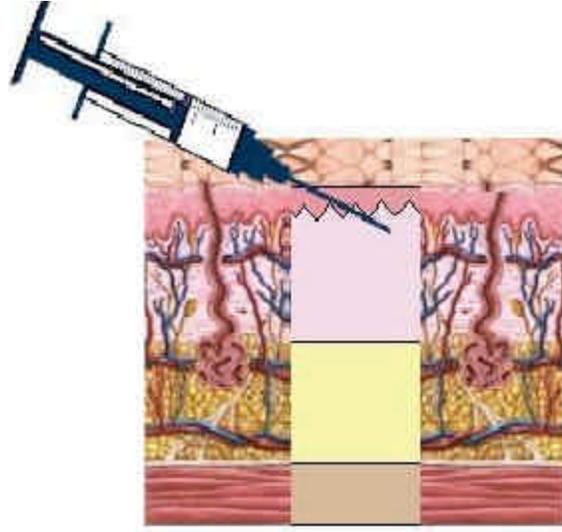


Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"



## **Valoración inmunológica del ensayo clínico Fase II de la primera vacuna combinada cubana Trivac-HB**

**Trabajo para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología**

**Autora: Lic. Daymi Guzmán Hernández**

**Tutores: Dra. Licel de los Angeles Rodríguez Lay, PhD  
Dr. Manuel Díaz González**

**Asesor: Dr. Rafael Llanes Caballero**

**La Habana, 2006**

A mis padres

A todos las personas que trabajaron en este estudio:  
gracias por su cuerpo, gracias por su alma.

## RESUMEN

Se evaluó la inmunogenicidad de la vacuna combinada cubana contra la difteria, el tétanos, la tos ferina y la hepatitis B (Trivac-HB) en lactantes sanos. Un grupo de 655 lactantes recibió la vacuna Trivac-HB y 607, la vacunación simultánea con DPT y Heberbiovac-HB, en el esquema 2, 4, 6 meses. Un mes después de la tercera dosis, se les tomó una muestra de sangre para determinar los niveles de antitoxina tetánica y diftérica, anticuerpos anti-tos ferina y anti-antígeno de superficie del virus Hepatitis B (anti-HBs). El 99.8 % de los niños estaban seroprotegidos con antitoxina tetánica y diftérica; el 81.8 % con anticuerpos anti-tos ferina y 86.3 % con anticuerpos anti-HBs. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los TPG de antitoxina tetánica, los anticuerpos anti-tos ferina y anti-HBs entre la vacuna combinada Trivac-HB y la vacuna simultánea. El 13.8 % de los lactantes no tuvo respuesta de anticuerpos anti-HBs con Trivac-HB y esto pudiera deberse al fenómeno de interferencia inmunológica. A los 18 meses se aplicó una dosis de reactivación con Heberbiovac-HB a todos los niños que habían recibido Trivac-HB en la serie primaria de vacunación, lográndose elevar los niveles de seroprotección anti-HBs a 97.2 % y el porcentaje de hiperrespondedores a 91.2 %. Esta reactivación completó el esquema de dosis necesarias para que Trivac-HB fuera una vacuna inmunogénica. Nuestros resultados permitieron considerar a Trivac-HB una vacuna adecuada para ser incorporada al Programa Nacional de Inmunizaciones.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>INFORMACIÓN PREVIA</b> .....	<b>6</b>
1 <i>CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE</i> .....	6
1.1    Enfermedad .....	6
1.2    Toxina .....	6
1.2.1    Propiedades de la toxina .....	6
1.3    Toxoide .....	7
1.4    Inmunidad.....	7
1.5    Prevención.....	7
1.6    Epidemiología.....	8
2 <i>CLOSTRIDIUM TETANI</i> .....	8
2.1    Enfermedad .....	8
2.2    Toxina tetánica .....	9
2.2.1    Propiedades de la toxina .....	9
2.3    Toxoide .....	9
2.4    Inmunidad.....	10
2.5    Prevención.....	10
2.6    Epidemiología.....	10
3 <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> .....	11
3.1    Enfermedad .....	11
3.2    Estructura antigénica .....	11
3.2.1    Toxina Pertussis (TP).....	11
3.2.2    Aglutinógenos (AGG).....	12
3.2.3    Hemaglutininas .....	12
3.2.4    Adenilatociclasa (AC).....	12
3.2.5    Toxina termolábil (HLT) o Toxina dermonecrótica .....	13
3.2.6    LPS (toxina termoestable) .....	13
3.2.7    Citoxina Traqueal (TCT).....	13
3.2.8    Pertactina.....	13
3.3    Inmunidad.....	14
3.3.1    Inmunidad humoral .....	14
3.3.2    Inmunidad celular .....	14
3.4    Prevención.....	14
3.4.1    Vacunas de células completas.....	15
3.4.2    Vacunas acelulares.....	15
3.5    Epidemiología.....	16
4    VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB) .....	16
4.1    Enfermedad .....	17
4.2    Antígeno de superficie (HBsAg) .....	17
4.3    Inmunidad.....	17
4.4    Prevención.....	18
4.4.1    Vacunas plasmáticas .....	18
4.4.2    Vacunas recombinantes .....	18
4.5    Epidemiología.....	19
5    INMUNIDAD DE LAS VACUNAS EN LA INFANCIA .....	19
6    VACUNAS COMBINADAS .....	20
6.1    Ventajas y desventajas.....	20
6.2    Inmunidad de las vacunas combinadas.....	21
6.3    Actualidad de las vacunas combinadas .....	21
7    ENSAYOS CLÍNICOS .....	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
1    TIPO DE ESTUDIO .....	23
2    CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL ESTUDIO.....	23

3	MUESTRA.....	23
3.1	Muestra de la serie primaria de vacunación.....	23
3.2	Muestra de la reactivación.....	24
4	GRUPO DE VACUNA.....	24
4.1	Grupo de la serie primaria de vacunación.....	24
4.2	Grupo de la reactivación.....	24
5	VACUNAS UTILIZADAS.....	24
5.1	Vacunas de la serie primaria de vacunación.....	24
5.2	Vacuna de la reactivación.....	25
6	EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD.....	25
6.1	Evaluación de la inmunogenicidad de la serie primaria.....	25
6.2	Evaluación de la inmunogenicidad de la reactivación.....	25
7	CRITERIOS DE SEROPROT ECCIÓN.....	27
8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>46</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>54</b>

## INTRODUCCIÓN

El diseño de vacunas combinadas ha sido la respuesta de los científicos ante la creciente complejidad de los esquemas de inmunización infantiles. Varias ventajas avalan su uso, entre ellas: el ahorro de las visitas médicas y la disminución del número de inyecciones necesarias para alcanzar una protección eficaz contra varias enfermedades en la infancia (Moraga y Campins, 2004).

Cada nueva combinación debe ser cuidadosamente evaluada en ensayos clínicos para asegurar que la seguridad y la inmunogenicidad de sus componentes individuales no ha sido afectada por las interacciones entre los antígenos, los adyuvantes y los preservativos (Ellis, 1999). La comparación de la inmunogenicidad de una nueva vacuna combinada con sus componentes separados es la vía principal para lograr este propósito (Falk *et al.*, 2000).

El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el Instituto Finlay de Vacunas y Sueros han elaborado un nuevo producto: la vacuna Trivac-HB, la primera formulación combinada cubana, donde se han mezclado cuatro antígenos: el antígeno de superficie del virus de Hepatitis B (HBsAg), obtenido por tecnología de ADN recombinante, los toxoides tetánico y diftérico y células completas de *B. pertussis*. Su inocuidad e inmunogenicidad ya ha sido evaluada en los ensayos pre-clínicos (comunicación personal del Dr. N. Expósito, CIGB, 3 de septiembre de 2004).

La seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna cubana contra la hepatitis B (Heberbiovac-HB), recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha sido demostrada en lactantes, niños y adultos en pruebas clínicas. La aplicación masiva de millones de dosis en nuestro país y en el exterior así lo ha demostrado (Díaz *et al.*, 1995; Akram *et al.*, 2005).

Para el licenciamiento de una vacuna nueva es necesario asegurarse que la nueva formulación es segura e inmunogénica. El uso de muestras grandes aleatoriamente seleccionadas y bien controladas son necesarias para el éxito del ensayo y la confiabilidad de los resultados, porque permiten evaluar si el efecto observado es resultado del tratamiento o simplemente, consecuencia del azar (Wittes, 2002).

Resulta muy importante determinar si la combinación del HBsAg, con los toxoides diftérico y tetánico y células completas de *B. pertussis* obtenidos separadamente, da lugar a una vacuna combinada eficaz. El presente estudio se dedicará a la evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna tetravalente Trivac-HB en una muestra grande de lactantes. Los niveles de seroprotección de esta nueva vacuna y los niveles de títulos de anticuerpos que se alcanzan son los aspectos fundamentales a analizar.

De lograrse resultados satisfactorios tanto de seguridad como de inmunogenicidad, con la vacuna combinada cubana contra la hepatitis B, la difteria, el tétanos y la tos ferina, se inmunizaría contra cuatro enfermedades en una sola consulta, permitiendo mejorar las coberturas vacunales. Los países en vías de desarrollo, donde los niños disponen de un número muy limitado de oportunidades para ser vacunados, podrían constituir un mercado para este nuevo producto de la ciencia cubana.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Evaluar la respuesta de antitoxina tetánica, antitoxina diftérica, anticuerpos anti-tosferina y anti-antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs) de la primera vacuna tetravalente cubana Trivac-HB.

### **Objetivos específicos:**

1. Comparar los niveles de seroprotección y los títulos promedios obtenidos con Trivac-HB y con la vacunación simultánea de DPT y Heberbiovac-HB.
2. Comparar la calidad de la respuesta de anticuerpos anti-HBs obtenidos con cada vacuna.
3. Analizar los niveles de seroprotección y los títulos promedios obtenidos por vacuna, entre los sexos.
4. Describir el nivel de seroprotección, el título promedio y la calidad de la respuesta de anticuerpos anti-HBs de la reactivación con Heberbiovac-HB.

## INFORMACIÓN PREVIA

### 1 *Corynebacterium diphtheriae*

Agente causal de la difteria y único patógeno humano importante dentro del grupo de las corinebacterias (Willett, 1994).

#### 1.1 Enfermedad

La difteria es una enfermedad aguda. El período de incubación es de 2 a 5 días, mientras más corto sea este período, más grave es el pronóstico de la enfermedad. Su etiología bacteriana se estableció en 1888. La lesión primaria se ubica en el tracto respiratorio superior (boca o nasofaringe) y se caracteriza por un crecimiento pseudomembranoso grisáceo diseminado. A medida que los microorganismos se multiplican en este sitio, elaboran la potente exotoxina, la cual es transportada hacia tejidos distantes y ocasiona severos daños hemorrágicos y necróticos en diferentes órganos, pudiendo dar complicaciones tardías cardíacas o de los nervios periféricos. Solo las cepas productoras de toxina son responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad severa o fatal (Soriano y Fernández, 2000b).

#### 1.2 Toxina

Es el principal determinante de patogenicidad y explica casi todos los efectos patológicos sistémicos. Las cepas de *C. diphtheriae* infectadas con un bacteriófago transportador del gen estructural para la producción de la toxina son las únicas que la producen (Willett, 1994).

##### 1.2.1 Propiedades de la toxina

La molécula con actividad biológica está formada por dos cadenas polipeptídicas con funciones diferentes, los fragmentos A y B, unidos por un puente disulfuro. Ambos fragmentos son esenciales para la citotoxicidad. El fragmento A de 21 KD, constituye la porción amino-terminal de la toxina y contiene el sitio enzimático activo de la toxina. El fragmento B, de 37 KD, forma el extremo carboxi-terminal, contiene el dominio de unión a receptores de células eucariotas, así como también dos dominios de asociación lipídica, los cuales aparentemente son esenciales para la

translocación del fragmento A, a través de la membrana hacia el citosol de la célula eucariota (Willett, 1994).

### **1.3 Toxoide**

Cuando se adicionan bajas concentraciones de formaldehído a la toxina diftérica se destruye su toxicidad y se convierte en toxoide (Salgado-Velez, 2001). Este proceso altera la actividad enzimática del fragmento A y las propiedades de unión del fragmento B a las células eucariotas. Estas alteraciones se atribuyen a la modificación química de los residuos esenciales en la toxina. Con la adición de hidróxido de aluminio al toxoide líquido, se obtiene un preparado parcialmente purificado con mayor eficacia antigénica debido al efecto de estimulación local del aluminio. Este nuevo compuesto es más estable y resistente (Willett, 1994).

### **1.4 Inmunidad**

La inmunidad contra la enfermedad clínica depende de la presencia de antitoxina en la sangre, en respuesta a una infección clínica o subclínica o como resultado de la inmunización activa con toxoide. Los anticuerpos presentes en la antitoxina pertenecen a las clases IgG e IgA. En la era prevacunal, cuando era frecuente la circulación de *C.diphtheriae* y la prevalencia de los casos era alta, la inmunidad se adquiría por infección aparente o inaparente. Los niños menores de 6 meses se protegen de forma pasiva por el paso transplacentario de la antitoxina de la madre inmune. La generalización de la inmunización de lactantes y niños en edad preescolar con el toxoide diftérico ha reducido la incidencia de esta enfermedad y ha disminuido la frecuencia de portadores (Galazka, 1993a).

### **1.5 Prevención**

La inmunización activa con el toxoide durante la primera infancia es la clave para la prevención y el control de la difteria clínica. La infección natural no proporciona una inmunidad apropiada contra infecciones posteriores, como consecuencia es preciso iniciar la vacunación activa o completar el esquema primario de vacunación durante el período de convalecencia. Se recomienda usar dosis de refuerzo cada 10 años (Galazka 1993a).

## **1.6 Epidemiología**

El ser humano es el único huésped natural de *C.diphtheriae* y el único reservorio significativo de la infección. La transmisión es directa, a través de gotitas de Pfl?gler infectadas o de lesiones en la piel, en regiones tropicales o en condiciones de hacinamiento. Los portadores asintomáticos y las personas que atraviesan la etapa de incubación de la enfermedad son la fuente principal de infección. La difteria es rara en niños menores de 6 meses (Wharton y Vitek, 2004).

La inmunización activa de los niños en edad preescolar ha disminuido los casos en el mundo en más del 90 %. La difteria presenta distribución mundial, pero actualmente es poco frecuente en EE.UU y Europa occidental. La presencia de la bacteria se asocia con una inadecuada vacunación, siendo más graves en niños entre 2 y 5 años y más de 20 años. En países de la antigua Unión Soviética, donde la cobertura de vacunación ha disminuido, a partir de 1990 se incrementaron los casos alarmantemente, con una mortalidad que osciló entre 2 y 20 % (Soriano y Fernández, 2000b).

Los programas de vacunación masiva han dado como resultado una disminución considerable en la incidencia de la difteria, también ha significado grandes cambios en el estado inmunitario de los diferentes grupos etarios. Los niños tienen un alto nivel de protección contra la difteria, pero este nivel disminuye en la infancia tardía y en la adolescencia y como consecuencia, los adultos son más susceptibles (Galazka, 1993a).

## **2 *Clostridium tetani***

Es el agente causal del tétanos. La naturaleza anaerobia de esta bacteria fue responsable en parte de su descubrimiento y su aislamiento tardío, obtenido por Kitasato en 1889 (Hill y Willet, 1994).

### **2.1 Enfermedad**

El tétanos es una enfermedad infecciosa aguda, potencialmente letal, no contagiosa, de distribución universal. El período de incubación, generalmente oscila desde las pocas horas de producirse la herida hasta los 15 días posteriores, con una media de 7 días. Mientras más corto es este período, mayor es la severidad de

la enfermedad, llegando a la mortalidad cuando se incuba en menos de 3 días (Hill y Willet, 1994).

La forma más temida es el tétanos neonatal y es el resultado del corte del cordón umbilical con instrumentos no estériles o del cuidado inapropiado del muñón umbilical. En el adulto, la enfermedad clásica ocurre como consecuencia de una herida punzante y se caracteriza por severos espasmos musculares y el más típico de ellos es el trismus, en el maxilar inferior. La tasa de mortalidad es bastante elevada, en especial en niños muy pequeños y en personas de edad muy avanzada (Torradora de Reynoso *et al.*, 2000).

## **2.2 Toxina tetánica**

Todos los síntomas del tétanos son atribuibles a una neurotoxina sumamente tóxica: la tetanospasmina, una toxina intracelular liberada por autólisis celular. El gen estructural de la toxina está localizado en un plásmido de 75 KD (Hill y Willet, 1994).

### **2.2.1 Propiedades de la toxina**

Es una proteína termolábil compuesta por 3 dominios A, B y C cada uno con un peso molecular de aproximadamente 50 KD. La toxicidad de la tetanospasmina intacta se asocia con la cadena liviana A. El fragmento B purificado de la cadena pesada forma canales en las membranas lipídicas, mientras que un sitio fijador de gangliósidos se localiza en el dominio del fragmento C. A nivel de sinapsis, la tetanospasmina bloquea la liberación de neurotransmisores inhibidores, mecanismo que desata los espasmos que caracterizan a esta enfermedad (Torradora de Reynoso *et al.*, 2000).

## **2.3 Toxoide**

La producción de toxoide con formaldehído y da lugar a un producto atóxico y más estable que conserva determinantes antigénicos de la toxina que puede dar origen a anticuerpos anti-toxina (Cabrera *et al.*, 1996). Contiene 20 determinantes antigénicos diferentes como mínimo y por lo menos los anticuerpos contra 9 de ellos son capaces de neutralizar su toxicidad (Galazka, 1993c).

## **2.4 Inmunidad**

No hay evidencias que la enfermedad natural confiera inmunidad contra infecciones posteriores. La toxina tetánica es tan tóxica que la cantidad suficiente para causar tétanos clínico es demasiado pequeña para ser inmunogénica. Los episodios recurrentes no son raros, los pacientes que se recuperan deben ser inmunizados activamente con el toxoide para prevenir recurrencia de la infección a partir de esporas del *C. tetani* retenidas en el cuerpo (Casadevall y Pirofski, 1999). La inmunización activa de la madre durante la gestación puede inducir inmunidad pasiva en el feto. Este tipo de inmunización proporciona una corta protección, directamente proporcional a la vida media de los anticuerpos transferidos (Galazka, 1993c).

## **2.5 Prevención**

El tétanos es totalmente prevenible con la inmunización activa o pasiva. La inmunidad pasiva se obtiene por la administración de la antitoxina. La inmunización activa de rutina con toxoide tetánico (TT) debe comenzar a la edad de 1-3 meses, cuando desciende la tasa de anticuerpos maternos protectores. Deben administrarse 3 dosis en intervalos de 3 ó 4 semanas, con una dosis de refuerzo 1 a 4 años más tarde. La inmunidad contra el tétanos puede mantenerse con una sola dosis de refuerzo de toxoide cada 10 años. En el caso de heridas, la prevención se hará de acuerdo al estado inmune del paciente (Galazka, 1993c).

## **2.6 Epidemiología**

*C. tetani* se encuentra en el suelo y forma parte de la flora normal del tracto digestivo de diferentes animales, por esta razón es una enfermedad controlable, pero no erradicable. Algunos climas, suelos y economías agrícolas se asocian con un riesgo más elevado que otros. En poblaciones rurales no inmunizadas, el tétanos tiene tasas más elevadas que en poblaciones urbanas (Hill y Willet, 1994).

El tétanos neonatal es una causa importante de morbilidad y mortalidad infantil en los países en vías de desarrollo por la falta de cobertura con la vacunación durante el embarazo. En los países con un alto nivel de vida el tétanos se ha convertido en una enfermedad de incidencia creciente entre las personas de edad avanzada por la falta de reactivación del toxoide tetánico y la inmunodepresión propia de la

edad. Desde hace poco la adición a la heroína se ha asociado con un mayor número de casos en los grandes centros urbanos (Brett *et al.*, 2005).

### **3 *Bordetella pertussis***

Agente causal de la tos ferina, fue aislado en 1909, por Bordet y Gengou. El ser humano es el único huésped natural de *B. pertussis* (Wilfert, 1994).

#### **3.1 Enfermedad**

La tos ferina es resultado de la colonización bacteriana del tracto respiratorio y la posterior circulación sistémica de la toxina de la bacteria. Los síntomas comienzan generalmente dentro de los 10 días después de la infección bacteriana. Para estudiar la enfermedad clínica, esta ha sido dividida en 3 etapas:

La etapa catarral o prodrómica dura entre 1 y 2 semanas. En este período el niño presenta solo síntomas leves de una enfermedad del tracto respiratorio superior no complicada. La segunda etapa dura entre 1 y 6 semanas y se caracteriza por la progresión hacia la tos paroxística. Un paroxismo característico consta de 5 a 20 accesos de tos seca forzada que se producen entre 15 a 20 segundos y a menudo terminan con producción de moco o vómitos asociados. La tercera etapa, entre 3 a 4 semanas, es la convalecencia. La tos puede persistir varios meses después del comienzo de la enfermedad. La morbilidad y la mortalidad asociados con la tos ferina están dados por el compromiso del sistema nervioso central, donde generalmente se afectan oídos, tracto respiratorio inferior y es más frecuente en lactantes no vacunados (Wilfert, 1994).

#### **3.2 Estructura antigénica**

*B. pertussis* es una bacteria patógena con propiedades únicas. Sus principales antígenos son: la toxina pertussis, los aglutinógenos, las hemaglutininas, la adenilatociclasa, la toxina termolábil, el lipopolisacárido, la citoxina traqueal y la pertactina (Smith *et al.*, 2001).

##### **3.2.1 Toxina Pertussis (TP)**

Miembro de la superfamilia de las toxinas A-B bacterianas. Causa una variedad de efectos en el hospedero: es un factor histamino-sensibilizante, factor promotor de la linfocitosis, y proteína activadora de islotes y también tiene propiedades

adyuvantes. Cumple dos roles principales en la infección, facilita la unión de la bacteria a las células ciliadas respiratorias y tiene un papel importante en la citotoxicidad celular. Es un potente inmunógeno. Los anticuerpos anti-PT están asociados con la inmunidad clínica a la tos ferina. En el laboratorio, estos anticuerpos protegen a los ratones en el reto intracerebral con la bacteria (Galazka, 1993b; Smith *et al.*, 2001).

### 3.2.2 Aglutinógenos (AGG)

Son antígenos de superficie, han sido divididos en factores, del 1-6, solo están en *B. pertussis*. El factor 1 es antigénico en todas las cepas de *B. pertussis* y es probablemente, el antígeno de aglutinación (aglutinógeno) del microorganismo. El aglutinógeno aislado no es tóxico pero no protege a los animales contra la infección. Las aglutininas o los anticuerpos contra el aglutinógeno proporcionan una respuesta medible en personas inmunizadas con vacunas de células completas o con algunas vacunas acelulares y en los que padecen infección natural. Estos anticuerpos no son completamente protectores por sí mismos (Galazka, 1993b).

### 3.2.3 Hemaglutininas

*B. pertussis* posee 2 hemaglutininas que median la adherencia de estas bacterias a los cilios respiratorios de mamíferos. La FHA (siglas en inglés de *filamentous haemagglutinin*) es una adhesina dominante para la adherencia a células epiteliales ciliadas respiratorias. Funciona como superficie de unión a macrófagos. El anticuerpo contra la FHA protege a los ratones en el reto con aerosol letal con *B. pertussis*. La segunda hemaglutinina, la toxina pertussis-hemaglutinina (TP-HA). No tiene papel reconocido en la enfermedad clínica. Es importante en la adherencia de la toxina pertussis a las células. Se ha observado que los anticuerpos contra la toxina disminuyen la colonización de la bacteria (Smith *et al.*, 2001).

### 3.2.4 Adenilatociclase (AC)

La toxina AC es una hemolisina que produce poros en la membrana de los eritrocitos. In vitro, la AC puede alterar la quimiotaxis e inhibir el estallido oxidativo de los polimorfonucleares. Su papel en la enfermedad no está definido con claridad.

Se conoce que tiene efectos adyuvantes cuando se coinyecta con otros antígenos (Ross *et al.*, 2004).

### 3.2.5 Toxina termolábil (HLT) o Toxina dermonecrótica

Esta toxina se destruye cuando se calienta a 56<sup>0</sup> C, durante 15 min. Causa lesiones necróticas en la piel de ratones cuando se inyecta subcutáneamente. Esta inyección es letal cuando se administra por vía intravenosa o intraperitoneal. No se conoce si la HLT (siglas en inglés de *heat labile protein*) estimula la producción de anticuerpos en humanos y se desconoce su papel en la patogenia de la enfermedad (Smith *et al.*, 2001).

### 3.2.6 LPS (toxina termoestable)

Básicamente es similar a las endotoxinas de las Enterobacteriaceae, pero se diferencia por la ausencia de antígeno O, la estructura macromolecular y una menor actividad pirógenica. Realmente es un lipo-oligosacárido, por su menor tamaño. Esta toxina no induce la formación de anticuerpos con actividad protectora. Los anticuerpos anti-LPS en presencia de complemento determinan la actividad bactericida del suero frente a *B. pertussis*. Sin embargo, la actividad bactericida no se correlaciona con protección en el desafío intracerebral de ratones con *B. pertussis* ni con la protección de niños vacunados contra la enfermedad (Smith *et al.*, 2001).

### 3.2.7 Citoxina Traqueal (TCT)

La TCT es un derivado disacárido-tetrapéptido de la capa de peptidoglicano de la pared celular. Este componente tóxico destruye las células epiteliales de los cilios e inhibe la diferenciación de las células no ciliadas, lo cual posiblemente obstaculice la reparación de la mucosa (Smith *et al.*, 2001).

### 3.2.8 Pertactina

Es una proteína de 60 kD. El mecanismo a través del cual la pertactina participa en la adherencia a las células eucarióticas se desconoce y no se ha encontrado ningún receptor. Es un antígeno inmunoprotector. Se pueden detectar anticuerpos cuantificables en pacientes convalecientes de la enfermedad y en los vacunados con la vacuna de células completas. Aunque su rol en la inmunoprotección es

desconocida, su inclusión en vacunas acelulares ha dado resultados prometedores de eficacia (King *et al.*, 2001).

### **3.3 Inmunidad**

Se conoce que la respuesta humoral y celular son necesarias para la protección contra esta enfermedad (Cherry *et al.*, 1998; Ausiello *et al.*, 2000).

#### **3.3.1 Inmunidad humoral**

La enfermedad no brinda una inmunidad permanente. Se ha comprobado que se desarrollan anticuerpos locales anti-FHA tras la infección natural en niños. Los recién nacidos adquieren anticuerpos pasivamente de sus madres a través de la placenta. Se ha detectado IgG anti-FHA, anti-PT, anti-AGG 2 y anti-AGG 3 en suero del cordón umbilical o en suero de niños saludables antes de la primera inmunización con DPT. La prevalencia de anticuerpos a la tos ferina en los diferentes grupos etarios de la población depende del estado de inmunización anti-tos ferina en la infancia y de la exposición a las cepas circulantes de *B. pertussis* (Cherry *et al.*, 1998).

#### **3.3.2 Inmunidad celular**

*B. pertussis* se considera un patógeno intracelular facultativo y por esta razón se asume que la inmunidad celular puede jugar un papel importante en la eliminación de la infección del interior de los fagocitos, mecanismo que aún no se conoce con claridad. Sin embargo, se conoce que en los macrófagos, el óxido nítrico y sus intermediarios (nitrito y peroxinitrito) son mediadores potenciales importantes en la protección contra la enfermedad. Las células T producen diversas citoquinas que ejercen una influencia reguladora en la naturaleza de anticuerpos (isotipo) y sobre la actividad de macrófagos y de las células polimorfonucleares (Ausiello *et al.*, 2000).

### **3.4 Prevención**

Además del aislamiento de casos y la terapia antibiótica, existen 2 tipos de vacunas: la vacuna de células completas y su homóloga, la vacuna acelular. Se piensa que la vacunación proporciona una protección contra las manifestaciones de la enfermedad más que contra la infección misma (Soriano y Fernández, 2000a).

No se conoce cuanto dura la inmunidad a la tos ferina obtenida a través de la vacunación o por la infección natural. (Galazka, 1993b). Los datos de los sujetos inmunocompetentes, indican que ni la inmunización de la infancia ni la infección proporciona una inmunidad de larga duración contra *B. pertussis*, razón por la cual los niños mayores y los adultos son los mayores reservorios de la infección. (Plotkin, 1999; Esposito *et al.*, 2001)

#### **3.4.1 Vacunas de células completas**

Estas vacunas dan como resultado un incremento de títulos de anticuerpos por ELISA a todos los antígenos de *B. pertussis*. Los niños vacunados muestran un incremento de niveles de anticuerpos contra FHA, TP, aglutininas, LPS y proteínas de membrana externa. La respuesta a esta vacuna es proporcional al número de dosis administradas. Su eficacia se ha evaluado en los contactos intrafamiliares y oscila entre 36-95 %, dependiendo de la definición de caso usada (Galazka, 1993b).

La vacunación ha resultado exitosa en la prevención de la enfermedad y el amplio uso de la vacuna se ha asociado con la disminución de casos informados entre un 95-98 % de tos ferina en países donde la vacunación es obligatoria. Sin embargo, no interrumpe la transmisión de la bacteria (Cherry, 1996).

Todas las vacunas de células completas contienen endotoxinas y otras toxinas activas, las cuales son las responsables de reacciones locales y sistémicas. La encefalopatía causada por la vacuna es un mito, lo cual ya ha sido demostrado (Holder y Mortimer, 1992; Cowan *et al.*, 1993). Las vacunas celulares de *B. pertussis* brindan un poderoso efecto adyuvante (Dagan *et al.*, 1997; Dokmetjian *et al.*, 1998, Salmaso *et al.*, 1998).

#### **3.4.2 Vacunas acelulares**

La preocupación por la reactogenicidad de las vacunas celulares y el estudio de los roles de TP, FHA y AGG en la patogénesis y la inmunidad de la tos ferina motivaron el interés por el desarrollo de nuevas vacunas. Una de sus ventajas fundamentales, es la eliminación de los componentes tóxicos, especialmente el LPS, responsable de las reacciones sistémicas de las vacunas de células completas (Capiou *et al.*, 2003).

En general, la respuesta anti-TP en la inmunización primaria y de refuerzo es igual o mejor con vacunas acelulares, también la respuesta anti-FHA es significativamente más alta. Sin embargo algunas vacunas acelulares carecen de respuesta anti-AGG (Cassone *et al*, 1997). Las respuestas al toxoide diftérico y tetánico son similares en los niños que reciben cualquier tipo de vacuna. Esto indica que las vacunas acelulares también tienen propiedades adyuvantes. Sin embargo el principal impedimento para el amplio uso de estas vacunas es su precio elevado (Pertussis vaccines, 1999).

### **3.5 Epidemiología**

La tos ferina es una enfermedad endémica con picos epidémicos cada 2-5 años. La reducción de la incidencia resultante de la vacunación universal no ha alterado este intervalo. No tiene un comportamiento estacionario. La vía de transmisión es el contacto respiratorio muy cercano. Es una enfermedad altamente contagiosa con una tasa de ataque de un 90 % en contactos familiares. Esta enfermedad puede afectar a cualquier edad. Los lactantes, constituyen el grupo etario en el cual se producen las mayores complicaciones y la tasa de mortalidad es más alta (Edwards y Decker, 2004).

En los países donde hay control por vacunación y en aquellas donde la tos ferina es epidémica, la enfermedad endémica ocurre en adultos, siendo la responsable de los ciclos de enfermedad observados en los niños no vacunados (Cherry, 1998). Por esta razón se ha sugerido la necesidad de reactivación en adolescentes y adultos. En los países subdesarrollados, el principal problema es la tasa de abandono entre la primera y la tercera dosis de la vacuna, quedando los niños sin protección en el periodo vulnerable de los primeros 6 meses de vida (Cherry, 1999; Van der Wielen *et al.*, 2003).

## **4 Virus de la hepatitis B (VHB)**

El VHB es el virus prototipo de la familia Hepadnaviridae donde se agrupan varios virus de ADN hepatotrópicos. Es un virus de doble cubierta. Su principal hospedero es el hombre. Este virus fue identificado como agente causal de la hepatitis sérica en 1968 por B. Blumberg (Hamilton, 1994).

#### **4.1 Enfermedad**

Luego de un periodo de incubación prolongado, hasta seis meses, la infección con este virus puede dar manifestaciones clínicas de grado variable. En las formas ligeras, los síntomas simulan un catarro banal. El cuadro típico de hepatitis se caracteriza por astenia, ictericia, vómitos y dolor en el hipocondrio derecho. En muchos casos, la infección cursa de modo subclínico y asintomático y el individuo es detectado durante estudios serológicos de rutina. En algunos pacientes, la infección puede seguir un desenlace fulminante y muchas veces fatal, con muerte por daño hepático severo. La infección en el feto o lactante tiene mayor riesgo de evolucionar hacia portador asintomático y formas crónicas de infección (Muzio y Pentón, 1998).

#### **4.2 Antígeno de superficie (HBsAg)**

El HBsAg (siglas en inglés del antígeno de superficie del VHB) es la proteína principal de la envoltura viral. Su naturaleza es lipoproteica y generalmente se asocia a lípidos de las células hospederas. Constituye el marcador serológico más importante de la infección con el VHB. La detección del HBsAg en el suero del individuo infectado, se utiliza para el diagnóstico de la infección por el VHB (Muzio y Pentón, 1998).

El desarrollo de anticuerpos anti-antígeno de superficie (anti-HBs) indica recuperación clínica e inmunidad contra la hepatitis. Estos anticuerpos neutralizan al VHB. La respuesta protectora anti-HBs está dirigida contra el determinante *a* común para todos los subtipos de VHB, por esta razón hay protección cruzada frente a la reinfección por cepas que expresen determinantes de subtipo distinto a los de la cepa inductora (Shokrgozar y Shokri, 2002; Mast *et al.*, 2004).

#### **4.3 Inmunidad**

La respuesta de anticuerpos contra las proteínas de superficie del VHB es un proceso T-dependiente. Esta respuesta está compuesta por células T cooperadoras y citotóxicas y es vigorosa y policlonal durante la hepatitis B aguda localizada. En los portadores crónicos, incapaces de eliminar el virus, la respuesta es débil e indetectable. Los anticuerpos anti-HBs son neutralizantes, inhiben la unión del virus

y su entrada a las células, de aquí su importancia en la prevención de la infección viral (Jung y Rape, 2002).

#### **4.4 Prevención**

La inmunización pasiva se realiza a través de la administración de la gamma globulina hiperinmune a hepatitis B, la cual posee títulos elevados de anti-HBs.

El HBsAg constituye el componente antigénico fundamental de las vacunas anti-hepatitis B disponibles actualmente. La vacunación universal anti-hepatitis B y su inclusión en el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI), ha sido la estrategia que mayor impacto ha logrado en el control de la enfermedad, ya que la vacunación exclusiva a los grupos de riesgo no tuvo el resultado esperado (Gilks *et al.*, 1990).

##### **4.4.1 Vacunas plasmáticas**

El primer enfoque en la elaboración de vacunas fue la obtención de partículas de HBsAg a partir del plasma de portadores asintomáticos, negativos al HBeAg (siglas en inglés del antígeno e del VHB). Las vacunas plasmáticas no fueron tan utilizadas como se esperaba. Las causas principales fueron: la complejidad y la duración de los procedimientos de obtención; la necesidad de prolongadas y costosas pruebas de inocuidad para liberar los lotes de vacunas; la limitada capacidad de producción por la falta de disponibilidad de donantes de plasma adecuados y el temor al riesgo de contraer una infección con el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y otros patógenos transmitidos por vía sanguínea (Muzio y Pentón, 1998).

##### **4.4.2 Vacunas recombinantes**

El HBsAg fue expresado eficientemente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y en 1986 se aprobó la primera vacuna recombinante para su uso en humanos. El HBsAg obtenido por esta vía posee características similares al natural, derivado del plasma. La vacuna ha demostrado una seguridad, inmunogenicidad y eficacia ampliamente probadas en animales y humanos (Díaz *et al.*, 1995; Akram *et al.*, 2005).

Otras levaduras como *Pichia pastoris* han sido empleadas para la expresión exitosa del antígeno. El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Cuba, produjo en 1989, una vacuna recombinante (HEBERBIOVAC-HB) altamente

inmunogénica y con una efectividad de un 95% en hijos de madres positivas al HBsAg, usando como vector de expresión esta levadura (Muzio y Pentón, 1998).

Las vacunas recombinantes tienen la ventaja de un bajo costo, mejor tolerancia, estabilidad, posible uso con otros inmunógenos y alto poder inmunogénico. La vacunación masiva en niños tiene varias ventajas: la protección en edades tempranas donde la posibilidad de convertirse en portador crónico es mayor; poca reactogenicidad, mayor inmunorespuesta, y posibilidad de ser utilizada en combinación con otras vacunas (Díaz *et al.*, 1997).

#### **4.5 Epidemiología**

El VHB tiene una distribución mundial, existen zonas de alta, intermedia y baja prevalencia de la infección de acuerdo a la positividad al HBsAg (> de 8%, alta; de 2-7 %, intermedia y < de 2 %, baja). Las vías de transmisión de esta infección son: la perinatal, parenteral, percutánea y sexual. Entre un 80-90% de las personas infectadas al nacimiento desarrollan infección crónica, esta proporción disminuye a medida que aumenta la edad (25-50 % en los infectados entre 1-5 años y de un 5-10 % en los mayores de 10 años) (Hamilton, 1994).

La infección con el VHB no muestra tendencia estacional ni predilección por ningún grupo etario, aunque hay grupos definidos de mayor riesgo como adictos a drogas parenterales, personas con retraso mental recluidas en instituciones, personal de atención a la salud, pacientes sometidos a múltiples transfusiones sanguíneas, pacientes con transplante de órganos, pacientes de hemodiálisis, personas muy promiscuas y lactantes recién nacidos de madres portadoras del HBsAg (Muzio y Pentón, 1998).

#### **5 Inmunidad de las vacunas en la infancia**

La inmunización en la etapa de la lactancia funciona como un potente estimulador del sistema inmunológico a quien prepara para respuestas posteriores (Kane, 1994). Casi todas las vacunas de la infancia, necesitan de varias dosis para brindar la esperada protección. Los intervalos largos (de al menos 2 meses) entre las dosis son importantes si se tiene en cuenta la maduración gradual de la afinidad de las células B antígeno-específicas (Siegrist, 2001).

En los primeros años de la vida predomina una respuesta de anticuerpos IgM. Cuando se trata de repetidas dosis de vacunas, hay producción de anticuerpos IgG, sobre todo IgG1 y IgG3. Algunos antígenos vacunales y algunos adyuvantes son capaces de activar células B neonatales y disparar su diferenciación en células B de memoria, este es un mecanismo esencial en el papel preventivo de las vacunas en la infancia temprana (Kovarik y Siegrist, 1998b).

## **6 Vacunas combinadas**

### **6.1 Ventajas y desventajas**

Las vacunas que contienen antígenos pertenecientes a dos o más microorganismos o aquellas que contienen antígenos de dos o más serogrupos o serotipos de un mismo microorganismo se denominan vacunas combinadas. La combinación de los toxoides diftéricos, tetánicos y de la fracción de células completas de *B.pertussis* inactivadas (DTP), constituye la vacuna combinada bacteriana más antigua y fue licenciada en el año 1949 (Moraga y Campins, 2004).

Las principales ventajas de estas vacunas son: la prevención de un mayor número de enfermedades; aumento de la cobertura vacunal; rápido cumplimiento del calendario; una mayor aceptación por parte del público al disminuir el número de pinchazos; una mayor comodidad de uso (simplificación del transporte y del almacenamiento y disminución de la cantidad de visitas) y que facilitan la armonización de los calendarios y la introducción de nuevas vacunas (Moraga y Campins, 2004).

Los posibles inconvenientes de las vacunas combinadas son la interferencia inmunológica entre algunos de sus componentes que puede producir disminución de la respuesta inmunológica, lo cual no equivale siempre a una menor eficacia vacunal; la complejidad de la valoración de la reactogenicidad, ya que las reacciones adversas son más difíciles de atribuir a cada uno de sus componentes; la variabilidad del contenido de los diversos lotes debido a su múltiple composición; y el mayor costo directo de la vacuna combinada comparado con los antígenos independientes que contiene, aunque el costo indirecto disminuye al requerir un menor número de visitas, de personal y gasto en concepto de material y de almacenamiento (Decker *et al.*, 2004).

En 1988, el PDVI (siglas en inglés de Grupo de Iniciativa para el Desarrollo de la Vacuna de la Infancia) proporcionó el apoyo para el desarrollo de una vacuna combinada DTP-HB, teniendo en cuenta que la vacunación primaria contra la hepatitis B podría ser compatible con los esquemas de DTP recomendados por la OMS. La Unión Europea licenció esta vacuna en el año 1996, después de múltiples ensayos clínicos (André, 1999).

## **6.2 Inmunidad de las vacunas combinadas**

Tradicionalmente, la respuesta inmunológica de las vacunas combinadas se ha medido por la respuesta humoral a sus antígenos independientes. Para algunos antígenos, los estudios de eficacia e inmunogenicidad de vacunas han identificado correlación entre el nivel de anticuerpos post-vacunales y la protección contra la enfermedad (Decker *et al.*, 2004).

Para el toxoide tetánico se considera que un nivel individual de anticuerpos post-vacunales predice directamente el estado de protección, si los anticuerpos están por debajo de este nivel, la persona está en riesgo de contraer la enfermedad. Para el toxoide diftérico, se ha observado que un individuo con determinado nivel de anticuerpos no está necesariamente protegido, sin embargo se ha visto una correlación directa entre cierto nivel medio de anticuerpos en la población y la protección frente a brotes de la enfermedad. Para algunos antígenos como el HBsAg, está identificado el nivel individual de anticuerpos protectores post-vacunales. Cuando estos niveles caen en el tiempo, la respuesta de memoria puede asegurar la protección contra la enfermedad clínica aun cuando los niveles de anticuerpos pre-exposición sean bajos o indetectables. Los antígenos de *B. pertussis*, para los cuales todavía no está definida la correlación entre el nivel de anticuerpos post-vacunación y la protección; se han buscado otros análisis, como la determinación de la inmunidad celular después de la vacunación (Capiou, 2003).

## **6.3 Actualidad de las vacunas combinadas**

El aumento creciente del número de vacunas en los calendarios de inmunizaciones sistemáticas ha hecho progresar la investigación y el desarrollo de las vacunas combinadas. Especialmente la vacuna DTP, ha ofrecido las mejores perspectivas como componente esencial de las nuevas combinaciones. A partir de esta vacuna

triple bacteriana, en su forma con células enteras de *B. pertussis* o de pared completa (DTPe) o con los componentes acelulares de *B. pertussis* (DTPa), se han desarrollado formulaciones combinadas tetravalentes, pentavalentes y hexavalentes (Moraga y Campins, 2004).

Existen combinaciones de DTP con el HBsAg y/o el virus de poliomelitis y/o *Haemophilus influenzae b* (Hib). No hay muchas firmas farmacéuticas productoras de vacunas combinadas. Las combinaciones disponibles internacionalmente y ampliamente usadas son aquellas de Aventis Pasteur y GlaxoSmithKline (GSK) (Decker *et al.*, 2004).

## **7 Ensayos clínicos**

Los ensayos clínicos aleatorizados se exigen para lograr el licenciamiento de las vacunas combinadas. La aleatorización brinda varias ventajas: evita el sesgo consciente e inconsciente y proporciona una base para las pruebas estadísticas de significación. Una práctica común es utilizar un tamaño muestral suficientemente grande. Mientras más variable sea la respuesta, mayor deberá ser el tamaño muestral para evaluar que el efecto observado, representa un efecto verdadero del tratamiento o simplemente, es el resultado del azar (Wittes, 2002).

Los ensayos clínicos aleatorizados se clasifican en fases. La fase I tiene objetivo principal investigar la dosis y la vía de administración de una nueva vacuna y determinar su toxicidad. La fase II proporciona datos sobre las reacciones locales y sistémicas, demuestra la ausencia de interferencia inmunológica entre los componentes y brinda datos preliminares sobre la seguridad de las vacunas, evalúa la seguridad y la inmunogenicidad de la nueva formulación. La fase III investiga la eficacia de las vacunas. El término fase IV se usa menos pero se refiere a estudios que evalúan la efectividad de una intervención probada cuando se usa a amplia escala (Midthun *et al.*, 2001).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna Trivac-HB, se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas (LNRNP) y en el Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales (LNRHV), del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) en el periodo comprendido entre los meses de noviembre de 2001 a mayo de 2003. Se siguió el esquema de trabajo representado en el anexo 1.

### **1 Tipo de estudio**

Se realizó la determinación de los títulos de anticuerpos de un ensayo clínico Fase II, simple ciego (el laboratorio no conocía a que grupo pertenecía cada niño) en lactantes sanos. El protocolo de investigación fue sometido a la consideración del Comité de Bioética y Revisión del IPK, quien dio su aprobación para el inicio del ensayo.

### **2 Consideraciones éticas del estudio**

La participación de los lactantes en la investigación, estuvo determinada por la autorización voluntaria de sus padres y/o tutores, hecho expresado a través de la firma del documento de Consentimiento Informado (véase Anexo 2), luego de haberseles explicado verbalmente a través de una entrevista personal, las características del ensayo y del producto a evaluar. Los padres podían retirar a sus hijos de la investigación en cualquier momento sin perjuicio alguno.

### **3 Muestra**

#### **3.1 Muestra de la serie primaria de vacunación**

En el estudio se procesaron 1265 sueros de lactantes sanos, de los cuales 662 eran de la provincia de Cienfuegos y 603, de la provincia de Camagüey, con peso mayor de 2500 g, hijos de madres negativas al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), el tétanos, la difteria o la tos ferina. Quinientos noventa eran niñas y 662 eran niños.

### **3.2 Muestra de la reactivación**

Se seleccionó una muestra de 381 sueros del grupo de lactantes vacunados con Trivac-HB entre las dos provincias.

## **4 Grupo de vacuna**

Los lactantes fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de vacunación, el grupo A (de estudio) y el grupo B (control).

### **4.1 Grupo de la serie primaria de vacunación**

- Grupo A (de estudio): 645 sueros de lactantes a los cuales se les aplicó la vacuna combinada TRIVAC-HB (CIGB-Finlay) en la cara anterolateral del muslo derecho por vía intramuscular; en un esquema de tres dosis a partir del segundo mes de edad, a los cuatro y a los seis meses,
- Grupo B (control): 607 sueros de lactantes a los cuales se les aplicó la vacuna mexicana DPT (BIRMEX) y Heberbiovac-HB (Heber-Biotec), de forma simultánea, pero separada en las regiones anteriores de los muslos, DPT (muslo derecho) y Heberbiovac-HB (muslo izquierdo), por vía intramuscular en un esquema similar al anterior.

### **4.2 Grupo de la reactivación**

A los 18 meses de edad, se aplicó una dosis adicional con la vacuna Heberbiovac-HB, a la totalidad de los niños del grupo A, previo consentimiento de los padres (véase Anexo 3). Se determinaron los nuevos títulos de anticuerpos anti-HBs a una muestra de 381 sueros, que representó el 57.73 % de los lactantes de este grupo.

## **5 Vacunas utilizadas**

### **5.1 Vacunas de la serie primaria de vacunación**

- Grupo A: se le administró la vacuna combinada cubana contra la difteria, tétanos, tos ferina y hepatitis B (DPT/HEBERBIOVAC-HB) Lote DPT-HB/XIII (CIGB-Finlay):
- Grupo B: se le aplicó simultáneamente la vacuna comercial de origen mexicano DPT (BIRMEX) Lote 259-8. También se le aplicó la vacuna cubana Heberbiovac-HB (Heber-Biotec), Lote 9B05610.

## **5.2 Vacuna de la reactivación**

A los niños que recibieron esta dosis de refuerzo se les aplicó la vacuna Heberbiovac-HB (Heber-Biotec), Lote 1C00920.

## **6 Evaluación de la inmunogenicidad**

### **6.1 Evaluación de la inmunogenicidad de la serie primaria**

A los 7 meses de edad, treinta días después de la tercera dosis de la vacuna, se extrajo una muestra de sangre, para determinar los títulos postvacunación de IgG de antitoxina diftérica, antitoxina tetánica y la respuesta humoral a los antígenos hemaglutinina filamentosa y toxina pertussis de *B. pertussis*, a través de un sistema de ELISA directo de la firma alemana NovaTec. El LNRNP realizó estas determinaciones.

El LNRHV llevó a cabo la determinación de los títulos anti-hepatitis B (anti-HBs). Se empleó un sistema de ELISA sandwich de la firma holandesa Organon Teknika.

### **6.2 Evaluación de la inmunogenicidad de la reactivación**

A los 19 meses de edad, treinta días después de una cuarta dosis con la vacuna Heberbiovac-HB, se extrajo una muestra de sangre, para determinar los títulos anti-HBs. Se empleó el mismo sistema de ELISA.

- Determinación de los títulos de antitoxina tetánica (anti-TT):

La cuantificación de los títulos de antitoxina tetánica se realizó a través de un ensayo inmunoenzimático comercial de ELISA directo (NovaTec-Clostridium tetani IgG-ELISA Prod. No. TETG0430) diseñado para la determinación cuantitativa de anticuerpos clase IgG en el suero humano. Los pocillos estaban recubiertos con toxoide tetánico. El primer paso consistió en añadir las muestras de suero diluidas, a continuación se adicionó el conjugado de anticuerpos de conejo anti-IgG humana marcados con la enzima HRP (siglas en inglés de peroxidasa de rábano picante). La reacción positiva produjo una coloración azul que se volvió amarilla cuando se detuvo la reacción con ácido sulfúrico. La titulación de las muestras se realizó a través del cálculo de una curva estándar, construida a partir de una serie de controles aportados por el fabricante, los cuales estaban estandarizados contra el "Primer estándar de inmunoglobulina tetánica humana (CODE TE-3 del Instituto

Nacional para los Estándares Biológicos y para el Control (NIBSC, siglas en inglés), Potters Bar, Reino Unido”.

- Determinación de los títulos de antitoxina diftérica (anti-TD)

La cuantificación de los títulos de antitoxina diftérica se realizó a través de un ensayo inmunoenzimático comercial de ELISA directo (NovaTec-Corynebacterium diphtheriae IgG-ELISA Prod. No. CORG0090) diseñado para la determinación cuantitativa de anticuerpos clase IgG en el suero humano. Los pocillos estaban recubiertos con toxoide diftérico. El primer paso consistió en añadir diluciones de las muestras de suero, a continuación se adicionaron anticuerpos de conejo anti-IgG humana marcados con la enzima HRP. La reacción positiva produjo una coloración azul que se volvió amarilla cuando se detuvo la reacción con ácido sulfúrico. Los controles de ensayo estaban calibrados a partir del estándar para difteria con código 91/534 del NIBSC. A partir de la curva estándar se titularon las muestras.

- Determinación de los títulos de anticuerpos IgG a hemaglutinina filamentosa y toxina pertussis de *B. pertussis* (anti-tos ferina)

La cuantificación de los títulos de anticuerpos contra *B. pertussis* se realizó a través de un ensayo inmunoenzimático comercial ELISA (NovaTec-Bordetella pertussis IgG- ELISA Prod. No. BOPG0030) para la determinación cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos IgG en el suero humano. Los antígenos toxina pertussis y hemaglutinina estaban fijados a la fase sólida. Primeramente, se añadieron las muestras de suero diluidas, luego el conjugado de HRP. La adición del sustrato produjo una reacción de color azul cuando la muestra era positiva. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico. No existe un estándar internacional para calibrar estos ensayos inmuno-enzimáticos. El fabricante suministró un valor de corte de 10 NTU (unidades NovaTec, siglas en inglés). El ensayo tenía 3 criterios de interpretación: positivo, muestras con títulos mayores de 10 NTU; negativo, muestras con títulos menores de 9 NTU y dudoso (zona gris): muestras con valores entre 9 y 11 NTU.

- Determinación de los títulos de anticuerpos anti- HBs

Está basado en el principio del sandwich. Las tiras de poliestireno estaban recubiertas con el antígeno HBsAg (fase sólida). La muestra se incubó en estos pocillos. Si había anticuerpos anti-HBs en la muestra, entonces se unieron al antígeno. A continuación se añadió el HBsAg marcado con la enzima HRP. En caso de reacción positiva, el antígeno marcado se unió al complejo anticuerpo-antígeno que se formó anteriormente. La incubación con sustrato enzimático produjo un color azul en el pocillo de prueba que se volvió amarillo cuando se detuvo la reacción con ácido sulfúrico. Si la muestra no contenía anti-HBs, solo se desarrolló una leve coloración. Los controles del ensayo estaban calibrados frente a la preparación de referencia de la OMS, del Laboratorio Central de Servicios de Transfusiones Sanguíneas de Amsterdam, Holanda.

## **7 Criterios de seroprotección**

- Fracción tetánica (T): Se consideraron seroprotectidos aquellos niños con títulos mayores que 0.1 UI/ml (Galazka, 1993b).
- Fracción diftérica (D): Se consideraron seroprotectidos aquellos niños con títulos mayores o iguales a 0.1 UI/ml (Galazka, 1993a).
- Fracción pertussis (P): Se consideraron seroprotectidos aquellos niños con títulos mayores o iguales 10 NTU (Galazka, 1993c).
- Fracción hepatitis B (HB): Los títulos seroprotectores fueron aquellos mayores o iguales a 10 UI/l. La respuesta se clasificó en no respuesta (<10 UI/L), hipo-respuesta ( $10 \text{ UI/L} \leq \text{anti-HBs} = 99 \text{ UI/L}$ ), normo-respuesta ( $100 = \text{anti-HB} = 999$ ) e hiper-respuesta ( $\geq 1000 \text{ UI/L}$ ) (Kane, 1994).

## **8 Análisis estadístico**

A partir de las determinaciones de título de anticuerpos de los sueros, se calculó el nivel de seroprotección por grupo de vacuna y por sexo. También se calcularon los porcentajes de respuesta de anticuerpos anti-HBs. Se determinó el título promedio aritmético (TPA), el título promedio geométrico (TPG) de los anticuerpos y los

intervalos de confianza (IC) de los títulos de anticuerpos con un 95% de confiabilidad.

El TPA es la media aritmética de los valores de los títulos de anticuerpos.

El TPG es el antilogaritmo de la media de los valores de los títulos de anticuerpos, previamente transformados, con el propósito de reducir la variabilidad de la respuesta y obtener una distribución normal.

El título de anticuerpos fue considerado como una variable cuantitativa y continua. Para comparar las medias utilizamos la prueba de diferencias de medias para grupos independientes y el análisis de varianza. Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico NCSS 2000 y PASS 2000 (Jerry Hintze)

Se calculó la significación estadística. Las comparaciones entre los grupos con valores con distribución normal se realizó utilizando pruebas de Student, para varianzas no desiguales y de Aspin-Welch, para varianzas desiguales. Las pruebas de Mann Whitney, Kruskal-Wallis y de Wilcoxon también se utilizaron, en el caso de datos no paramétricos. Cuando  $P < 0.05$ , se consideró que había diferencias estadísticamente significativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra inicial fue de 1265 sueros, pero solo se pudo hacer las cuatro determinaciones en 1252 de ellos, quedando el grupo A (de estudio) y el grupo B (control), compuesto por 655 y 607 lactantes, respectivamente. El 1 % de las muestras resultó no útil debido a volumen insuficiente o hemólisis de los sueros. Se realizaron 1252 determinaciones de anti-TT; 1255, de anti-TD y 1259, de anticuerpos anti-tos ferina y 1261 de anticuerpos anti-HBs.

### Análisis por grupo de vacuna

- Determinación de los niveles de seroprotección y medias de los títulos

Los resultados obtenidos al finalizar la serie primera de vacunación (tercera dosis) se muestran en la tabla 1 y 2. Para las antitoxinas tetánica y diftérica, se calculó el TPA; para los anticuerpos anti-tos ferina y anti-HBs se calculó el TPG.

**Tabla 1.** Niveles de seroprotección (%) por grupo de vacuna a la tercera dosis.

Grupo	Vacuna	Anti-TT	Anti-TD	Anti-tos ferina	Anti-HBs
A n=645	Vacuna combinada	99.8	99.8	81.8	86.2
B n=607	Vacunación simultánea	100	100	90.2	99.17

**Tabla 2.** Títulos por grupo de vacuna a la tercera dosis.

Grupo	Vacuna	Anti-TT	Anti-TD	Anti-tos ferina	Anti-HBs
Grupo A n=645	Trivac-HB	5.26 UI/ml IC:4.98-5.53	13.72 UI/ml IC:13.12-14.32	16.41 NTU IC:15.83-17.02	126.25UI/L IC:109.84-145.09
Grupo B n=607	DPT  Heberbiovac-HB	8.45 UI/ml IC: 8.10-8.84	14.23 UI/ml IC:13.62-14.84	20.78 NTU IC:19.99-21.60	721.40 UI/L IC: 646.25-805.36

#### Fracción tetánica (T)

El nivel de seroprotección de antitoxina tetánica alcanzado con el Grupo A, fue 99.8% y el obtenido con el Grupo B fue 100%, no se encontró diferencias estadísticamente significativas con una  $P=0.25$ . La media aritmética de antitoxina tetánica (anti-TT) en el Grupo A, con la vacuna combinada, fue de 5.26 UI/ml (IC: 4.98-5.53), mientras que en el grupo B, con la vacuna simultánea fue de 8.45 UI/ml (IC: 8.10-8.84). Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias, como lo demostró la prueba de Mann Whitney, con una  $Z=9.06$  y  $P=0.00$ . (véase Tabla 1 y 2)

#### Fracción diftérica (D)

El nivel de seroprotección de antitoxina diftérica con el Grupo A fue 99.8% y el obtenido con el Grupo B fue 100%, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, con una  $P=0.40$ . La media aritmética de antitoxina diftérica (anti-TD) obtenida con el Grupo A fue 13.72 UI/ml (IC: 13.12-14.32) y la obtenida con el Grupo B fue 14.23 UI/ml (IC: 13.62-14.84). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, como lo indica la prueba de Student, con un valor de  $T=-1.23$  y  $P=0.21$ . (véase Tabla 1 y 2)

#### Fracción pertussis (P)

La seroprotección anti-tos ferina alcanzada con el Grupo de Estudio fue 81.8%, mientras que para el Grupo Control fue 90.2%. El TPG de anticuerpos anti-tos ferina obtenido en el Grupo de Estudio fue 16.41 NTU (IC: 15.83–17.02), sin embargo, en el grupo control fue 20.78 NTU (IC: 19.99-21.60). Observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de vacunas como lo demostró la prueba de Student, con un valor de  $T=-8.8$  y  $P=0.00$ . (véase Tablas 1 y 2)

#### Fracción hepatitis B (HB)

El 86.3 % de los lactantes del Grupo A lograron títulos seroprotectores (10 UI/L) anti-HBs, mientras que 99.2% de los lactantes del Grupo B, lograron títulos mayores de 10 UI/L. El TPG de anticuerpos anti-HBs fue 126.25 UI/L, (IC: 109.84-145.09 UI/L) en el Grupo A, sin embargo en el Grupo B fue de 721.40 UI/L (IC: 646.25 – 805.36). (véase Tablas 1 y 2). Se encontraron diferencias estadísticamente

significativas entre los grupos, como lo demostró la prueba de Mann Whitney, con un valor de  $U=16.9$  y  $P=0.00$ .

Como se puede observar, se logró una amplia protección de antitoxinas tetánica y diftérica con la vacuna combinada Trivac-HB. Los niveles de seroprotección para las dos antitoxinas con esta vacuna estuvieron por encima del 95 %, valor recomendado por la OMS (Galazka, 1993a; Galazka, 1993c) para considerar una vacuna inmunogénica y coinciden con otros estudios de evaluación de la vacuna tetravalente de células completas Tritanrix-HB de Glaxo Smith Kline. (Papaevangelou *et al.*, 1995; Arístegui *et al.*, 1997). Los mejores resultados se obtuvieron con la antitoxina diftérica para la cual no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la vacuna de estudio y la vacuna control previamente licenciada, y aunque la media de antitoxina tetánica fue ligeramente inferior en el grupo A, y hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, esto no equivale a que Trivac-HB sea un vacuna menos inmunogénica, dado que 99.8 % de los lactantes tuvieron títulos seroprotectores. Según nuestros resultados, la combinación de los cuatro antígenos no genera interferencia inmunológica en las respuestas de las antitoxinas tetánica y diftérica.

Los ensayos clínicos han demostrado que las vacunas anti-tos ferina más eficaces son aquellas cuyo nivel de seroprotección está por encima del 80 % (Poovorawan *et al.*, 1994; Pertussis vaccines, 1999). En el caso de Trivac-HB, el 81.8 % de los niños tuvieron títulos seroprotectores anti-tos ferina, valor considerado como una respuesta aceptable. Por otra parte, aun cuando la vacuna de células completas tiene muchos años de creada, todavía no está definido el nivel protector de anticuerpos (Kanra *et al.*, 1995; Cherry *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2001). La protección de los contactos intrafamiliares es la mejor prueba de eficacia de vacunas anti-tos ferina (Edwards y Decker, 2004).

La mayoría de las pruebas serológicas usadas en los ensayos clínicos de vacunas miden la respuesta de anticuerpos anti-TP y anti-FHA (Sanz *et al.*, 2002). En nuestro estudio también empleamos un ELISA anti-TP y anti-FHA. Internacionalmente, no se dispone de un estándar para cuantificar los anticuerpos.

Cada fabricante define el valor de corte y las unidades para expresar los títulos (Mills *et al.*, 1998; Edwards y Decker, 2004).

Se conoce que los anticuerpos anti-TP inhiben la unión de la bacteria a las células epiteliales (Begué *et al.*, 1997; Espósito *et al.*, 2001) y están asociados con la inmunidad natural a la tos ferina. Se piensa que estos anticuerpos son los más importantes mediadores de la protección clínica (Watanabe, 2002). FHA es un potente inmunógeno y los anticuerpos anti-FHA, alteran la adherencia de las bacterias a las células del epitelio respiratorio y están presentes después de la infección natural y de la vacunación (Galazka, 1993b, Edwards y Decker, 2004).

También hay que tener en cuenta que, la infección natural y las vacunas de células completas de *B. pertussis* producen una respuesta inmunológica predominantemente de tipo celular. Hay estudios que muestran que niños con bajos títulos de anticuerpos anti-tos ferina, tienen una buena respuesta celular (Ausiello *et al.*, 1997, Cassone *et al.*, 1997). Se conoce que después de la serie primaria de vacunación y antes de la dosis de reactivación, los anticuerpos decaen en el tiempo y sin embargo, persiste la respuesta mediada por células (Espósito *et al.*, 2001).

Con Trivac-HB no se obtuvo un alto nivel de seroprotección de anticuerpos anti-HBs. Kanra y colaboradores obtuvo un valor similar con la vacuna combinada DTP/HB de GlaxoSmithKline (GSK) de seroprotección contra la Hepatitis B con un esquema de 3 dosis (Kanra *et al.*, 1995). La firma Aventis Pasteur de Francia ha realizado ensayos clínicos con la vacuna hexavalente Hexavac contra la difteria, el tétanos, la tos ferina, la poliomielitis, el *Haemophilus influenzae* tipo b y la hepatitis B usando muestras grandes de lactantes y el nivel de seroprotección anti-HBs, con un esquema de 2, 4 y 6 meses ha estado en el rango de 87.7-100 % (Mallet *et al.*, 2004).

Se ha establecido un nivel mínimo de 10 UI/l como indicador de seroprotección contra hepatitis B en los ensayos clínicos controlados (Kane, 1994). La OMS recomienda alcanzar al menos el 95 % de seroprotección contra la hepatitis B después de tres dosis de vacuna (World Health Organization, 1992), valor que no se logró con Trivac-HB, lo cual permite sugerir la existencia de interferencia inmunológica con la fracción de HBsAg de la vacuna. Por esta razón, en este

estudio, se planteó la necesidad de suministrar una dosis adicional de Heberbiovac-HB, que pudiera ser administrada al nacer o como reactivación entre los 16 y 18 meses.

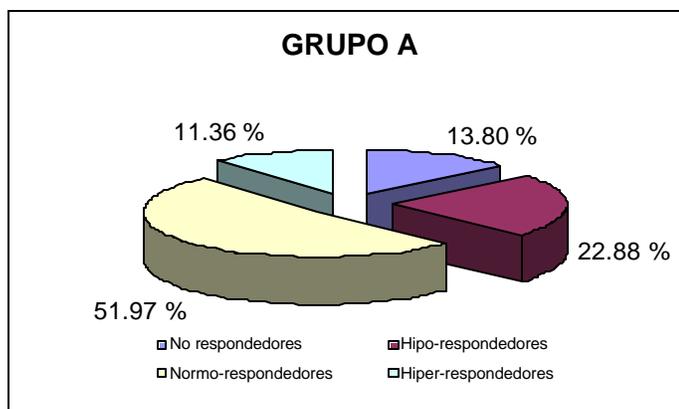
Hay que señalar, que la mayoría de los trabajos encontrados en la literatura utilizan un tamaño de muestra mucho más pequeño que el utilizado en el presente estudio. En muchos ensayos oscila entre 100 y 170 lactantes, aproximadamente (Poovorawan *et al.*, 1994; Diez-Delgado *et al.*, 1997; André, 1999). En muchos de ellos, los niveles de seroprotección anti-HBs son mayores del noventa por ciento sin diferencias significativas entre los grupos de vacuna combinada y vacuna simultánea. Se conoce que un tamaño muestral pequeño no permite detectar si el efecto observado es resultado de la propia vacunación o se debe al azar (Green, 2002; Wittes, 2002).

Resulta interesante observar que muchos estudios de ensayo clínico con 3 dosis de vacuna realizados con la vacuna tetravalente de células completas de *B. pertussis* de GSK, homóloga a Trivac-HB, no utilizaron como vacuna control DPT y HB aplicadas simultáneamente, en muchos casos solo utilizaron como vacuna control a DPT, por lo cual resulta muy difícil comparar el comportamiento de la fracción HB, además este hecho niega el principio de comparación de los ensayos clínicos (Poovorawan *et al.*, 1994; Aristegui *et al.*, 1997).

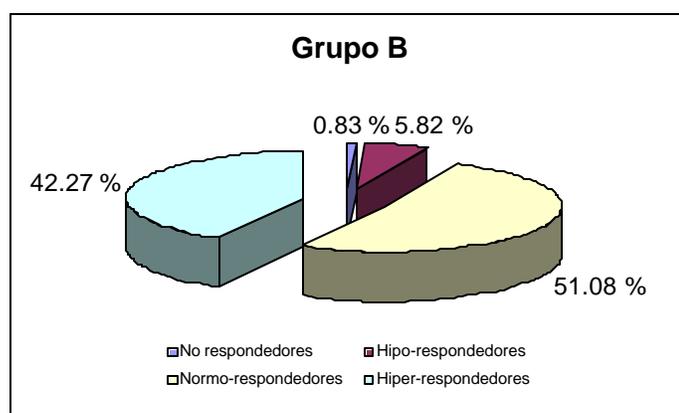
Generalmente, las vacunas combinadas se administran en la misma extremidad, a diferencia de la vacunación simultánea que se aplica en extremidades diferentes, lo cual podría conllevar a un incremento de la competencia antigénica a nivel de un mismo centro germinal de nodo linfático regional. Esta hipótesis también se ha utilizado para explicar la disminución del TPG para alguno de los antígenos de la combinación (Pichichero y Passador, 1997) lo cual también podría explicar la disminución de los títulos anti-HBs en Trivac-HB.

### **Calidad de la respuesta de anticuerpos anti-HBs**

Los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 1 y 2:



**Gráfico 1 .** Calidad de la respuesta anti-HBs con la vacuna combinada.



**Gráfico 2 .** Calidad de la respuesta anti-HBs con la vacuna simultánea.

Con la aplicación de Heberbiovac-HB combinado, el 13.8 % de los niños fueron no respondedores, sin embargo con la aplicación de Heberbiovac-HB simultáneo, solo 0.83 % de los lactantes no respondieron a este antígeno. Estos resultados generaron los niveles de seroprotección de 86.2 % y 99.17 % en el grupo A y en el grupo B, respectivamente.

Como se puede observar en las gráficas anteriores, en los dos grupos el mayor porcentaje de niños se distribuyó en el grupo de los normo-respondedores (100 = anti-HBs = 999). Sin embargo en el caso de TRIVAC-HB el segundo grupo importante fue el de los hipo-respondedores y en el caso de la simultánea fueron los hiper-respondedores. Si se sumaran los normo-respondedores con los hiper-respondedores de cada grupo, se verá que el 63.33 % de los niños en el grupo A y el 93.35 %, en el grupo B obtuvieron respuestas por encima de las 100 UI/L de anti-

HBs, lo cual significa que más de un 50 % de los niños en cada grupo tendrá asegurada la protección por 10 años, si se tiene en cuenta que tienen títulos 10 veces por encima del nivel considerado protector (10 UI/L). Este resultado coincide con Díaz y colaboradores en el año 1997, obtuvo un predominio de la respuesta anti-HBs de más de 100 IU/L con la aplicación simultánea de Heberbiovac-HB, DPT y VAMENGOC-BC a un grupo de lactantes.

Aunque el 22.88 % de los niños en el grupo A fue hipo-responder, estos niños están seroprotectidos y en caso de infección natural con el VHB, este nivel de anticuerpos será suficiente para obtener una potente respuesta de memoria.

Según nuestros resultados, el porcentaje de no respondedores fue mayor entre los niños del grupo donde se empleó la vacuna combinada. Las razones pueden ser diversas: la magnitud de la respuesta anti-HBs está directamente relacionada con el tiempo entre las dosis de vacuna (Mast *et al.*, 2004). Se conoce que intervalos grandes entre la segunda y tercera dosis incrementan los títulos (Gilks *et al.*, 1990). En este sentido, con esquemas cortos de 2, 4, 6 ó 3, 4, 5 se han obtenido títulos más bajos que con los esquemas 0, 1, 6 ó 3, 5, 11 (André y Safary, 1990; Giammanco *et al.*, 1998). Pudiera ser que los intervalos cortos entre las dosis tengan una mayor influencia sobre los títulos anti-HBs cuando el HBsAg está combinado.

En nuestro estudio utilizamos un esquema de 2, 4, 6 meses y los resultados de seroprotección y los TPG fueron más bajos con la vacuna combinada que los obtenidos con la vacuna monovalente. Un resultado similar obtuvo la firma GSK, en 1990, con una formulación combinada DPT/HB, en niños con un esquema 0-2-4, y obtuvo un 100 % de seroprotección, pero los títulos fueron 10 veces menores contra el HBsAg, con respecto a los niños que recibieron la vacuna DPT y la vacuna contra la hepatitis B, en cada brazo por separado (André, 1994).

Se conoce que la presencia de un antígeno en una mezcla antigénica puede reducir drásticamente la respuesta inmunológica contra todos los demás (Roitt, 1997). El mecanismo de este efecto se explica por la competencia de los péptidos resultantes del procesamiento de antígenos, por el surco del MHC (complejo de histocompatibilidad, siglas en inglés). Hay una evidente jerarquía de los epitopos

con respecto a esta unión competitiva y se basa en la accesibilidad diferencial a las proteasas cuando la molécula se despliega y la presencia o ausencia de secuencias de aminoácidos que faciliten la degradación para producir péptidos en abundancia y con afinidad relativamente alta por el surco del MHC. Nuestros resultados sugieren que haya podido darse el fenómeno de interferencia entre los componentes HB y P, si se tiene en cuenta que el HBsAg solo es un antígeno y las células completas de *B. pertussis* contienen aproximadamente 3000 antígenos (Offit y Hackett, 2004), por lo cual la competencia por el MHC podría estar a favor de los péptidos mayoritarios resultantes del procesamiento de las células completas de *B. pertussis*.

Se conoce que las células completas de *B. pertussis* actúan como un potente adyuvante en la combinación con los toxoides tetánicos y diftéricos en la vacuna combinada DPT, mejorando la inmunogenicidad de los toxoides comparada con su administración separada (Greenberg, 1948; Salmaso *et al.*, 1998). Sin embargo, este efecto no está descrito para el HBsAg combinado con la vacuna DPT de células completas.

Se conoce que la TP y la AC en sinergismo con el LPS de *B. pertussis*, tienen un potente efecto adyuvante sobre los antígenos inyectados combinadamente (de Jong *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2004), al funcionar como activadores de las células dendríticas, potentes células presentadoras de antígenos (Beutler, 2004). Estas células capturan el antígeno, migran al nodo linfático, expresan las moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y liberan citoquinas para la activación y diferenciación de células T, que en cooperación con las células B, son necesarias para la producción de anticuerpos (Offit y Hackett, 2004).

Se plantea que las impurezas de las vacunas DPT pudieran ser responsables de los problemas en la combinación de los antígenos. Se conoce que las proteasas resultantes del metabolismo de *B. pertussis* en el preparado de células completas pudieran degradar en cierta medida al HBsAg (Falk, 1999) y que el formaldehído utilizado en la obtención de los toxoides pudieran reaccionar también con proteínas inespecíficas y dar como resultado una mezcla impura que afecta la inmunogenicidad (Kane, 1994), pero aun no se han hecho los estudios que apoyen

esta hipótesis en el caso de la vacuna Trivac-HB (comunicación personal del Dr. N. Expósito, CIGB, 3 de septiembre de 2004).

### Análisis por sexo

- Análisis de la seroprotección

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de seroprotección

**Tabla 3.** Nivel de seroprotección (%) obtenido por sexo y por grupo de vacuna para los cuatro antígenos monitoreados.

Grupo	Cantidad	Sexo	Anti-TT	Anti-TD	Anti-tos ferina	Anti-HBs
A	345	Masculino	99.7	100	80.3	85.8
	300	Femenino	100	100	83.5	86.7
B	317	Masculino	100	100	91.5	99.3
	290	Femenino	100	100	88.9	99

En los grupos A y B, entre el sexo masculino y femenino no existió diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de seroprotección de antitoxina tetánica y diftérica, anticuerpos anti-tos ferina ni anticuerpos anti-HB, con valores de  $P > 0.05$ .

- Análisis de los Títulos Promedios

En la tabla 4 se muestran los resultados de títulos promedios obtenidos:

**Tabla 4.** Títulos promedios e intervalos de confianza según sexo y grupo de vacuna

Grupo	Cantidad	Sexo	Anti-TT	Anti-TD	Anti-tos ferina	Anti-HBs
A	345	Masc.	5.13 UI/ml IC:4.78-5.49	13.23 UI/ml IC:12.4-14.0	15.67 NTU IC:14.95-16.43	120.53 UI/L IC:99.6-145.8
	300	Fem.	5.20 UI/ml IC:4.79-5.62	14.28 UI/ml IC:13.41-15.16	17.17 NTU IC:16.26-18.16	133.07 UI/L IC:108-63-163.01
B	317	Masc.	8.44 UI/ml IC:7.92-8.97	13.76 UI/ml IC:12.92-14.6	20.04 NTU IC:19.07-21.06	714.9 UI/L IC:616.2-829.5
	209	Fem.	8.28 UI/ml IC:7.79-8.77	14.69 UI/ml IC:13.82-15.57	21.38 NTU IC:20.18-22.65	731.63 UI/L IC:619.07-856.47

## GRUPO A

En este grupo, no existió diferencia estadísticamente significativa entre los TPG de ambos sexos para la antitoxina tetánica y diftérica y anticuerpos anti-HB, mientras que si hubo diferencia estadísticamente significativa para los anticuerpos anti-tos ferina. (véase Tabla 3)

En la comparación de los TP de antitoxina tetánica se utilizó la prueba de Mann Whitney, con una  $Z=0.09$  y  $P=0.92$ . Para la antitoxina diftérica, se empleó a misma prueba con una  $Z=1.64$  y  $P=0.09$ . Para los anticuerpos anti-HBs una  $Z=0.65$  y una  $P=0.51$ , demostraron que no habían diferencias significativas. Sin embargo, para los anticuerpos anti-tos ferina, la prueba de Student, con una  $T=2.49$  y  $P=0.01$  demostraron que sí diferencia estadísticamente significativa entre los TPG de este grupo.

## GRUPO B

En el Grupo B no existió diferencia estadísticamente significativa entre los TPG de los sexos de los títulos de anticuerpos para ninguno los antígenos monitoreados. (véase Tabla 4)

Para la comparación de los TPA de la antitoxina tetánica y diftérica se utilizó la prueba de Mann Whitney con una  $Z=0.07$  y la  $P=0.93$  y una  $Z=1.5663$  y la  $P=0.11$ , respectivamente y para los TPG anti-HBs se obtuvo una  $Z=0.53$  y una  $P=0.58$ . En la comparación de los TPG de anticuerpos anti-tos ferina se utilizó la prueba de Aspin-Welch,  $T=1.67$  y una de  $P=0.09$ .

Se conoce que existe una diferencia sexual en las funciones del sistema inmunológico dado por la actividad moduladora de las hormonas sexuales sobre la función de las células inmunes. Generalmente, el sexo femenino muestra una respuesta humoral y celular mayor que el sexo masculino en adultos (Roitt, 1997). Muchos estudios sugieren que el estrógeno estimula la producción de anticuerpos. También hay trabajos sobre el efecto inmunosupresor de los andrógenos sobre la producción de anticuerpos y la producción de células  $CD4^+$  (Klein, 2004). Pero estas diferencias no se manifiestan durante la primera infancia debido a la inmadurez del

sistema inmunológico, de aquí la ausencia de diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos que se observó entre los sexos.

Durante esta etapa de la vida, se produce una maduración gradual y lenta de la afinidad de las células B antígeno-específicas. Los lactantes son capaces de producir IgM, IgG e IgA, pero su avidéz es menor. Esta producción se incrementa con la progresiva diversificación del repertorio de anticuerpos, proceso que comienza entre los 2 y 4 meses de edad, para IgM, y un poco más tarde para IgG (Siegrist, 2001).

En la infancia, los niveles de monocitos/macrófagos, el sistema complemento, las células asesinas naturales están por debajo del nivel adulto. Las células dendríticas son menos eficaces en promover la proliferación de células T ante la estimulación antigénica. Hay una menor expresión de células presentadoras de antígenos, de moléculas co-estimuladoras y de adhesión (Kovarik y Siegrist, 1998a). Sugerimos que estas son las razones fundamentales que no permiten apreciar diferencias en la respuesta de anticuerpos entre niñas y niños.

#### **Análisis de la reactivación**

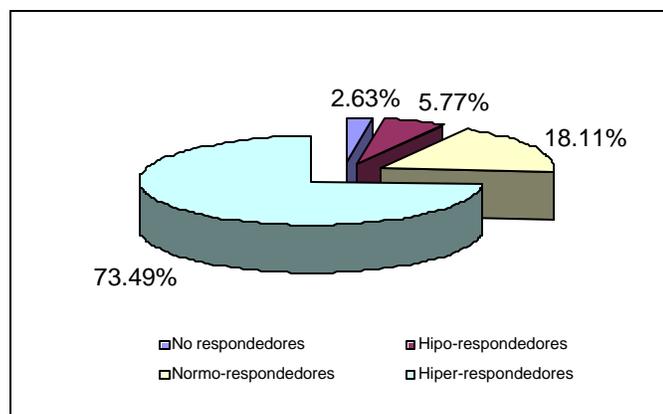
En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos:

**Tabla 5.** Seroprotección y TPG anti-HBs de la dosis de reactivación.

Seroprotección	97.37 %
TPG total	3 317.1 UI/L (IC: 2 574.4-4 274.2)

**Tabla 6.** Seroprotección y TPG anti-HBs de la dosis de reactivación según el sexo.

Sexo	Seroprotección	TPG
Femenino	96.3 %	3544.45 UI/L (IC: 2716.8-6169.7)
Masculino	97.9 %	2811.4 UI/L (IC: 1996.6-3958.7)



**Gráfica 3.** Calidad de la respuesta de anticuerpos anti-HBs obtenidos con la reactivación.

Luego de concluir, el análisis de inmunogenicidad de la serie primaria de vacunación entre los grupos se decidió aplicar una dosis de reactivación con Herberbiovac-HB a los 18 meses de edad, a todos los niños del Grupo A, al detectar que este grupo no alcanzó el porcentaje de seroprotección esperado de más del 95 %.

Como parte del estudio de inmunogenicidad con la dosis de reactivación, no se incluyeron los títulos de antitoxina tetánica, ni anti-diftérica ni anticuerpos anti-tosferina, pues la dosis de refuerzo con estos antígenos no se diseñó como ensayo controlado.

Se seleccionó una muestra 381 sueros entre las dos provincias para el análisis de inmunogenicidad de anticuerpos anti-HBs. Con esta dosis de recuerdo el 97.37 % de los niños estuvieron seroprottegidos (véase tabla 5).

Se alcanzó un 97.9 % y un 96.3 % de seroprotección para el sexo masculino y el sexo femenino, respectivamente. No existió diferencia significativamente estadística entre los sexos en el grupo A, como lo demostró la  $P=0.5$ . En la vacunación de reactivación de este Grupo A, se obtuvo un TPG de 2811.4 UI/L (IC: 1996.6-3958.7) para el sexo masculino y 3544.45 UI/L (IC: 2716.8-6169.7) para el sexo femenino y no se observó diferencia estadísticamente significativa entre estos valores, como lo demostró la prueba de Student, con una  $T=1.40$  y  $P=0.11$ . (véase Tabla 9)

El 91.6 % de los niños tuvieron títulos por encima de 100 UI/l con la dosis de reactivación. Solo el 5.77 % de los niños fueron hipo-respondedores y el 2.63 % no respondedores, respectivamente. (véase Gráfica 3)

La gran cantidad de niños que respondieron a la dosis de reactivación demostraron que las dosis anteriores de Trivac-HB estimularon correctamente el sistema inmunológico. Con 4 dosis de HBsAg se logra obtener una seroprotección comparable a la obtenida con su homóloga la tetravalente DPT/HB (Tritanrix-HB) de GSK en un ensayo realizado con niños en un estudio (André, 1999). Este esquema es el aprobado para el uso de la vacuna tetravalente y pentavalente de células completas de esta firma farmacéutica (Maung *et al.*, 1997; Riedemann *et al.*, 2002).

La respuesta a la vacuna recombinante de HBsAg es un proceso inmunogenéticamente condicionado, donde participan múltiples genes (Noh *et al.*, 2003). Está descrita una relación muy estrecha entre un genotipo de HLA (siglas en inglés de *human leukocyte antigen*), que no predomina en la población, pero que está relacionado con la no respuesta a la vacuna anti-hepatitis B (Noh *et al.*, 2003). Se plantea que este genotipo “no respondedor” no se expresa en los respondedores y sin embargo sí se expresa en los individuos no respondedores y con manifestaciones de varios grados en los hipo-respondedores (Martinetti *et al.*, 2000).

Los individuos que no responden a 4 dosis de vacuna se conocen como ¿verdaderos no respondedores? (Martinetti *et al.*, 2000). En estos individuos aparentemente sanos, se han identificado diferencias en la capacidad de varias glicoproteínas HLA clase II para presentar los péptidos virales al sistema inmunológico, y por esta causa no son capaces de responder a algunas vacunas de proteínas virales como el HBsAg recombinante (Martinetti *et al.*, 2000; Offit y Hackett, 2004). Se conoce que las células dendríticas presentan antígenos de la superficie viral a través de las moléculas HLA II a los linfocitos T cooperadores, los cuales bajo la estimulación de algunas citocinas promueven la producción de clones de células B productoras de anticuerpos anti-HBs (Jung y Rape, 2002), de aquí que la expresión de moléculas HLA malas presentadores de los péptidos pueda estar relacionada con la no producción de anti-HBs. (Martinetti *et al.*, 2000).

Las repetidas dosis de vacuna contra la hepatitis B durante en el primer año de vida, estimulan la producción de anticuerpos IgG, sobre todo IgG1 y IgG3 (Kovarik y Siegrist, 1998b). Se conoce que la vacuna Heberbiovac-HB aplicada en adultos es capaz de activar la producción predominante de anticuerpos IgG de subclase 1 (Shokgozar y Shokri, 2002). Es interesante comprobar que la respuesta humoral tanto en el caso del sistema inmune maduro de adultos y el sistema *naïve* de lactantes estimula la producción de la misma subclase de anticuerpos ante la vacunación contra la hepatitis B y a pesar de la inmadurez del lactante, la seroprotección que obtuvimos después de 4 dosis de vacuna fue muy elevada con un 71.3 % de hiperrrespondedores.

La posible interferencia que hubo en Trivac-HB en el caso de los anticuerpos anti-HBs y anti-tos ferina, se resolvió con la dosis adicional de Herberbiovac-HB a los 18 meses. Estudios en lactantes han demostrado que más del 95 % de los individuos previamente vacunados con 3 dosis de vacuna anti-HBs, tienen la habilidad de alcanzar una rápida respuesta de memoria a la dosis de reactivación, aun si los anticuerpos no fueron detectables (Mast *et al.*, 2004; Mallet *et al.*, 2004) como se observa en nuestro estudio, donde aun los hipo-respondedores alcanzaron una respuesta muy alta. Por esta razón se plantea que una alta respuesta de anticuerpos post-reactivación, corrobora que el sistema inmunológico fue correctamente estimulado por las primeras dosis de la vacuna (Kane, 2004). Muchos estudios han demostrado que individuos con cuatro dosis de HBsAg están protegidos contra las formas sintomáticas y crónicas de hepatitis B (Mallet *et al.*, 2004).

Hay que decir que en materia de vacunas combinadas, la última palabra no está dicha, los complicados mecanismos que se dan en la combinación no han sido completamente elucidados. Hoy día, la eficacia de la famosa vacuna Hexavac de Aventis Pasteur está en discusión después de 10 años de uso en muchos países europeos, debido a los bajos títulos anti-HBs que está reportando actualmente (European Medicine Agency, 2005).

Los esquemas de vacunación aprobados para un grupo de vacunas combinadas licenciadas en la actualidad, como Hexavac de Aventis Pasteur e Infanrix hexa de

Glaxo Smithkline incluyen una vacunación primaria de 3 dosis de HBsAg a los 2, 4 y 6 meses y una reactivación entre los 12 y 18 meses (Mallet *et al.*, 2004, Zepp *et al.*, 2004). Por otra, parte hay una tendencia a incluir la vacunación con el HBsAg al nacer, con el fin de prevenir la transmisión perinatal de hepatitis B, seguido de la vacunación con 3 dosis con la vacuna combinada. En los países de alta endemicidad donde hay riesgo de transmisión perinatal del VHB, en 1992, la OMS aprobó este esquema y la opción de reactivar a los 18 meses (WHO, 1992).

El esquema cubano de vacunación con Heberbiovac-HB monovalente es 0, 1, 6 meses en lactantes. La mejor manera de adecuar el esquema de Trivac-HB con el PNI (Programa Nacional de Inmunizaciones) cubano es el esquema 0, 2, 4, 6, y así se mantendría la protección perinatal con anticuerpos anti-HBs.

El análisis de la inmunogenicidad de la primera vacuna combinada tetravalente cubana (Trivac-HB) en un grupo de lactantes fue satisfactorio con el esquema 2, 4, 6 y 18 meses, con una dosis de reactivación de Heberbiovac-HB. Hay que destacar que esta vacuna ya fue incluida en el PNI cubano. Esperamos que los subsiguientes ensayos de eficacia y seguridad avalen el uso de esta vacuna en el resto del mundo donde pueda contribuir a la protección contra el tétanos, la difteria, la tos ferina y la hepatitis B en la población infantil.

Son pocas las firmas farmacéuticas productoras de vacunas combinadas. Las combinaciones internacionalmente usadas son aquellas de Aventis Pasteur y GlaxoSmithKline, esta última produce una vacuna tetravalente DTP/HB, conocida como Tritanrix Hep B, única combinada de células completas hasta ahora disponible. Es bueno destacar que con estos resultados Trivac-HB del CIGB-Finlay podría considerarse como la segunda vacuna tetravalente de células completas disponible en el mundo.

### **CONCLUSIONES**

- La combinación en Trivac-HB no afecta la respuesta de antitoxinas tetánica, ni diftérica y proporciona una respuesta satisfactoria de anticuerpos anti-tos ferina.
- La combinación, generó interferencia inmunológica con la respuesta de anticuerpos anti-HBs en la serie primaria de vacunación.
- Con la vacuna tetravalente se obtuvo el mayor porcentaje de no respuesta y de hiporespuesta anti-HBs.
- La inmadurez del sistema inmunológico del lactante permite explicar el comportamiento similar de la respuesta de anticuerpos entre los sexos.
- La reactivación con Heberbiovac-HB completa la serie de dosis necesarias para que Trivac-HB sea considerada una vacuna inmunogénica.
- Nuestros resultados permitieron considerar a Trivac-HB una vacuna que podría ser incorporada al Programa Nacional de Inmunizaciones.

### **RECOMENDACIONES**

- Comenzar la evaluación inmunológica de Trivac-HB con un esquema de 2, 4, 6,18 en un grupo de lactantes.
- Realizar estudios de inmunidad celular a niños participantes para confirmar que la aplicación vacuna combinada proporciona inmunidad a largo plazo a la tos ferina.
- Realizar estudios inmunogenéticos a los niños que verdaderamente no respondieron a cuatro dosis de HBsAg.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akram DS, Maqbool S, Khan DS, Jafri R, Randhawa S, Valenzuela-Silva C et al.** Immunogenicity of a recombinant yeast-derived, anti-hepatitis B vaccine after alternative dosage and schedule vaccination in Pakistani children. *Vaccine*. 2005; 23 (50): 5792-5797.
- André FE, Safary A.** Experience with a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Progress in Hepatitis B immunization*. 1990; 194: 207-213.
- André FE.** Development of combined vaccines: manufacturers viewpoint. *Biologicals*. 1994 ;22(4):317-21.
- André F.** Development and clinical application of new polyvalent combined paediatric vaccines. *Vaccine*. 1999; 17 (13-14): 1620-1627.
- Arístegui J, Muñiz J, Pérez A, Imaz M, Arrate JP, Suárez MD, et al.** Inmunogenicidad de las vacunas contra la difteria, tétanos, pertussis y polio oral administradas en el calendario vacunal a la edad de 2, 4, y 6 meses y en su coadministración con la vacuna contra la hepatitis B a los 0, 2 y 6 meses. *Ann Esp Pediatr*. 1996; 44 (1): 25-28.
- Ausiello CM, Urbani F, La Sala A, Lande R, Cassone A.** Vaccine- and antigen dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect Immun*. 1997; 65 (6): 2168-2174.
- Ausiello CM, Lande R, Urbani F, Di carlo B, Stefanelli P, Salmaso S, et al.** Cell-mediated immunity and antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens in children with a history of pertussis infection and in recipients of an acellular pertussis vaccine. *J Inf Dis*. 2000; 181: 1989-1995.
- Bégué P, Grimmpel E.** Future combined vaccines. *J Infect Dis*. 1996; 174 (suppl 3): 295-297.
- Bégué P, Stagnara J, Vie le Sage F, Bernard JC, Xerri B, Abitbol V.** Immunogenicity and reactogenicity of a booster dose of diphtheria, tetanus, acellular pertussis and inactivated poliomyelitis vaccines given concurrently with Haemophilus

type B conjugate vaccine or as pentavalent vaccine. *Pediatr Infect Dis.* 1997; 16: 787-794.

**Beutler B.** Innate immunity; an overview. *Molecular Immunology.* 2004; 40: 845-859.

**Brett MM, Hood J, Brazier JS, Duerden BI, Hahne SJ.** Soft tissue infections caused by spore-forming bacteria in injecting drug users in the United Kingdom. *Epidemiol Infect.* 2005; 133(4):575-582.

**Cabrera R, Gomez de Ileón P, Cravioto A.** Vacunas: fundamento para su desarrollo. Editorial El Manual Moderno. México. 1996.

**Capiou C, Poolman J, Hoet B, Bogaerts H, André F.** Development and clinical testing of multivalent vaccines based on a diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine: difficulties encountered and lessons learned. *Vaccine.* 2003; 21 (19-20): 2273-2287.

**Casadevall A, Pirofski LA.** Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* 1999; 67 (8): 3703-3713.

**Cassone A, Ausiello CM, Urbani F, Lande R, Giuliano M, La Sala A et al.** Cell-mediated and antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens in children vaccinated with acellular or whole-cell pertussis vaccines. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1997; 151: 283-289.

**Cherry JD.** Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis.* 1996.; 174 (Suppl 3): S259-263.

**Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K.** A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine.* 1998; 16(20):1901-1906.

**Cherry JD.** Epidemiological, clinical and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis.* 1999; 28 Suppl. 2: S112-117.

**Chokephaibulkit K.** Combination vaccines. *J Med Assoc Thai.* 2002; 85 Suppl 2: S 694-699.

**Cowan LD, Griffin MR, Howson CP et al.** Acute encephalopathy and chronic neurological damage after pertussis vaccine. *Vaccine.* 1993; 11 (14): 1371-1379.

**Dagan R, Agbaria K, Piglansky L, Melamed R, Willems P, Grossi A.** Immunogenicity of a combined diphtheria, tetanus, acellular pertussis, inactivated poliovirus and *H. influenzae* type b conjugated vaccine (DTPa-IPV-Hib) in infants. En: Proceedings of the 36<sup>th</sup> International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1996 Sept 15-18; New Orleans, EE.UU. Washington, DC; American Society for Microbiology; 1996. p. 154 [abstract G-59].

**de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, et al.** Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. *J Immunol.* 2002;168: 1704–1709.

**Decker ME, Edwards KM, Bogaerts HH.** Combination vaccines. En: Plotkins SA, Oreinstein WA, editores. *Vaccines.* Philadelphia: Saunders; 2004, p: 825-861.

**Díaz M, Navia O, Bravo J, Pedroso P, Urbino A.** Reactogenicidad de la vacuna cubana Heberbiovac-HB a diferentes dosis. *Rev Cub Med Trop.* 1995; 47 (1): 65-70.

**Díaz M, Rodríguez L, Urbino A, Bravo JR, Pedroso P.** Reacciones adversas y respuesta inmune de la vacuna Heberbiovac-HB aplicada a lactantes, simultáneamente con la DPT y la VA-MENGOC-BC. *Rev Cubana Med Trop.* 1997; 49 (3): 196-203.

**Diez-Delgado J, Dal-Ré R, Llorente M, González A, López J.** Hepatitis B component does not interfere with the immune response to diphtheria, tetanus and whole-cell *Bordetella pertussis* components of a quadrivalent (DTPw-HB) vaccine: a controlled trial in healthy infants. *Vaccine.* 1997; 15 (12-13): 1418-1422.

**Dokmetjian J, Della Valle C, Lavigne V, Eriksson P, Manghi MA.** Relationship between structure and neutralizing activity of rabbit tetanus antibodies elicited by acellular and whole-cell pertussis DTP vaccines. *Vaccine.* 1998; 16 (7): 672-677.

**Ellis RW.** Development of combination vaccines. *Vaccine.* 1999; 17: 1635-1642.

**Edwards KM, Decker MD.** Pertussis vaccine En: Plotkin SA, Orenstein WA, editores. *Vaccines.* Philadelphia: Saunders; 2004, p.471-527.

**Esposito S, Agliardi T, Giammanco A, Faldella G, Cascio A, Bosis S, et al.** Long-term pertussis-specific immunity after primary vaccination with a combined diphtheria, tetanus, tricomponent acellular pertussis, and hepatitis B vaccine in comparison with that after natural infection. *Infect Immun.* 2001; 69(7): 4516-4520.

**European Medicines Agency, Oficina de prensa.** European Medicines Agency recommends suspension of Hexavac. London: EMEA; 2005. (Doc. Ref. EMEA/297369/2005)

**Falk LA, Midthun K, McVittie LD, Goldenthal KL.** Testing and licensure of combination vaccines for the prevention of infectious diseases. En: Ellis RW, editor. *Combination vaccines: development, clinical research and approval.* New Jersey: Humana Press Inc; 1999, p: 233-248.

**Galazka AM, editor (a).** The immunological basis for immunization series. Module 2: Diphtheria. [monografía en Internet]. World Health Organization; 1993 [citado el 22 de septiembre de 2003]. Disponible en:

[http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-ibi-e/mod2\\_e.pdf](http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-ibi-e/mod2_e.pdf)

**Galazka AM, editor (b).** The immunological basis for immunization series. Module 4: Pertussis. [monografía en Internet]. World Health Organization; 1993 [citado el 22 de septiembre de 2003]. Disponible en:

[http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-ibi-e/mod4\\_e.pdf](http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-ibi-e/mod4_e.pdf)

**Galazka AM, editor (c).** The immunological basis for immunization series. Module 3: tetanus. [monografía en Internet]. World Health Organization; 1993 [citado el 22 de septiembre de 2003]. Disponible en:

[http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-ibi-e/mod3\\_e.pdf](http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-ibi-e/mod3_e.pdf)

**Giammanco G, Moiraghi A, Zotti C, Pignato S, Li Volti S, Giammanco et al.** Safety and immunogenicity of a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B vaccine administered according to two different primary vaccination schedules. *Vaccine.* 1998; 16 (7): 722-726.

**Gilks WR, Day N, Coursaget P, Yvonnet B, Hall AJ, Chotard J, et al.** Response to hepatitis B vaccination: some new insights. *Progress in Hep B Immunization*. 1990; 194: 409-418.

**Green SB.** Design of randomized trials. *Epidemiologic Reviews*. 2002; 24 (1): 4-11.

**Greenberg L, Fleming DS.** The immunizing efficacy of diphtheria toxoid when combined with various antigens. *Can J Public Health*. 1948; 39: 131-135.

**Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK.** Adjuvants -a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*. 1993; 11: 293-306.

**Hamilton JD.** Virus de la hepatitis. En: Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM, editores. *Zinsser microbiología*. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1994. p. 1387-1397.

**Hill GB, Willet HP.** Clostridium. En: Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM, editores. *Zinsser microbiología*. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1994. p. 861-889.

**Hodder SL, Mortimer EA Jr.** Epidemiology of pertussis and reactions to pertussis vaccine. *Epidemiol Rev*. 1992; 14:243-267.

**Jung MC, Rape GR.** Immunology of hepatitis B infection. *The Lancet*. 2002; 2: 43-50.

**Kane MA.** Clinical evaluation of HB vaccines as a component of combination vaccines. *Biologicals*. 1994; 22: 403-405.

**Kanra G, Cezhan M, Ecevit Z, Bogaerts H, De Grave D, Hauser P, Desmons P.** Primary vaccination of infants with a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 1995; 14: 998-1000.

**King AJ, Berbers G, van Oirschot HFLM, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR.** Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertusis* protein pertactin in immunity. *Microbiology* 2001; 147: 2885-2895.

**Klein SL.** Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Paras Immunol*. 2004; 26: 247-264.

**Kovarik J, Siegrist CA (a).** Optimization of vaccine responses in early life: The role of delivery systems and immunomodulators. *Immun & Cell Biol.* 1998; 76 (3): 222-232.

**Kovarik J, Siegrist CA (b).** Immunity in early life. *Trends Immunol Today.* 1998; 19 (4): 150-152.

**Mallet E, Belohradsky BH, Lagos R, Gothefors, Camier P, Carrière JP, et al.** A liquid hexavalent combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis, poliomyelitis, *Haemophilus influenzae* type B and hepatitis B: review of immunogenicity and safety. *Vaccine.* 2004; 22: 1343-1357.

**Martinetti M, De silvestri A, Belloni C, Pasi A, Tinellu C, Pistorio A, et al.** Humoral response to recombinant Hepatitis B virus vaccine at birth. *Clin Immunol.* 2000;97 (3): 234-240.

**Mast E, Mahony F, Kane M, Margolis H.** Hepatitis B vaccine. En: Plotkins SA, Oreinstein WA, editores. *Vaccines.* Philadelphia: Saunders; 2004, p: 299-337.

**Maung K, Aye M, Htay-Htay H, Safarz A, Bock H.** Comparison of separated and mixed administration of DTPw-HBV and Hib vaccines: immunogenicity and reactogenicity profiles. *Intern J Inf Dis.* 1997; 2 (3): 79-84.

**Midthun K, Finn T, Goldenthal K.** Combination vaccines: a regulatory perspective. *Second Advance Vaccinology Course;* 2001 May 29; Annecy, France.

**Mills E, Gold R, Thippawong J, Barreto L, Guasparini R, Meekison W et al.** Safety and immunogenicity of a combined five-component pertussis-diphtheria-tetanus-inactivated poliomyelitis -*Haemophilus b* conjugated vaccine administered to infants at two, four and six months of age. *Vaccine.* 1998; 16 (6): 576-585.

**Moraga FA, Campins M.** Vacunas combinadas en el calendario de inmunizaciones sistemáticas. Seguridad de las vacunas hexavalentes. *Ann Pediatr.* 2004; 60(5): 403-405.

**Muzio V, Pentón E.** El virus de la hepatitis B. En: Padrón GJ, editor. *Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales.* La Habana: Elfos Scientiae; 1998. p. 119-145.

**Offit PA, Hackett CJ.** Multiples vaccines and the immune system En: Plotkins SA, Oreinstein WA, editores. Vaccines. Philadelphia: Saunders; 2004. p: 825-861.

**Papaenvangelou G, Karvelis E, Alexiou D, Kiossoglou K, Roumeliotou A, Safary A, Collard F, Vandepapeliere P.** Evaluation of a combined tetravalent diphtheria, tetanus, whole-cell pertussis and hepatitis B candidate vaccine administered to healthy infants according to a three-dose vaccination schedule. Vaccine. 1995, 13 (2): 175-8.

**Pertussis vaccine s.** Wkly Epidemiol Rec [revista en internet]. 1999 May [citado el 3 de diciembre de 2005]; 74(18):137-143. Disponible en:

<http://www.who.int/wer/pdf/1999/wer7418.pdf>

**Pichichero ME, Passador S.** Administration of combined diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine, hepatitis B vaccine, and *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine in infants and response to a Booster dose of Hib conjugate vaccine. Clin Infect Dis. 1997; 25: 1378-1384.

**Plotkin SA.** Vaccination against the major infectious diseases. Life sciences. 1999; 322: 943-951.

**Poovorawan Y, Theamboonlers A, Sanpavat S, Pongpunlert W, Chumdermpadetsuk S, Safari A et al.** The immunogenicity and reactogenicity of combined tetravalent diphtheria, tetanus, pertussis, and hepatitis B vaccine in infants. Vir. Hepat. Liv. Dis. 1994: 526-529.

**Riedemann S, Reinhardt G, Jara J, Rios R, Wenzel MS, Willens P, et al.** Immunogenicity and reactogenicity of combined versus separately administered DTPw-HBV and Hib vaccines given to healthy infants at 2, 4 and 6 months of age, with booster at 18 months. Intern J Infect Dis. 2002; 6 (3): 215-222.

**Roduit C, Bozzoti P, Mielcarek, Lambert PH, del Giudice G, Locht C, et al.** Immunogenicity and protective efficacy of neonatal vaccination against *B. pertussis* in a murine model: evidency for early control of pertussis. Infect Immun. 2002; 70 (7): 3521-3528.

**Roitt I,** editor. Inmunología: fundamentos. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1997.

**Ross PJ, Lavelle EC, Mills KHG, Boyd AP.** Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to Promote Innate Interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infect Immun.* 2004; 72 (4): 1568–1579.

**Ryan M. McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KHG.** Pertussis toxin potentiates Th1 y Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD 28. *Int Immunol.* 1998; 10 (4): 651-662.

**Salgado-Velez H.** Manual de la inmunización humana. 1ª edición. Bogotá: Editora Médica colombiana; 2001.

**Salmaso S, Piscitelli A, Rapicetta M, Chionne P, Madonna E, Argentine C.** Immunogenicity of hepatitis B vaccines among infant recipients of acellular and whole cell pertussis DTP vaccines. *Vaccine.* 1998; 16 (6): 643-646.

**Sanz JC, Fernandez M, Sagues MJ, Ramirez R, Castaneda R, Barranco D, de Ory F.** Comparison of three ELISA techniques for the evaluation of IgG seroprevalence against *Bordetella pertussis* in children vaccinated with three doses of DTPwc. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002; 20(1):10-15.

**Siegrist CA.** Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine.* 2001; 19: 3331-3346.

**Shokrgozar MA, Shokri F.** Subtype specificity of antibodies produces by human B-cell lines isolated from normal individuals vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine.* 2002; 20 (17-18): 2215-2220.

**Smith AM, Guzman CA, Walker MJ.** The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microb Rev.* 2001; 25: 309-333.

**Soriano F y Fernández R (a).** Infecciones causadas por *Bordetella*, *Pasteurella* y *Francisella*. En: Farreras P, Rozman C, editores. 14 ed. España: Ediciones Harcourt; 2000. p. 2602-2605.

**Soriano F y Fernández R (b).** Infecciones causadas por *Corynebacterium* y bacterias difteromorfas. En: Farreras P, Rozman C, editores. 14 ed. España: Ediciones Harcourt; 2000. p. 2619-2621.

**Torradilla de Reynoso P, Piédrola G, Prat C y Vallés X.** Infecciones causadas por infecciones causadas por bacterias anaerobias esporuladas. En: Farreras P, Rozman C, editores. 14 ed. España: Ediciones Harcourt; 2000. p. 2632-2639.

**Van der Wielen M, Van Damme P, Van Herck K, Schlegel-Hauter S, Siegrist CA.** Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies in Flanders (Belgium). *Vaccine*. 2003; 21 (19-20): 2412-2417.

**Watanabe M, Komatsu E, Sato T, Nagai M.** Evaluation of efficacy in terms of antibody levels and cell-mediated immunity of acellular pertussis vaccines in a murine model of respiratory infection. *FEMS Immun Med Microb*. 2002; 33: 219-225.

**Wharton M, Vitek CR.** Diphtheria toxoid. En: Plotkins SA, Oreinstein WA, editores. *Vaccines*. Philadelphia: Saunders; 2004, p. 211-228.

**Wilfert CM.** Bordetella. En: Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM, editores. *Zinsser microbiología*. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1994. p.651-660.

**Willett HP.** Corynebacterium. En: Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM, editores. *Zinsser microbiología*. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1994. p. 670-683.

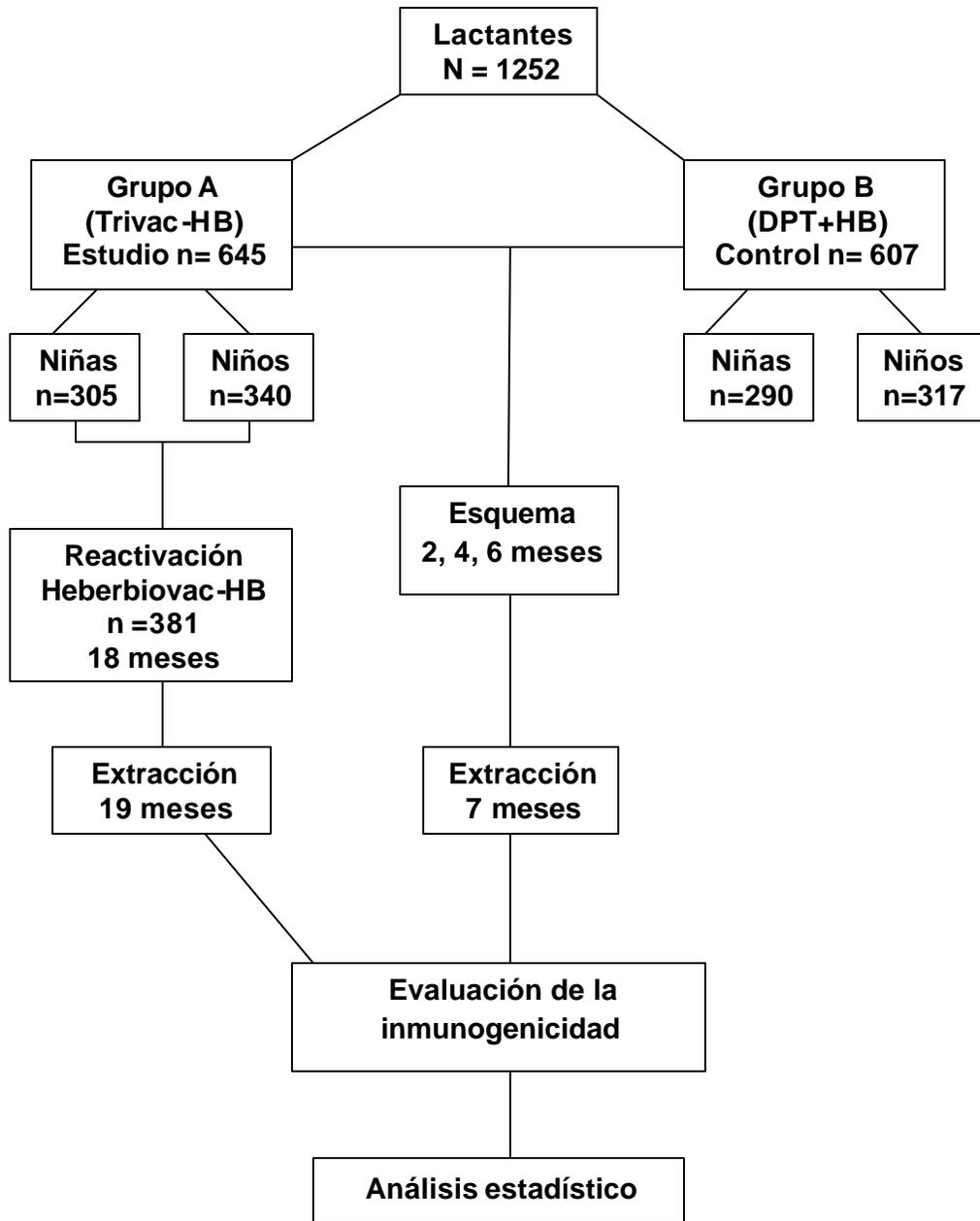
**Wittes J.** Sample size calculations for randomized controlled trials. *Epidemiologic Reviews*. 2002; 24 (1): 39-53.

**World Health Organization.** Informal consultation on quadrivalent diphtheria, tetanus, pertussis, Hepatitis B vaccine. Final report, WHO, Geneva, 7-8 May 1992, p.1-2.

**Yeh SH, Ward JI.** Strategies for development of combination vaccines. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20 Suppl 11: S5-9.

**Zepp F, Knuff M, Heininger U, Jahn K, Collard A, Habermehl, et al.** Safety, reactogenicity and immunogenicity of a combined hexa valent tetanus, diphtheria, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus vaccine and Haemophilus influenzae type B conjugate vaccine, for primary immunization of infants. *Vaccine*. 2004;(22): 2226-2233.

**Anexo1**  
**Flujograma de trabajo**



## Anexo 2 MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Seguridad y respuesta inmune de la vacuna combinada Trivac-HB

El que suscribe: \_\_\_\_\_

Conozco que:

La hepatitis B es una enfermedad causada por un virus que se transmite de la madre infectada al niño antes, durante o después del nacimiento, a través de la leche materna por transfusiones de sangre y derivados de la sangre contaminados, equipos médicos e instrumentales mal esterilizados, y a través de las relaciones sexuales. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son: fiebre, dolor de cabeza, manifestaciones digestivas como náuseas, vómitos, dolores abdominales, en ocasiones coloración amarilla de las mucosas, malestar general y sus complicaciones más peligrosas son hepatitis crónica, hepatitis fulminante, cirrosis hepática y cáncer del hígado.

La difteria, el tétanos y la tos ferina son enfermedades infecciosas que en nuestro país se encuentran erradicadas o en niveles sumamente bajo, gracias al programa de vacunaciones que realiza el MINSAP. Estas enfermedades pueden cursar sin síntomas, pero también pueden ser graves y causar la muerte.

Hago constar por este medio mi disposición y consentimiento informado para que mi hijo participe en el estudio "Seguridad y respuesta inmune de la vacuna combinada cubana DPT-Hepatitis B".

Declaro que he sido informado del objetivo del estudio, en el cual se unieron los antígenos de dos vacunas que existen en estos momentos contra las 4 enfermedades antes mencionadas y que se formarán 2 grupos, a los que se les aplicarán las vacunas originales contra estas enfermedades por separado y a un grupo se le aplicará la vacuna combinada antes mencionada.

Así mismo, se me han explicado también todas las ventajas que para nuestros hijos, la salud pública y nuestro país significaría contar con una vacuna combinada contra la hepatitis B, la difteria, el tétanos y la tos ferina, ya que esto permitiría vacunar contra las enfermedades antes expresadas aplicando una sola inyección a nuestros niños, que obviamente ahorraría recursos materiales, disminuiría el número de

visitas médicas que precisan los niños con la máxima eficacia operativa y se optimizaría el programa de vacunaciones de nuestro país.

Dejo constancia así mismo que conozco los riesgos de la participación de mi hijo y que puede ser asignado a cualquiera de los dos grupos de estudio y que en caso de que sufra alguna reacción adversa severa, se le prestará la atención médica adecuada y se le retribuirá por las leyes de seguridad social de nuestro país.

Doy mi consentimiento para que se le realice 1 extracción de sangre de 5 ml al mes de la tercera dosis de la vacuna.

De acuerdo a la valoración médica, mi hijo no presenta ninguno de los criterios de exclusión que a continuación se nombran para la admisión en esta investigación:

- enfermedad infecciosa aguda en el momento del estudio.
- cualquier otra enfermedad hepática.
- alergia al Tiomersal.
- tratamiento inmunosupresivo, corticoesteroides o enfermedades del sistema hematopoyético.
- haber sido vacunado contra la hepatitis B o la DPT.
- Alergia severa.

También he sido informado que podría retirar a mi hijo de la investigación en cualquier momento que así lo decida sin que por ello vaya ser motivo de perjuicio.

Para constancia de lo expuesto anteriormente firmo este documento en \_\_\_\_\_ provincia \_\_\_\_\_, el día \_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
Padre o madre

Firma.

**Anexo 3**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DOSIS DE REACTIVACION**

El que suscribe: \_\_\_\_\_

Se me ha explicado que:

De acuerdo con las prácticas internacionales más recientes, es conveniente que los niños que han recibido vacunas combinadas como la DPT-HB con la que se ha vacunado mi hijo, reciban una dosis de reactivación del componente de hepatitis B para reforzar su respuesta y para verificar si ha quedado protegido. Se necesitará obtener una muestra de sangre 1 mes después de realizada la reactivación, para todo lo cual doy mi consentimiento.

Firma del padre, madre o tutor,

Fecha \_\_\_\_\_