

Niveles de protección contra *Haemophilus influenzae* tipo b en niños, adolescentes y adultos cubanos

Cira Rodríguez-Pelier* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3920-0299>

Yaíma Zúñiga-Rosales** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9483-9971>

Bárbara Torres-Rives ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9729-5172>

Adonay Martínez-Perera ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0975-1639>

Dayannis María Cruz-Albelo ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2096-9129>

Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba.

Autor para correspondencia: yaimazunigarosales@gmail.com; cira@cngen.sld.cu

La concentración de los anticuerpos contra el polisacárido capsular polirribosilribitol fosfato del *Haemophilus influenzae* tipo b se considera un buen indicador serológico para evaluar protección contra la enfermedad invasiva. Existen pocos reportes que estudien la inmunidad serológica en Cuba. El objetivo general de este estudio fue determinar los niveles de protección séricos contra *Haemophilus influenzae* tipo b en niños, adolescentes y adultos cubanos, en una muestra de 575 individuos. Se cuantificó la concentración de IgG anti-polirribosilribitol fosfato de *Haemophilus influenzae* tipo b mediante un inmunoensayo enzimático estandarizado y validado en el laboratorio de inmunología del Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba. Se determinaron las concentraciones medias geométricas de anticuerpos y los niveles de protección frente a la enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* tipo b. La concentración media geométrica de IgG anti-polirribosilribitol fosfato fue de 1,94 µg/mL (IC95% 1,80; 2,08) y fue mayor en el grupo de 16 a 22 años. El porcentaje con protección de larga duración fue mayor para el sexo femenino que para el masculino (82,2% vs 71,4%; p=0,0339) entre los que poseían inmunidad natural. El grupo de sujetos nacidos en el periodo en que se vacunó con la vacuna conjugada cubana QUIMI-HIB® presentó concentraciones medias geométricas superiores (2,75 µg/mL, IC95% 2,00; 3,79). El 99,1% de los participantes presentó protección frente a la enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* tipo b, el 19,8% a corto plazo y el 79,3% protección de larga duración. El inmunoensayo validado para la cuantificación de IgG anti-polirribosilribitol fosfato podría emplearse en estudios de seroprevalencia. En los sujetos estudiados, se encontró un predominio de elevadas concentraciones de IgG anti-polirribosilribitol fosfato del *Haemophilus influenzae* tipo b que confieren protección de larga duración.

Palabras clave: estudio de validación; *Haemophilus influenzae* tipo b; estudios seroepidemiológicos; inmunoglobulina G; ELISA; Cuba.

Introducción

Con el desarrollo de vacunas conjugadas contra el *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), se ha logrado inducir la producción de mayores concentraciones de anticuerpos timo dependientes dirigidos específicamente contra el polisacárido capsular del Hib, aumentar la

activación de linfocitos T y una efectiva inducción de la memoria inmunológica, lo que se traduce en mejor inmunidad en las poblaciones vacunadas y disminución del número de portadores en la comunidad.⁽¹⁾

Aunque la vacunación ha producido una disminución significativa en las infecciones por Hib,⁽²⁾ estas aún se

* Licenciada en Bioquímica. MSc. en Genética Médica. Investigador Auxiliar. Profesor Asistente. Jefa del Departamento de Inmunología. Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba.

** Especialista de Primer Grado en Inmunología. Profesor Auxiliar. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba.

encuentran entre las causas de mortalidad infantil en menores de 5 años.⁽²⁾ Según el reporte anual del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), en 2018, se notificaron 3.982 casos de enfermedad invasiva por Hib, predominantemente en niños menores de 1 año y ancianos mayores de 65; siendo el serotipo b responsable del 7% de los casos.⁽³⁾

Este patógeno era el principal agente causal de meningitis bacteriana en Cuba en la década de los 90, por lo que se aplicó en 1999, por primera vez y de forma masiva, una vacuna conjugada contra el Hib a todos los nacidos entre enero de 1998 y octubre de 1999.^(1,4) Desde el año 2003, en que se registró la vacuna conjugada cubana obtenida por síntesis química (Quimi-Hib[®]),⁽⁵⁾ se han garantizado coberturas de vacunación contra Hib en menores de 1 año que oscilan entre el 95 y el 100%.⁽⁶⁾ A partir del 2006 se administra como uno de los componentes de la vacuna pentavalente (Heberpenta[®]-L).^(5,7) En la actualidad, un elevado porcentaje de la población cubana menor de 22 años está vacunada contra el Hib; logrando un impacto no solo en la disminución de la incidencia de enfermedades causadas por este patógeno, sino en la reducción de la tasa de portadores en las cohortes vacunadas con el consiguiente efecto de inmunidad poblacional.⁽⁸⁾

Desde hace años se reconoce el carácter protector de los anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular polirribosilribitol fosfato (PRP) del Hib;⁽⁸⁾ sus niveles en suero se consideran un buen indicador serológico para evaluar la presencia o no de inmunidad contra la enfermedad invasiva.⁽⁹⁾ Se ha establecido que una concentración de dichos anticuerpos inferior a 0,15 µg/mL brinda una protección insuficiente, valores entre 0,15 y 1 µg/mL logran protección a corto plazo, mientras que valores superiores a 1,0 µg/mL indican protección a largo plazo adquirida por inmunidad natural o después de la vacunación.⁽⁹⁾

Aun cuando el impacto de la vacunación preventiva contra Hib en Cuba es evidente, con una disminución de la incidencia de meningoencefalitis por Hib de 1,3 por 100.000 habitantes en 1998⁽⁴⁾ a 0,2 por 100.000 habitantes en 2019,⁽⁶⁾ existen pocos reportes que estudien la inmunidad serológica en el país, por lo que en este trabajo nos propusimos como objetivo

determinar los niveles de protección contra Hib en niños, adolescentes y adultos cubanos y validar el ELISA para cuantificar IgG anti-PRP Hib desarrollado en el Centro Nacional de Genética Médica.

Materiales y Métodos

Antígeno

El antígeno utilizado en la fase sólida fue el PRP sintético de Hib, producido por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba.

Suero estándar

El suero utilizado como estándar secundario en la técnica se preparó a partir de la mezcla de sueros de donantes de sangre, a los cuales se les cuantificó la concentración de anticuerpos IgG anti-PRP del Hib mediante el ensayo VaccZymeTM Human Anti-Hib Enzyme Immunoassay Kit (Code: MK016, Binding Site, Reino Unido). Se obtuvieron 3 mezclas que fueron referenciadas contra el estándar internacional: *First WHO International Standard for PRP (coded 02/208)*.⁽¹⁰⁾ Se escogió la mezcla de mayor concentración para el estándar secundario y las demás se utilizaron como controles para la evaluación del ensayo.

Ensayo experimental

Se colocaron 100 µL de antígeno diluido con amortiguador fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate-Buffered Saline*) 0,15 M, pH 7,2 al 1% en cada pozo de placas de poliestireno de 96 pocillos. Tras una incubación de 1 h a temperatura de 22°C, se lavó tres veces con 200 µL de solución de lavado (PBS más 0,05% v/v de Tween 20) en un sistema automático. Los sueros fueron diluidos a 1/100 con solución diluyente: PBS + albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, EUA) al 0,1% y se incubaron 100 µL/pocillo durante 30 min a 22°C. Se realizaron los correspondientes tres lavados. Posteriormente se añadió 100 µL de anticuerpos anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés, Dako Dinamarca), diluido 1/12.000 con la solución diluyente y se incubó a 22°C durante 30 min.

Después de esta reacción se repitieron tres lavados. Se reveló con 100 µL de ortofenilendiamina (OPD por sus siglas en inglés, Sigma, EUA) diluida en buffer citrato fosfato, pH 5,0. La reacción final se detuvo con ácido sulfúrico 2N. La lectura de la densidad óptica (DO) se realizó mediante un lector de placa (Tecnosuma) a 492 nm. Los valores de DO se transformaron en valores de concentración mediante el programa ELISA for Windows del Centro para el Control de las Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia, EUA.⁽¹¹⁾

Parámetros de validación

Precisión

Se evaluó determinando la concentración de anti-PRP del Hib a seis muestras de suero. Se realizaron evaluaciones por triplicados en tres ensayos, en las diferentes placas utilizadas. Para expresar las variaciones intra e interensayos, se utilizó el coeficiente de variación (CV).⁽¹²⁾

Exactitud

Se analizó través de un ensayo de recuperación realizado en las tres placas utilizadas, con seis diluciones dobles seriadas de una muestra de concentración conocida (suero estándar) a la que se le calculó la concentración de anticuerpos anti-PRP. La exactitud se expresó como el porcentaje entre el valor obtenido y el valor esperado en cada muestra: (valor obtenido/valor esperado] x 100.⁽¹²⁾

Especificidad

La especificidad se evaluó por el método de adición al patrón, ensayando muestras que contenían componentes estructuralmente cercanos al analito, como anticuerpos anti IgG factor reumatoide (FR), anti DNA y anti toxina tetánica y otros que pudieran interferir en los resultados, tales como lípidos y monoglicéridos. Se añadió a cada muestra cantidades conocidas del suero estándar a tres niveles de concentración previamente conocidas. Se calculó la recuperación entre el valor obtenido en el ensayo y el esperado. Se consideró una adecuada recuperación cuando los valores estuvieron entre 90-110%.⁽¹²⁾

Evaluación de la curva de calibración del método

Para analizar el comportamiento lineal de la curva se realizó un ensayo para comparar el paralelismo o dilución de la curva patrón con cuatro muestras de concentraciones dentro del rango de trabajo de la curva, en las diferentes placas utilizadas en el ensayo. Como criterio de aceptación de la linealidad se considera $R^2 > 0,98$.⁽¹²⁾

Límite de detección

Para su análisis se seleccionaron 48 replicados del blanco reactivo utilizado en diferentes placas durante la validación. A la concentración mínima calculada por el software “*ELISA for Windows*” se le determinó la suma de la media (X), más dos desviaciones estándar (SD): (LD=XB+2DS).⁽¹²⁾

Límite de cuantificación

Se determinó por la mínima concentración del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable, bajo las condiciones experimentales establecidas, esta correspondió al valor promedio del blanco más 2DS.⁽¹²⁾

Correspondencia entre el ELISA y el método de referencia

Se evaluó la correlación entre métodos, mediante la cuantificación del nivel de IgG anti-PRP a 27 muestras de suero con el ELISA desarrollado y un método de referencia con características similares. El ensayo comercial empleado fue VaccZyme™ *Haemophilus influenzae* type b Enzyme Immunoassay Kit (Binding Site, Birmingham, UK), ELISA indirecto para cuantificar anticuerpos IgG antiP-RP del Hib.

Aplicación técnica

Se realizó un estudio analítico descriptivo en 575 muestras de sueros humanos recibidas en el laboratorio de inmunología del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), La Habana, Cuba, en el periodo 2019-2020, procedentes de todas las provincias del país

Para el análisis de las variables: concentración de IgG anti-PRP del Hib y nivel de protección contra Hib, las

muestras estudiadas se dividieron según sexo (femenino y masculino) y edad como se muestra a continuación:

Grupo 1: de 0 a 5 años

Grupo 2: de 6 a 15 años

Grupo 3: de 16 a 22 años

Grupo 4: de 23 a 59 años

Grupo 5: Adultos de 60 a 96 años

Teniendo en cuenta el inicio de la vacunación contra Hib en Cuba en el año 1999 y que en esta se incluyeron todos los menores de 2 años,^(4,6) se consideraron dos grupos para el análisis:

- Alta cobertura de vacunación contra Hib: se incluyeron los nacidos entre 1998 y 2020 (0 – 22 años).
- No vacunados contra Hib (inmunidad natural): se incluyeron los nacidos antes de 1998 (23 a 96 años).

A su vez, considerando los principales cambios en las vacunas conjugadas empleadas en el país,^(3,4) el grupo de alta cobertura de vacunación se dividió en tres grupos según año de nacimiento:

- 1998 – 2002: uso en el país de vacuna conjugada importada.
- 2003 – 2005: uso en el país de vacuna conjugada cubana QUIMI-HIB[®].⁽⁵⁾
- 2006 – 2020: se incluyó la inmunización contra Hib con la vacuna pentavalente Heberpenta[®].⁽⁷⁾

La concentración de IgG contra el PRP del Hib (anti-PRP) se informó en $\mu\text{g/mL}$. Según el valor de dicha

concentración se determinó el nivel de protección o inmunidad individual frente a enfermedad invasiva por Hib, como se plantea en la literatura.^(1,8,9)

Se excluyeron aquellas muestras de pacientes menores de 7 meses por no haber concluido el esquema de vacunación y las de los que el resumen de historia clínica planteaba infección reciente o aguda, antecedentes de infecciones recurrentes, diagnóstico confirmado de inmunodeficiencia, o haber recibido tratamiento inmunoestimulante o inmunosupresor en los últimos 6 meses. En el caso de los adultos se excluyeron casos con antecedentes de asplenia, anemia falciforme, VIH/SIDA, esplenectomía o trasplante de médula ósea, por lo cual podrían haber recibido la vacuna.

La distribución normal de la muestra se comprobó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se calcularon las concentraciones medias geométricas (CMG) de IgG y sus intervalos de confianza (IC) al 95%. Las CMG entre los diferentes grupos de edades y sexo se compararon usando la Prueba t de Student de dos colas. Para todas las comparaciones se consideró un error de primer tipo $\alpha=0,05$. Para el análisis de diferencia de proporciones se empleó el MedCalc que emplea el test de Chi-cuadrado “N-1” para evaluar las diferencias y para el cálculo del intervalo de confianza, las recomendaciones de Altman y colaboradores.⁽¹³⁾ Para el análisis estadístico se utilizó el paquete IBM SPSS STATISTICS 22. Los gráficos se realizaron empleando el sistema GraphPad Prism.⁽⁷⁾

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación aprobado por el comité de ética del CNGM. Se obtuvo el consentimiento de todos los

Tabla 1. Especificidad del ELISA para la cuantificación de IgG anti-PRP del Hib.

Muestras	Valor esperado ($\mu\text{g/mL}$)	Valor obtenido ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperación (%)
1	5,40	4,98	104,8
2	5,40	5,55	102,7
3	5,40	4,73	87,6
4	5,40	4,95	91,6
5	5,40	5,59	103,5
6	2,75	2,66	96,7

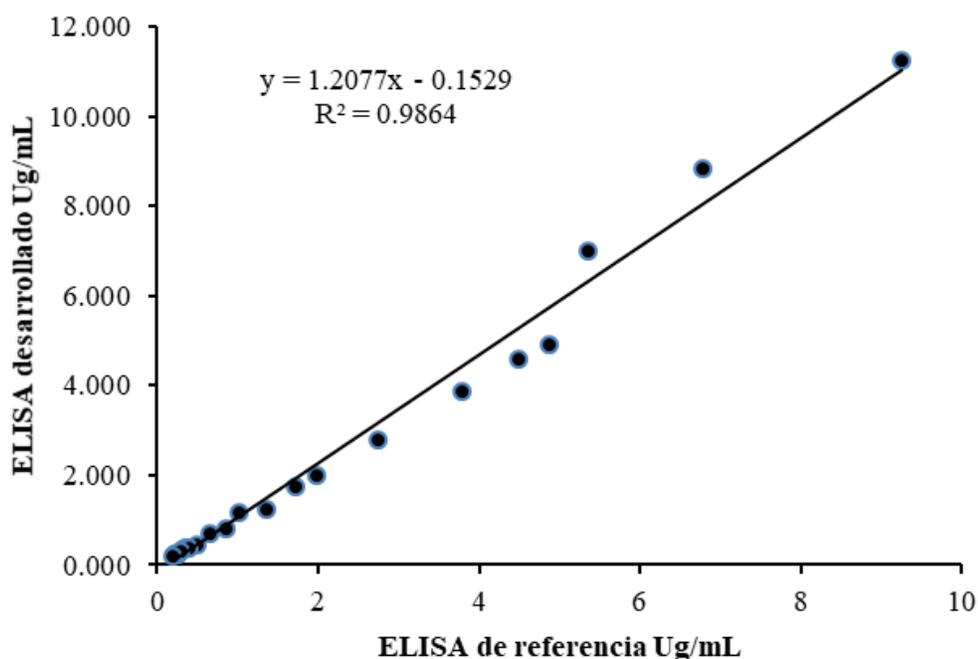


Fig. 1. Análisis de regresión lineal entre los valores de concentración de IgG anti-PRP del Hib obtenidos por el ELISA desarrollado y el ELISA de referencia en 27 muestras de suero.

individuos incluidos y de sus tutores legales en el caso de los menores de edad.

Resultados

El desarrollo técnico del ensayo mostró en todas las placas utilizadas una precisión y exactitud adecuada con un coeficiente de variación menor del 10% y una recuperación entre 90 y 110%.

El analito en el suero estándar y en las muestras presentó un comportamiento similar en todos los casos,

demonstrando la independencia entre el valor de la concentración de cada muestra de la dilución de trabajo empleada.

El estudio de especificidad mostró valores de recuperación aceptables (90-110%) para cinco de las seis muestras estudiadas (Tabla 1).

Con el rango de trabajo seleccionado de la curva, el método permitió cuantificar valores de concentración entre 0,06 y 6,00 $\mu\text{g/mL}$, con un límite de detección de 0,046 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 2. Concentración de anticuerpos IgG contra el PRP del *Haemophilus influenzae* tipo b según edad.

Grupo de edades	N	CMG	IC95%
0-5 años	114	1,89	1,56 – 2,29
6-15 años	64	1,69	1,28 – 2,24
16-22 años	60	2,44	1,77 – 3,38
23-59 años	277	1,96	1,78 – 2,15
60-96 años	60	1,68	1,40 – 2,01
Total	575	1,94	1,80 – 2,08

N: total de casos. CMG: concentración media geométrica. IC95%: intervalo de confianza al 95% de la media geométrica: límite inferior – límite superior.

Se encontró una buena correspondencia en los resultados de concentración en las 27 muestras estudiadas por el ELISA desarrollado y el ELISA de referencia: el 88% de los resultados correlacionaron ($r=0.886$ $p=0.01$) (Fig. 1).

La concentración de IgG anti-PRP en las 575 muestras estudiadas fue variable, con un rango de 0,01 a 18,72 $\mu\text{g/mL}$, un valor promedio de 2,78 $\mu\text{g/mL}$ (IC95% 2,58; 2,98) y una CMG de 1,94 $\mu\text{g/mL}$ (IC95% 1,80; 2,08) (Tabla 2). Solo una muestra (0,17%) tuvo ausencia total de IgG anti-Hib y cuatro (0,70%) mostraron una concentración de IgG inferior o igual a 0,15 $\mu\text{g/mL}$ correspondiente a un nivel de protección insuficiente; de estas cinco muestras, cuatro correspondieron al sexo masculino y todas al grupo de menos de 22 años (Fig. 2). El 99,1 % de las muestras estudiadas presentaron concentraciones de anticuerpos IgG anti-Hib que confieren protección frente a la enfermedad invasiva por Hib, el 19,8% protección a corto plazo, mientras que el 79,3% (456/575) mostró concentraciones superiores a 1 $\mu\text{g/mL}$, para un nivel de protección de larga duración (Fig. 2).

Aunque en todos los grupos de edad las CMG están por encima de 1 (Tabla 2), el de 16 a 22 años presentó concentraciones de IgG superiores, con diferencias significativas con los otros cuatro grupos, encontrándose la mayor diferencia con el de 60 a 96 años ($p=0,00048$) y la menor con el de 0 a 5 años ($p=0,05616$). Estas mayores concentraciones de anticuerpos específicos en este grupo etario se observaron en ambos sexos (Fig. 3A). De igual manera, el porcentaje de sujetos en el grupo de 16 a 22 años con protección de larga duración (95%) fue significativamente superior (diferencia 17,5%, IC95% 8,2%; 22,5%, $p=0,0016$) a la observada en el resto de los grupos etarios (77,5%), con valores entre 71,1% y 79,8% (Fig. 2).

La CMG de IgG anti-PRP de Hib de las 366 muestras del sexo femenino fue de 1,98 $\mu\text{g/mL}$ (IC95% 1,83; 2,15), ligeramente superior a la de las 209 muestras del sexo masculino 1,86 $\mu\text{g/mL}$ (IC95% 1,61; 2,15), sin diferencias significativas. Asimismo, fue ligeramente superior para el sexo femenino que en el masculino en los grupos de 6 a 15 años (2,56 vs 1,61 $\mu\text{g/mL}$) y 23 a

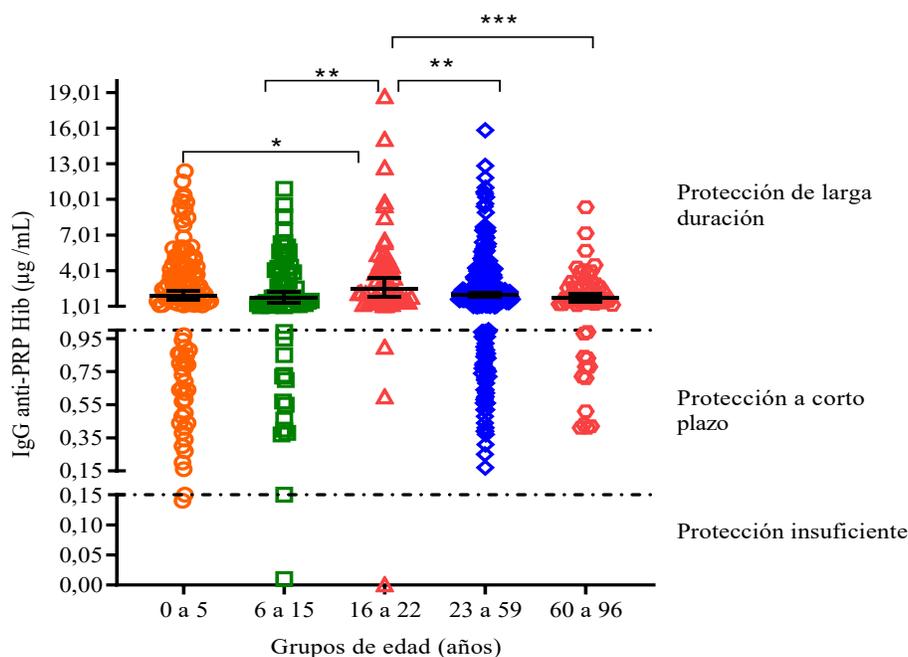


Fig. 2. Concentración de IgG anti-PRP de Hib y niveles de protección frente a enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* tipo b según edad, Cuba, 2019-2020. IgG anti-PRP Hib: concentración de anticuerpos IgG contra el PRP del *Haemophilus influenzae* tipo b. Las líneas representan la media geométrica y su intervalo de confianza al 95%.

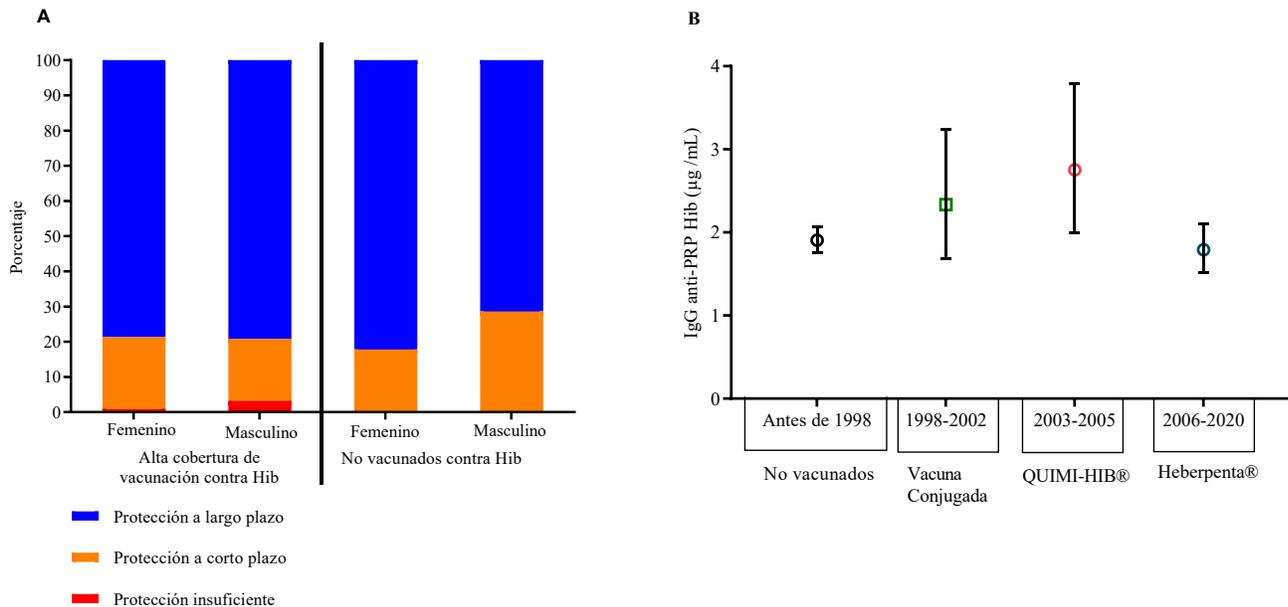


Fig. 3. Comparación de la protección frente a *Haemophilus influenzae* tipo b en población con alta cobertura de vacunación y no vacunados en Cuba. Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b; IgG anti-PRP Hib: concentración de anticuerpos IgG contra el polirribosilribitol fosfato del *Haemophilus influenzae* tipo b. 3A. Niveles de protección frente a enfermedad invasiva por Hib según sexo en población con alto porcentaje de vacunados respecto a no vacunados. 3B. Concentración de IgG contra el Hib en población no vacunada y en población con altas coberturas de vacunación. Esta última se ha dividido en tres subpoblaciones según las diferentes vacunas conjugadas empleadas en el país desde el inicio de la vacunación en Cuba: vacuna conjugada importada, vacuna conjugada cubana QUIMI-HIB® y como parte de la vacuna combinada Heberpenta®. Los símbolos representan la concentración media geométrica de IgG anti-Hib y las líneas su intervalo de confianza al 95%.

59 años (2,08 vs 1,64 µg/mL) y presentó valores muy semejantes entre sexos en los grupos de 16 a 22 años (2,59 µg/mL) y 60 a 96 años (1,68 vs 1,66 µg/mL); el único grupo de edad en que resultó mayor en el masculino que en el femenino (2,01 vs 1,72 µg/mL) fue el de 0 a 5 años. Ninguna de estas diferencias fue significativa.

Al comparar los niveles de protección contra enfermedad invasiva por Hib de los sujetos nacidos antes del inicio de la vacunación contra Hib en Cuba (no vacunados) y que, por tanto, adquirieron inmunidad por contacto natural con el patógeno, con el grupo con una alta cobertura de vacunación (Fig. 3) encontramos en ambos, elevados porcentajes de protección (100% vs 97,9%) y en particular de protección de larga duración (79,5% vs 79%). Dentro del grupo con alta cobertura de vacunación no se encontraron diferencias entre sexos en el porcentaje con protección de larga duración (78,8%

para el femenino y 79,2% para el masculino), sin embargo, entre los no vacunados este fue mayor para el sexo femenino que para el masculino (82,2% vs 71,4%; $p=0,0339$) (Fig. 3A). Si bien las CMG de IgG anti-Hib y el límite inferior de sus IC95% en los grupos analizados (Fig. 3B) son superiores a 1 µg/mL, se encuentran valores superiores en aquellos nacidos entre 2003 y 2005, periodo en que se utilizó la vacuna conjugada cubana QUIMI-HIB® (2,75 µg/mL, IC95% 2,00; 3,79), esta diferencia fue significativa en comparación con el grupo no vacunado (1,91 µg/mL, IC95% 1,75; 2,07, $p=0,02$) y el que recibió la vacuna combinada Heberpenta®-L (1,79 µg/mL, IC95% 1,52; 2,11, $p=0,04$).

Discusión

Existen varias investigaciones que demuestran que la cuantificación de anticuerpos séricos contra el PRP es

útil para determinar el nivel de inmunidad o protección frente a la enfermedad invasiva por Hib.^(9,14) Los sistemas ELISA han constituido una alternativa eficiente para la determinación y cuantificación de estos anticuerpos. El método desarrollado en el laboratorio de inmunología del CNGM demostró cumplir los parámetros establecidos de precisión, exactitud, linealidad, especificidad, así como adecuada correlación con el kit comercial VaccZyme™ *Haemophilus influenzae* type b, por lo que puede emplearse para conocer los niveles de anticuerpos IgG contra el polisacárido capsular del Hib.

Según los resultados mostrados en el estudio “Experiencia cubana en inmunización, 1962–2016”,⁽⁴⁾ la introducción de vacunas conjugadas para la inmunización frente a Hib en el programa nacional de vacunación en Cuba, logró la disminución de la morbimortalidad y la aparición de enfermedad invasiva asociada a este patógeno. Los resultados obtenidos en nuestra investigación demuestran la alta prevalencia de inmunidad contra el Hib en los sujetos estudiados (99,1%) y que predominan los niveles de protección a largo plazo (79,3%), lo cual plantea un escenario en que se ha logrado la inmunidad poblacional, disminuyendo los portadores asintomáticos de este patógeno y, por tanto, con posibilidades potenciales de proteger a aquellos individuos que tengan niveles de IgG anti-Hib insuficientes para garantizar su protección contra la enfermedad invasiva.

Las cinco muestras que presentaron concentración de anticuerpos $\leq 0,15 \mu\text{g/mL}$ correspondieron a menores de 22 años, población con una alta cobertura de inmunización frente a Hib, pues la inmunización en Cuba ha abarcado a todos los nacidos desde 1998. Las coberturas anuales de inmunización con vacunas conjugadas contra Hib en Cuba han sido elevadas, oscilando entre el 95 y el 100% desde 1999 hasta el año 2020 con excepción de los años 2000 que fue del 74% y el 2002 que fue del 80,2%.⁽⁶⁾ En un estudio realizado por el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, en 23 aislamientos recuperados entre 2008 y 2011 de enfermedades invasivas de Hib en Cuba, el 90,4% de los serotipables correspondió al serotipo b, alertando sobre

la necesidad de identificar fallos vacunales.⁽¹⁵⁾ En la literatura se ha reportado la no respuesta de anticuerpos a la vacunación fundamentalmente asociada con factores como la prematuridad, enfermedades malignas, retardo en el desarrollo, Síndrome de Down e inmunodeficiencias;^(9,15) en la revisión de los resúmenes de historia clínica de los sujetos incluidos no se encontraron estos antecedentes, y aquellos con diagnóstico confirmado de inmunodeficiencia fueron excluidos. No podemos afirmar que la totalidad de los casos incluidos en este grupo hayan recibido las tres dosis de vacuna anti-Hib, pues no se contó con esta información.

El grupo de 16 a 22 años mostró las mayores concentraciones de IgG anti-Hib y un porcentaje significativamente superior de sujetos con protección de larga duración. Entre los posibles factores que podrían influir en este resultado está que en este grupo se incluyen aquellos nacidos durante las etapas en que el esquema de inmunización incluyó las vacunas conjugadas Vaxem-Hib® y QuimiHib®,⁽⁵⁾ a lo que se une la posibilidad de haber tenido contacto de forma natural con el patógeno durante su infancia temprana, sobre todo en los casos de 21 a 22 años, pues en el año 1998 la incidencia de la meningitis por Hib era de $33,9 \times 10^5$ habitantes en menores de 1 año y de $10,7 \times 10^5$ habitantes en el grupo de 1 a 5 años.⁽⁶⁾

No se encontraron diferencias en las CMG de IgG anti-PRP entre los sexos, ni en el análisis por grupos de edad, ni en el grupo con alta cobertura de vacunación. Sin embargo, en aquellos no vacunados y que desarrollaron inmunidad natural se encontró una mayor proporción de sujetos protegidos a largo plazo en el sexo femenino que en el masculino. Estudios realizados en la población de Arabia Saudita encontraron que la edad y el sexo no tienen ningún efecto sobre la respuesta de anticuerpos IgG anti-PRP en individuos sanos inmunizados por vacunas.^(9,14) Aunque en la mayoría de los artículos revisados no se reporta diferencia en la respuesta de anticuerpos entre sexos, se ha planteado que la tasa de ataque de la bacteria es de 1,2 a 1,5 mayor en el sexo masculino que en el femenino.⁽¹⁶⁾

El elevado nivel de protección alcanzado entre la población no vacunada puede relacionarse con una mayor circulación en el país del Hib antes del inicio de la vacunación, lo que produjo inmunidad natural frente al mismo. Tras la vacunación masiva en 1987 contra el meningococo, el Hib comenzó a ser la principal causa en Cuba de meningoencefalitis bacteriana hasta 1999,^(1,4) año en que se introduce la vacunación y se logra un impacto positivo.^(4,7)

El diseño de esta investigación no evalúa directamente la respuesta a la vacunación contra Hib, sin embargo, teniendo en cuenta el acceso universal y gratuito en Cuba a los servicios de vacunación, la aplicación de un único programa de inmunizaciones en el país,⁽⁴⁾ así como el reporte anual de las coberturas de vacunación,⁽⁶⁾ fue posible hacer un análisis estratificando las poblaciones estudiadas en los grupos de no vacunados y con alta cobertura de vacunación, así como según los diferentes tipos de vacunas empleadas. Aunque con una CMG de IgG anti-PRP mayor de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, llama la atención la menor concentración en el grupo de sujetos nacidos entre los años 2006 y 2020 que en el resto de los grupos y, en particular, respecto al grupo nacido entre 2003 – 2005 que muestra los mayores valores. En el año 2006 en Cuba, se registra e incluye en el Programa Nacional de Inmunización la vacuna Heberpenta^{®(7)} (vacuna combinada contra la difteria, tétanos, tos ferina, hepatitis B y Hib), que incluye antígeno de superficie del virus de hepatitis B, anatoxina diftérica, anatoxina tetánica, células enteras e inactivadas de *Bordetella pertussis* y conjugado de PRP sintético de Hib. Si bien el uso de vacunas combinadas tiene numerosas ventajas como la disminución del número de inyecciones y los riesgos asociados a este proceder, menor costo y garantizar mayores coberturas,⁽⁴⁾ la aplicación de varios inmunógenos al unísono podría establecer una “competencia” entre estos y modificar la respuesta a cada uno de ellos, probablemente el de mayor inmunodominancia logrará una mejor respuesta. De igual manera, la respuesta ante el PRP en vacunas combinadas podría afectarse por las posibles interacciones entre el conjugado y otros antígenos o limitaciones en la presentación antigénica.^(4,9) Sin embargo, varios autores han encontrado respuestas robustas contra el PRP tras su

administración en vacunas combinadas.^(17,18) En un estudio realizado en Japón se encontró menor seroprotección en los que recibieron vacuna combinada al considerar valores de anticuerpos anti-PRP $\geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$; esta diferencia no se encontró al considerar concentraciones seroprotectoras de anti-PRP $\geq 0,15\mu\text{g}/\text{mL}$.⁽¹⁹⁾ Otros autores han encontrado menores títulos de anticuerpos anti-PRP tras la administración de la vacuna contra Hib como parte de formulaciones multivalentes o combinadas.^(20,21) Sin embargo, se ha planteado que aunque las concentraciones de anticuerpos anti-PRP pueden ser menores tras el uso de vacunas combinadas, la magnitud de la respuesta alcanzada es suficiente para conferir protección.⁽²²⁾

La mayor CMG de IgG anti-PRP observada en el grupo de inmunizados entre 2003-2005 correspondiente a la aplicación de la vacuna cubana conjugada obtenida por síntesis química (Quimi-Hib) coincide con la alta prevalencia de anticuerpos tras 12 meses de inmunización con esta vacuna.⁽¹⁶⁾ En el presente estudio, en este grupo en particular, esta respuesta de IgG se midió entre 15 y 17 años tras recibir la inmunización, pues la toma de muestra se realizó entre 2019 y 2020, lo que demuestra la existencia de una buena respuesta a largo plazo.

Sería de utilidad ampliar esta investigación con una muestra de mayor tamaño y que incluya información precisa sobre la vacunación contra Hib de cada sujeto evaluado. Una particularidad de este estudio es que mide respuesta a largo plazo, tanto para los no inmunizados como los que forman parte de la población con alta cobertura de vacunación, pues en esta última, con excepción de los menores de 3 años, el resto se evalúa tras haber transcurrido entre 1 y 20 años del completamiento del esquema de vacunación.

Conclusiones

En los sujetos estudiados, se encontró un predominio de elevadas concentraciones de IgG anti-PRP del Hib que confieren protección a largo plazo contra enfermedad invasiva por Hib en Cuba. El ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG anti-PRP del Hib,

desarrollado y validado en el laboratorio de inmunología del CNGM, podría ser de utilidad para el desarrollo de estudios de seroprevalencia frente a Hib.

Conflicto de Intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Cira Rodríguez-Pelier: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, administración del proyecto, visualización, redacción – borrador original, redacción – revisión y edición.

Yaíma Zúñiga-Rosales: conceptualización, análisis formal, investigación, metodología, visualización, redacción – borrador original, redacción – revisión y edición.

Bárbara Torres-Rives: análisis formal, investigación.

Adonay Martínez-Perera: investigación.

Dayamnis María Cruz-Albelo: investigación.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Ramos-Rodríguez A, Guzmán-Sánchez MV, Molina-Castro R, Bouza-Figueroa J. Análisis de la investigación mundial sobre vacunas conjugadas con la plataforma BD-BiP. *VacciMonitor*. 2020; 29(2):68-74. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/vaccimonitor/vcm-2020/vcm202e.pdf>. (Consultado en línea: 3 enero 2022).
2. Asociación Española de Pediatría (AEP). Manual de vacunas en línea de la Asociación Española de Pediatría. Madrid: AEP; 2019. Disponible en: https://vacunasaep.org/sites/vacunasaep.org/files/manual_de_vacunas_en_linea_de_la_aep.pdf. (Consultado en línea: 3 enero 2022).
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Haemophilus influenzae - Annual Epidemiological Report for 2018*. Solna: ECDC; 2018.

Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/haemophilus-influenzae-annual-epidemiological-report-2018>. (Consultado en línea: 3 enero 2022).

4. López L, Egües LI, Pérez A, Galindo BM, Galindo MA, Resik S, et al. Experiencia cubana en inmunización, 1962–2016. *Rev Panam Salud Pública*. 2018; 42:e34. doi: <https://10.26633/RPSP.2018.34>.

5. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y dispositivos médicos (CECMED). *Vacuna Quimi-Hib® (Vacuna conjugada contra el Haemophilus Influenzae tipo b)*. La Habana: CECMED; 2003. Disponible en: <http://www.cecmed.cu/file/8094/download?token=oQ-7hVpW>. (Consultado en línea: 3 enero 2022).

6. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud del Ministerio de Salud Pública de Cuba. *Anuario estadístico de salud 2019*. La Habana: MINSAP; 2020. Disponible en: <http://files.sld.cu/bvscuba/files/2020/05/Anuario-Electr%C3%B3nico-Espa%C3%B1ol-2019-ed-2020.pdf>. (Consultado en línea: 17 febrero 2022).

7. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y dispositivos médicos (CECMED). *Registro Heberpenta®. Vacuna combinada contra la difteria, tétanos, tos ferina, hepatitis B y Haemophilus influenzae tipo b*. La Habana: CECMED; 2013. Disponible en: https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/rcp/biologicos/rcp_heberpenta_2013-12-16.pdf. (Consultado en línea: 17 febrero 2022).

8. Zarei AE, Almehdar HA, Redwan EM. Hib Vaccines: Past, Present, and Future Perspectives. *J Immunol Res*. 2016; 2016: Article ID 7203587. doi: <https://10.1155/2016/7203587>.

9. Zarei AE; Redwan EM. Antibodies prevalence against *Haemophilus influenzae* type b in Jeddah population, Saudi Arabia. I. Total Antibodies. *Hum Antibodies*. 2018; 26(4):225-35. doi: <https://10.3233/HAB-180342>.

10. Mawas F, Bolgiano B, Rigsby P, Crane D, Belgrave D, Corbel MJ. Evaluation of the saccharide content and

- stability of the first WHO International Standard for *Haemophilus influenzae* b capsular polysaccharide. *Biologicals*. 2007;35(4):235-45. doi: <https://10.1016/j.biologicals.2007.01.003>.
11. Plikaytis BD, Carlone GM. Program ELISA for Windows User's Manual, version 2. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2005.
 12. Ochoa RF. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. La Habana: Finlay Ediciones; 2013.
 13. www.medcalc.org [homepage on the internet]. Ostend: MedCalc Software Ltd; c2021-28. Disponible en https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php. (Consultado en línea: 28 julio 2021).
 14. Zarei AE; Linjawi MH; Redwan EM. Circulating innate and adaptive immunity against anti-*Haemophilus influenzae* type b. *Hum antibodies*. 2019;27(3):201-12. doi: <https://10.3233/HAB-190373>.
 15. Angulo G, Severo V, Soriano V, Rosa R, Vargas L. Fallos vacunales a vacunas conjugadas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b [monografía Internet]. Montevideo: Universidad de La República Facultad de Medicina; 2015. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12008/19453>. (Consultado en línea: 28 julio 2021).
 16. Torano Peraza GT. Respuesta de anticuerpos séricos frente a una vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b obtenida por síntesis química [Tesis para optar por el grado científico de Doctora en Ciencias de la salud]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2009.
 17. Capeding MR, Alberto E, Versteilen A, Rauscher M, Bagchi P, Palacios PI. Comparison of the immunogenicity and safety of pentavalent vaccine Quinvaxem in a compact prefilled auto-disabled (cPAD) injection system versus single-dose vials in healthy infants: a phase 3, open-label, randomized, parallel-group, non-inferiority study. *Int J Infect Dis*.2016; 46: 71-8. doi: <https://10.1016/j.ijid.2016.02.015>.
 18. Klein NP, Abu-Elyazeed R, Cheuvart B, Janssens W, Mesaros N. Immunogenicity and safety following primary and booster vaccination with a hexavalent diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b vaccine: a randomized trial in the United States. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(4):809-21. doi: <https://10.1080/21645515.2018.1549449>.
 19. Nakayama T, Vidor E, Tsuzuki D, Nishina S, Sasaki T, Ishii Y, et al. Immunogenicity and safety of a DTaP-IPV/Hib pentavalent vaccine given as primary and booster vaccinations in healthy infants and toddlers in Japan. *J Infect Chemother*. 2020;26(7):651-9. doi: <https://10.1016/j.jiac.2019.11.012>.
 20. Eskola J, Ward J, Dagan R, Goldblatt D, Zepp F, Siegrist CA. Combined vaccination of *Haemophilus influenzae* type b conjugate and diphtheriatetanus-pertussis containing acellular pertussis. *Lancet*.1999; 354:2063–8.
 21. Gabutti G, Zepp F, Schuerman L, Dentico P, Bamfi F, Soncini R, et al. Evaluation of the immunogenicity and reactogenicity of a DTPa-HBV-IPV Combination vaccineco-administered with a Hib conjugate vaccine either as a singleinjection of a hexavalent combination or as two separate injections at 3, 5 and 11 months of age. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(8):585–92. doi: <https://10.1080/00365540410017572>.
 22. Denoël PA, Goldblatt D, de Vleeschauwer I, Jacquet JM, Pichichero ME, Poolman JT. Quality of the *Haemophilus influenzae* type b (Hib) antibody response induced by diphtheria-tetanus-acellular pertussis/Hib combination vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14

Levels of protection against *Haemophilus influenzae* type b in Cuban children, adolescents and adults

Abstract

The levels of antibodies directed against the capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate of *Haemophilus influenzae* type b are considered a good serological indicator to assess the immunity against invasive disease. In Cuba, there are few reports that study serological immunity. The general objective was to determine serum protection levels against *Haemophilus influenzae* type b in Cuban children, adolescents and adults, in a sample of 575 Cuban individuals. The concentration of IgG against *Haemophilus influenzae* type b was quantified by means of an indirect ELISA standardized and validated in the immunology laboratory of the National Center of Medical Genetics, Havana, Cuba. The geometric mean concentration of IgG anti-polyribosylribitol phosphate and the levels of protection against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease were determined. The geometric mean concentration of IgG anti-polyribosylribitol phosphate was 1.94 µg/mL (95%CI 1.80;2.08) and the group from 16 to 22 years old presented the highest. Among those with natural immunity, the percentage with long-term protection was higher for females vs. males (82.2% vs. 71.4%; p=0.0339). The group of subjects born in the period in which they were vaccinated with the Cuban conjugate vaccine QUIMI-HIB® presented higher geometric mean concentration (2.75 µg/mL, CI95% 2.00; 3.79). The 99.1% of the participants had protection against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease, 19.8% short-term and 79.3% long-term protection. The ELISA for the quantification of anti-*Haemophilus influenzae* type b IgG antibodies, developed and validated, could be used in seroprevalence studies. In the subjects studied, there was a predominance of high IgG anti-*Haemophilus influenzae* type b polyribosylribitol phosphate concentration values that confer long-term protection.

Keywords: validation study; *Haemophilus influenzae* type b; seroepidemiologic studies; immunoglobulin G; ELISA; Cuba.

Recibido: 14 de abril del 2022

Aceptado: 7 de noviembre de 2022