% de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica. Se compararon los TMG usando Análisis de Varianza. Los resultados fueron clasificados según el nivel de antitoxina: $< 0,1$ UI/mL niveles de antitoxina no adecuados para conferir protección; $\geq 0,1$ UI/mL niveles de antitoxina para una protección confiable; y $\geq 1,0$ UI/mL correspondientes a una protección confiable de larga duración (3-7, 9, 10, 15-17). Se consideró un error de primer tipo $\alpha=0,05$ para todas las comparaciones.

Resultados

Las pérdidas de voluntarios o del número de muestras de suero útiles no sobrepasaron el 20% planificado. La reactogenicidad se estudió en 216 adolescentes, observándose un comportamiento similar entre la nueva vacuna dT, producida en el Instituto Finlay, y la vacuna control IMOVAX dT adult. Los síntomas y signos esperados, tanto locales como generales fueron moderados. Los síntomas generales que siguieron a la vacunación no se prolongaron más de 72 h, y los locales en sentido general se comportaron de forma similar, siendo el dolor el síntoma que con mayor frecuencia apareció y el que presentó una mayor duración (Tabla 1). Los síntomas y signos no esperados fueron escasos, los más frecuentes correspondieron a infecciones respiratorias agudas y desórdenes del sistema gastrointestinal, no relacionados con las vacunas utilizadas. No se reportaron eventos adversos graves.

Tabla 1. Incidencia de los síntomas y signos locales y generales esperados en adolescentes cubanos vacunados con la vacuna de toxoide tetánico y diftérico (dT) producida en el Instituto Finlay o con la vacuna control IMOVAX dT adult de Aventis Pasteur

Síntomas y signos	Vacuna dT Instituto Finlay (N = 150)		IMOVAX dT adult (N = 66)	
	n	%	n	%
Enrojecimiento	3	2,00	0	0,00
Induración	4	2,67	6	9,09
Dolor	116	77,33	47	71,21
Malestar general	7	4,67	1	1,52
Cefalea	9	6,00	4	6,06
Fiebre ≥ 38 °C	3	2,00	1	1,52

N: Número de adolescentes estudiados en cada grupo.

Se evaluó la inmunogenicidad de las 194 muestras útiles para el laboratorio, de ellas 133 que pertenecen a voluntarios vacunados con la vacuna producida en el Instituto Finlay y 61 procedentes de voluntarios vacunados con IMOVAX dT adult. Ambos grupos presentaron niveles prevacunales homogéneos para cada una de las antitoxinas estudiadas ($p>0,05$). Se alcanzó en todos los voluntarios

una protección del 100% ($>0,1$ UI/mL) contra el tétanos y la difteria (Tablas 2 y 3). El 99,25% de los voluntarios vacunados con la vacuna experimental y el 98,36% de los que recibieron la vacuna control superaron el nivel de antitoxina tetánica correspondiente a una protección de larga duración ($\geq 1,0$ UI/mL) (Tabla 2).

Tabla 2. Títulos medios geométricos, intervalos de confianza al 95% y número (porcentaje) de adolescentes según el nivel de antitoxina tetánica, antes y después de ser vacunados

Antitoxina tetánica	Vacuna dT Instituto Finlay		IMOVAX dT adult	
	T0	T1	T0	T1
<0,1 UI/mL	2 (1,50)	0 (0,00)	1 (1,64)	0 (0,00)
≥0,1 UI/mL	131 (98,50)	133 (100)	60 (98,36)	61 (100)
≥1,0 UI/mL	57 (42,86)	132 (99,25)	26 (42,62)	60 (98,36)
TMG (UI/mL)	0,86	21,73	0,78	15,55
IC 95% (UI/mL)	0,75 – 1,00	19,97 – 24,90	0,62 – 0,97	12,33 – 19,78

T0: Muestra prevacunacional.

T1: Muestra a los 21 días posvacunación.

TMG: Títulos medios geométricos.

IC 95%: Intervalos de confianza al 95%.

De igual forma, la protección de larga duración contra la difteria producida por ambas vacunas fue similar ($p > 0,05$), siendo respectivamente de 81,20% y 80,33%. Llama la atención que los títulos prevacunales en el 40,60% de los adolescentes del grupo experimental y el 34,43% del control no superaran los valores

protectores de antitoxina diftérica (Tabla 3).

Los TMG de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica inducidos por la vacuna experimental fueron superiores a los alcanzados con IMOVAX dT adult ($p < 0,05$) (Tablas 2 y 3).

Tabla 3. Títulos medios geométricos, intervalos de confianza al 95% y número (porcentaje) de adolescentes según el nivel de antitoxina diftérica, antes y después de ser vacunados.

Antitoxina diftérica	Vacuna dT Instituto Finlay		IMOVAX dT adult	
	T0	T1	T0	T1
<0,1 UI/mL	54 (40,60)	0 (0,00)	21 (34,43)	0 (0,00)
≥0,1 UI/mL	79 (59,40)	133 (100)	40 (65,57)	61 (100)
≥1,0 UI/mL	4 (3,01)	108 (81,20)	1 (1,64)	49 (80,33)
TMG (UI/mL)	0,12	2,55	0,13	1,84
IC 95% (UI/mL)	0,11 – 0,15	2,16 – 3,00	0,10 – 0,17	1,49 – 2,26

T0: Muestra prevacunacional.

T1: Muestra a los 21 días posvacunación.

TMG: Títulos medios geométricos.

IC 95%: Intervalos de confianza al 95%.

Discusión

La necesidad de mantener niveles protectores de antitoxina contra el tétanos está relacionada con su vía de transmisión, su alta letalidad y la imposibilidad de adquirir inmunidad natural, de ahí que la eficacia del toxoide tetánico esté dada fundamentalmente por la capacidad que tiene el individuo inmunizado de evitar la enfermedad. En contraste, la eficacia de los programas de vacunación contra la difteria está relacionada con la inmunidad poblacional y la interrupción de la cadena de transmisión (3, 4, 7, 16). La prevención de estas enfermedades se apoya en esquemas de vacunación con vacunas polivalentes que incluyen ambos toxoides entre otros inmunógenos, dirigidos fundamentalmente a los niños, así como en los refuerzos ulteriores. Durante mucho tiempo estos últimos estuvieron dirigidos a la prevención del tétanos, sin embargo, la reemergencia de la difteria en adultos justifica el mantenimiento de

la inmunidad contra esta enfermedad en toda la población (3-6, 9, 10, 16, 17).

Las vacunas dT, denominadas “para adultos”, fueron diseñadas fundamentalmente para ser utilizadas como dosis de refuerzo en adolescentes y adultos previamente inmunizados, de ahí su nombre, sin embargo, está indicado su uso en niños mayores de 7 años que no completaron el esquema primario de vacunación (4, 5, 7, 9, 10, 15-17).

Por otra parte, la necesidad de emplear una dosis reducida de toxoide diftérico está íntimamente relacionada con la propiedad dermonecrótica de la exotoxina producida por el *Corynebacterium diphtheriae*, y el riesgo del incremento de las reacciones adversas (4, 18). La reactogenicidad de las vacunas de toxoide tetánico y toxoide diftérico está relacionada esencialmente con la presencia de hidróxido de aluminio como adyuvante, predominando las reacciones

locales y entre éstas, el dolor (17, 18). Los resultados de este estudio han demostrado que la reactogenicidad de la vacuna evaluada, producida en el Instituto Finlay, es similar a la de IMOVAX dT adult de Aventis Pasteur, tal y como era de esperar por su similar composición, no difiriendo en cuanto a la frecuencia e intensidad de los síntomas y signos, locales y generales, que en ningún caso fueron severos. Los resultados concuerdan con reportes previos para vacunas de este tipo (4, 7, 17, 18).

La evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna experimental con respecto a su control, se facilita teniendo en cuenta la existencia de correlatos de protección bien definidos; de esta forma puede estimarse con seguridad la eficacia serológica (4, 7, 16-19). Niveles de antitoxina mayores de 0,01 UI/mL se han correlacionado con protección, especialmente si son usadas pruebas de neutralización *in vivo* (4, 7). Sin embargo, cuando se emplean técnicas inmunoenzimáticas en fase sólida (ELISA), como las utilizadas, los niveles de antitoxina a partir de 0,1 UI/mL se consideran como umbral de confiabilidad para conferir protección. Cuando estos valores superan 1,0 UI/mL, muchos autores consideran que la protección conferida es de larga duración (3-6, 7, 9, 16-18). Estas técnicas son las de elección para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas de toxoides, debido a su simplicidad, el gran número de muestras que pueden ser procesadas y la elevada precisión y exactitud de sus resultados (4, 7, 19).

Aunque los TMG de antitoxina tetánica y antitoxina diftérica posvacunales fueron superiores en la nueva vacuna producida por el Instituto Finlay, no se observaron diferencias entre ambas vacunas cuando se realiza el análisis por rangos, destacándose el 100% de seroprotección, resultado coherente con lo reportado por otros autores que lo estiman sobre el 95% (4-7, 16-18). Los niveles de antitoxina obtenidos, con predominio de los correspondientes a la protección confiable de larga duración; es decir de al menos 10 años, es un resultado lógico teniendo en cuenta que el Esquema Cubano de Vacunación incluye 5 inmunizaciones previas antes del refuerzo empleado. Nuestros resultados evidencian, además, una apropiada memoria inmunológica.

Es de destacar el elevado número de adolescentes con niveles prevacunales de antitoxina diftérica no adecuados para conferir protección, situación similar a la encontrada en varios estados surgidos de la antigua Unión Soviética y otros países de Europa Oriental. En estos países la difteria resurgió principalmente en los adultos, debido a la declinación de la inmunidad a partir de la adolescencia y la imposibilidad de reforzarla mediante infecciones subclínicas en las condiciones hasta entonces existentes (3-5). Este perfil de inmunidad es similar en nuestro país, ya que además de la susceptibilidad a la difteria observada en este estudio, hemos detectado en otras investigaciones que entre el 29,05% y el 54,17% de los adultos cubanos presentan niveles no protectores de antitoxina diftérica (20, 21). Por ello, deberá introducirse la nueva vacuna dT, producida en el Instituto Finlay, en el Esquema Cubano de Vacunación, en lugar del TT, atendiendo a que se ha demostrado que es poco reactogénica y de elevada inmunogenicidad.

Referencias

1. Greenwood B. Maternal immunisation in developing countries. *Vaccine* 2003;21(24):3436-41.
2. 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.
3. De Zoysa A, Efstratiou A. Eighth international meeting of the European laboratory working group of diphtheria and the diphtheria surveillance network – June 2004: Progress is needed to sustain control of diphtheria in European region. *Eurosurveillance* 2004;9(4):47-50.
4. Galazka AM. The immunological basis for immunization series. Module 2. Diphtheria. Geneva: World Health Organization; 1996.
5. 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.
6. 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.
7. Galazka AM. *The immunological basis for immunization series. Module 3. Tetanus*. Geneva: World Health Organization; 1996.
8. Cuba, Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud 2004. Ciudad de La Habana: MINSAP; 2005.
9. Maple PA, Jones CS, Wall EC, Vyseb A, Edmunds WJ, Andrews NJ et al. Immunity to diphtheria and tetanus in England and Wales. *Vaccine* 2000;19(2-3):167-73.
10. Mink CM. Introduction of tetanus toxoid and reduced diphtheria toxoid vaccines in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25(4):363-4.
11. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *Bull World Health Organ* 2001;79(4):373-4.
12. Ochoa R, Martínez JC, Fajardo EM, Alvarez 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.
13. Martínez Rodríguez JC, Ochoa Azze R, Cruces Perón A, Fajardo EM, Alvarez Figueredo E, Ferriol Marchena X et al. Validation of an ELISA for the quantitation of diphtheria antitoxin in human serum. *Biología Aplicada* 2000;17(3):183-6.
14. Plikaytis BD, Carlone GM, Turner SH, Gheesling LL, Holder PF. *Program ELISA user's manual*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1993.
15. 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.
16. de Melker HE, 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.

17. Broder KR, Cortese MM, Iskander JK, Kretsinger K, Slade BA, Brown KH et al. Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2006;55(RR3):1-34.
18. Lloyd JC, Haber P, Mootrey GT, Braun MM, Rhodes PH, Chen RT. Adverse event reporting rates following tetanus-diphtheria and tetanus toxoid vaccinations: data from the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), 1991-1997. *Vaccine* 2003;21(25-26):3746-50.
19. Ochoa R. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. La Habana: Finlay Ediciones; 2004.
20. Ochoa R. Importancia de la Inmunoepidemiología en la Vacunología. Capítulo 6. En: *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación*. La Habana. Finlay Ediciones; 2005. p.55-64.
21. Ochoa R, Ferriol X, Torres J, Ginebra M, Céspedes A, Izquierdo L et al. Evaluación simultánea de la inmunidad contra enfermedades prevenibles por vacunas. *Saludarte* 2005;4(2):114-28.

Reactogenicity and immunogenicity of a new tetanus toxoid and reduced diphtheria toxoid vaccine in Cuban teenagers

Abstract

A randomized, controlled and double-blind trial was carried out in 225 Cuban teenagers aged 13-16 to evaluate the reactogenicity and immunogenicity of a new tetanus toxoid and reduced diphtheria toxoid vaccine (Finlay Institute) with respect to IMOVAX dT adult control vaccine (Aventis Pasteur). Serum samples were taken before and 21 days after immunization. The reactogenicity of both vaccines was similar. The general and local adverse events were mild and mainly detected in the first 72 hours after vaccination. All volunteers showed protective levels of tetanus antitoxin and diphtheria antitoxin (≥ 0.1 IU/mL). 99.25% of subjects who received the experimental vaccine and 98.36% of control subjects showed long-term protective values of tetanus antitoxin (≥ 1.0 IU/mL). These diphtheria antitoxin levels were respectively detected in 81.20% and 80.33% of volunteers. The geometric mean titer values for tetanus antitoxin and diphtheria antitoxin induced after vaccination were 21.73 IU/mL and 2.55 IU/mL respectively, higher than antitoxin levels of control group: 15.55 IU/mL and 1.84 IU/mL respectively ($p < 0.05$).

Keywords: Tetanus, diphtheria, vaccine, reactogenicity, immunogenicity, clinical trials, antitoxin