

DETERMINATION DU NIVEAU D'ANTICORPS ANTITÉTANOS EN DONNEURS DE SANG AU MOYEN DU TEST ELISA-TÉTANOS (SÃO PAULO, SP, BRÉSIL)

Luzia Cristina Contim FERRATTO (1), Adelaide José VAZ (2), Eide Dias CAMARGO (2) & Ana Maria Carvalho de SOUZA (2)

RESUME

Le test ELISA-TÉTANOS (Biosys, France) a été utilisé pour le titrage des anticorps tétaniques (sensibilité = 0,0025 UI/ml) en sérums humains de donneurs de sang, 566 hommes et 108 femmes, âges de 18 à 58 ans, moyenne de 29 ans, provenant de São Paulo, SP, Brésil. L'OMS, acceptant seulement la séroneutralisation sur souris (NT), la méthode de référence, pour les études sur la protection contre le tétanos, préconise le titre de 0,01 UI/ml comme minimum protecteur. BOURLEAUD & HUET ont proposé la limite de 0,06 UI/ml quand s'emploie le test ELISA, en attendant à une certaine discordance inévitable entre les méthodes. Parmi les 674 sérums étudiés, 178 (26,41%) n'ont pas présenté d'anticorps (< 0,0025 UI/ml); 413 (61,28%) ont présenté des résultats égaux ou supérieurs à 0,01 UI/ml et en 232 (34,42%) les titres ont été égaux ou supérieurs à 0,06 UI/ml. Le pourcentage d'individus protégés a été inversement proportionnel à l'âge: environ 50% dans le groupe le plus jeune (hommes de 18 à 35 ans et femmes de 18 à 23 ans) contre environ 10% dans le groupe de plus de 42 ans ont présenté des titres sûrement protecteurs (\geq 0,06 UI/ml).

MOTS CLEFS: ELISA-TÉTANOS; Anticorps tétaniques; Antitoxine tétanique; Donneurs de sang; Protection contre le tétanos.

INTRODUCTION

Le tétanos est une maladie qui tue environ un million de personnes par an dans le monde³. Au Brésil, en 1987, ont été enregistrés 1929 cas de tétanos⁵. Dans la ville de São Paulo, il a été observé un déclin significatif du nombre de cas durant les deux dernières décades; de 0,91 cas pour 100.000 habitants en 1970 pour 0,19 cas pour 100.000 habitants en 1986. Ce déclin coïncide avec l'obligation de vaccination des enfants en âge scolaire à partir de 1964 et des bébés, suivant

le schéma recommandé par l'OMS à partir de 1972^{1a}.

Plusieurs tests immunologiques ont été proposés pour l'avaliation du niveau d'antitoxine tétanique en individus immunisés par le vaccin, et pour la vérification de l'immunité naturellement acquise.

La séroneutralisation sur souris est considérée le test de référence par l'OMS, et la valeur

Cette publication est partie de la Dissertation de Maîtrise de l'auteur.

(1) Imunoserum — Tecnologia Imunológica Ltda. São Paulo, SP, Brésil.

(2) Institut Adolfo Lutz. Laboratoire de Sérologie. São Paulo, SP, Brésil.

Adresse pour correspondance: Dra. Luzia Cristina Contim Ferratto. Imunoserum Ltda. Rua Loefgren, 1726. CEP 04040 São Paulo, SP, Brésil.

minimum pour indiquer la protection est de 0,01 UI/ml^{7, 19}. Ce test est d'une exécution difficile et son coût est élevé.

Le niveau protecteur de 0,01 UI/ml est discutable quand on emploie les tests 'in vitro'^{3, 9}. Il y a également des cas de tétanos décrits chez des patients dont les concentrations d'antitoxine sont de l'ordre de 0,01 UI/ml^{1, 7}. L'explication possible pour ces divergences est que la séroneutralisation détermine à peine les anticorps d'activité biologique neutralisante, quand les tests 'in vitro' détectent également les autres immunoglobulines tétaniques.

Entre les tests immunologiques employés pour doser l'antitoxine tétanique, le test immunoenzymatique ELISA se détache par sa haute sensibilité et spécificité^{2, 9, 11, 13, 15, 17}.

Dans le but d'étudier le niveau de protection contre le tétanos, le test ELISA-TÉTANOS (Biosys, France) a été utilisé sur une partie de la population adulte résidant dans la Grande São Paulo (ville et banlieue).

MATERIEL ET METHODES

Echantillons de sérum — ont été obtenus de 674 donneurs de sang (18 à 58 ans, moyenne 29 ans), de l'Hôpital des Cliniques de la Faculté de Médecine de L'Université de São Paulo, Brésil, pendant la période du 25 juin au 29 juillet 1987.

Test ELISA-TÉTANOS (Biosys, France) — ce test utilise l'anatoxine tétanique purifiée (3.000 Lf/mg N) couplage par le glutaraldehyde à phase-solide, plaques de polystyrène traitées avec poly-L-lysine-DL-phenylalanine. La méthode décrite a l'avantage d'augmenter la quantité d'antigène fixé disponible et de stabilité dans le temps¹⁶. La même anatoxine a été conjuguée à la peroxydase. La spécificité du test est élevée et permet la détection de bas niveaux d'antitoxine de l'ordre de 0,0025 UI/ml. En résumé, 100 μ l de sérum ont été distribués dans le puit de plaque. Après incubation pendant 2 heures à 37°C la plaque a été lavée en PBS pH 7,2 contenant 0,3% de séroalbumine bovine. Le conjugué a été additionné, 100 μ l par puit, dilué à 1:1000 sur la solution de lavage contenant 10% (v/v)

de sérum normal de chèvre. Les procédés d'incubation et lavage furent répétés. La réaction enzymatique a été initiée par l'addition de la solution chromogène (orto-phenylene-diamine et eau oxygénée), et après 10 minutes à 37°C, la réaction fut interrompue par l'addition de 50 μ l de H₂SO₄ 2N. L'intensité de coloration fut avalée au spectrophotomètre de plaques (Titertek Multiskan MCC, Flow Laboratories Inc., USA) en 490 nm. Des concentrations supérieures à celles du protocole ont été obtenues au moyen de dilution des échantillons.

Courbe standard — A été établie à partir de l'antitoxine de référence internationale, sérum hyperimmune de cheval (Copenhague), 5 UI/ml, dilué de manière à obtenir les titres de 0,0025; 0,005; 0,010; 0,025 et 0,050 UI/ml.

Analyse statistique — Ont été étudiées les fréquences des titres et la moyenne d'antitoxine tétanique⁸. Le test X² a été appliqué pour vérification des différences de résultats entre les groupes d'âge¹⁰.

RESULTATS

La courbe dose-réponse obtenue de l'antitoxine tétanique est présentée sur la figure 1. Les résultats des échantillons de sérum de chaque donneur ont été calculés à partir de la courbe obtenue sur la plaque respective.

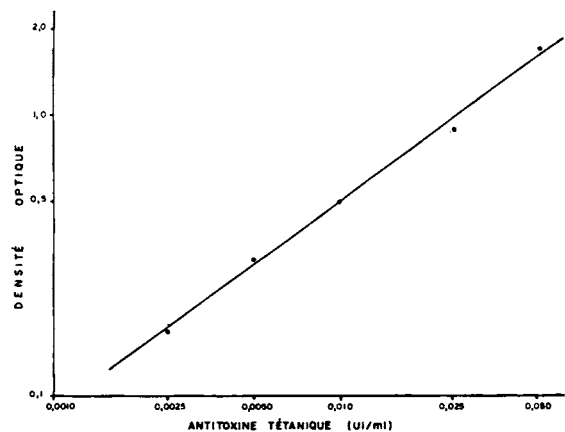


Fig. 1 — Courbe dose-réponse du test ELISA-TÉTANOS, par l'antitoxine tétanique standard. Chaque point représente la moyenne de 20 déterminations.

Le tableau 1 montre la distribution des individus selon le sexe et le résultat du test ELISA-TÉTANOS aux intervalles suggérés par BOURLEAUD & HUET³ pour avalier le niveau d'immunité. Pour ce critère, les individus dont les niveaux sont inférieurs à 0,01 UI/ml ne seraient pas protégés; ceux dont les niveaux sont de 0,01 à 0,059 UI/ml seraient faiblement protégés, et les deux groupes devraient être vaccinés (trois doses et le rappel). Les individus dont les niveaux sont égaux ou supérieurs à 0,06 UI/ml seraient protégés, mais on recommande le vaccin-rappel si le niveau est au-dessous de 0,25 UI/ml; si celui-ci est supérieur à 0,25 UI/ml il n'est pas besoin de rappel, la protection étant suffisante. Dans le cas où les personnes auraient un niveau

supérieur à 1,25 UI/ml, elles seraient considérées bien protégées.

Il n'a pas été observé de différence significative quant au sexe pour les divers niveaux de protection.

En janvier 1963 a été instituée la vaccination obligatoire des écoliers à São Paulo, et selon cette information, la population étudiée a été groupée selon les âges:

- 18 à 23 ans, nés après la loi;
- 24 à 29 ans, passés à l'école après cette obligation;
- 30 à 35 ans, à l'école à cette époque;
- les autres groupes, obtenus sur le même intervalle de 6 ans.

TABLEAU 1

Distribution d'individus selon le sexe et l'intervalle des titres d'antitoxine tétanique obtenus sur le test ELISA-TÉTANOS.

ELISA (intervalle - UI/ml)	SEXE				TOTAL	
	MASCULIN		FÉMININ		n	%
	n	%	n	%		
≤ 0,0025 - 0,0099	215	37,99	46	42,59	261	38,72
0,010 - 0,059	148	26,15	33	30,56	181	26,86
0,060 - 0,25	79	13,96	14	12,96	93	13,80
0,26 - 1,25	98	17,31	12	11,11	110	16,32
> 1,25	26	4,59	3	2,78	29	4,30
TOTAL	566	100,00	108	100,00	674	100,00

TABLEAU 2

Distribution des 674 individus selon l'âge, le sexe et le degré de protection contre le tétanos. La moyenne d'antitoxine tétanique de chaque groupe est aussi présentée.

Age en Années	Antitoxine Tétanique (UI/ml)												Moyenne (UI/ml)	Total
	< 0,01				0,01 — 0,059				≥ 0,06					
	Masculin		Féminin		Masculin		Féminin		Masculin		Féminin			
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
18— 24	52	7,70	7	1,04	56	8,31	14	2,08	95	14,09	18	2,67	0,660	242
24— 30	38	5,64	8	1,19	40	5,93	7	1,04	54	8,01	3	0,45	0,179	150
30— 36	48	7,12	11	1,63	23	3,41	8	1,19	37	5,49	4	0,60	0,153	131
36— 42	32	4,76	9	1,33	16	2,37	4	0,59	10	1,48	2	0,30	0,095	73
42— 48	29	4,30	7	1,04	6	0,89	—	—	5	0,74	2	0,30	0,047	49
48— 54	14	2,08	3	0,44	6	0,89	—	—	1	0,15	—	—	0,030	24
54— 59	2	0,30	1	0,15	1	0,15	—	—	1	0,15	—	—	0,039	5
TOTAL	215	31,90	46	6,82	148	21,95	33	4,90	203	30,11	29	4,32	0,322	674

Sur le tableau 2 sont présentés les résultats des 674 individus distribués selon les groupes d'âge sus-mentionnés, le sexe et le degré de protection³: non protecteurs (< 0,01 UI/ml), faiblement protecteurs (0,01 — 0,059 UI/ml) et protecteurs (≥ 0,06 UI/ml). La moyenne des titres est aussi présentée pour chaque groupe.

DISCUSSION

L'utilisation du conjugué anatoxine tétanique-péroxydase au test ELISA-TETANOS permet la réalisation d'essais en sérums homologues et hétérologues. De cette façon on peut utiliser le sérum de référence internationale recommandé par l'OMS pour l'établissement d'une courbe standard. En fait, la courbe dose-réponse (figure 1) montre la relation linéaire entre la densité optique (DO) et la quantité d'antitoxine.

En accord avec le groupement suggéré par BOURLEAUD & HUET³, tableau 1, nous considérons que les individus dont les niveaux d'antitoxine sont inférieurs à 0,06 UI/ml devraient être vaccinés ou revaccinés, 442 (65,60%) individus étudiés s'encadrent dans ce cas. Quatre vingt treize (13,80%) auraient besoin d'une dose d'anatoxine tétanique au cours d'accident, et seulement 139 (20,60%) seraient adéquatement protégés. Il n'a pas été observé de différences significatives d'immunité en relation au sexe ($0,05 < p < 0,10$), comme d'autres auteurs l'ont déjà relaté^{4, 12, 14}.

La corrélation entre l'âge et le niveau d'antitoxine tétanique a été analysée statistiquement considérant les titres égaux ou supérieurs à 0,06 UI/ml comme protecteurs (tableau 2). On a observé des différences quant au sexe seulement dans le groupe de 24 à 35 ans ($p < 0,05$). Pour le groupe masculin a été observée une égalité quant à la protection dans les trois premiers intervalles d'âge, et des différences entre ceux-ci et les quatre autres. Pour les femmes ont été rencontrées des différences significatives entre les groupes de 18 à 24 ans, de 24 à 29 ans et de 30 à 58 ans. Ainsi, ont été constitués deux groupes distincts ($p < 0,05$) entre les 674 individus.

On observe que les individus plus jeunes possèdent les plus grands pourcentages de titres

Groupe I n = 482 (71,49%)	Hommes	Femmes
	18 à 35 ans	19 à 23 ans
Titres protecteurs ≥ 0,06 UI/ml	41,99% (186)	46,15% (18)
Moyenne (UI/ml)	0,948	2,071

Groupe II n = 192 (28,51%)	Hommes	Femmes
	36 à 57 ans	24 à 58 ans
Titres protecteurs ≥ 0,06 UI/ml	13,82% (17)	15,94% (11)
Moyenne (UI/ml)	0,490	0,484

protecteurs, l'inverse se produisant dans les groupes d'âge plus avancés. Les individus de 18 à 24 ans avaient une moyenne de 0,660 UI/ml d'antitoxine tétanique, ou soit, deux fois la moyenne totale de 0,322 UI/ml. Les moyennes de titres sont inversement proportionnelles à l'âge (tableau 2).

Curieusement on vérifie une constance dans le pourcentage des individus de titres faiblement protecteurs, environ 25% pour tous les groupes d'âge. Probablement on trouve ici des individus vaccinés inadéquatement, ou d'immunité naturellement acquise et qui répondraient bien à une revaccination. Au contraire, on a observé qu'en moyenne 40% de la population adulte a besoin d'un schéma complet de vaccination, et à peine 35% sont déjà bien protégés.

Malgré ces résultats, le tétanos dans la municipalité de São Paulo est en voie de déclin: 74 cas en 1970 pour 19 en 1986. Ces conditions particulières résultent beaucoup plus de l'urbanisation et de l'extension des services de santé à toute la population de la ville, que de quelque campagne de vaccination d'adultes. En moyenne 60% du peu de cas existants se produisent chez des individus de plus de 40 ans (source: Secrétariat d'Etat de la Santé — São Paulo).

Les résultats ici présentés sont importants, car ils étendent le besoin de programmes d'immunisation contre le tétanos aux adultes. Reste la suggestion que s'amplifie l'obligation de cette vaccination aux demi-décades, ceci est aux 15, 25 ans et ainsi de suite comme a été suggéré par BOURLEAUD & HUET³.

RESUMO

Determinação do nível de anticorpos antitéticos em doadores de sangue, através do teste ELISA-TETANOS (São Paulo, SP, Brasil).

O teste ELISA-TETANOS (Biosys, France) foi utilizado para a titulação de antitoxina tétânica (sensibilidade = 0,0025 UI/ml) em soros humanos de doadores de sangue, 566 homens e 108 mulheres, idade entre 18 e 58 anos, média de 29 anos, residentes em São Paulo, Brasil. A Organização Mundial de Saúde aceita apenas o teste de soroneutralização em animais, método de referência, para os estudos de proteção contra o tétano, e preconiza o título mínimo protetor de 0,01 UI/ml. BOURLEAUD & HUET, propuseram o limite de 0,06 UI/ml quando se emprega o teste imunoenzimático ELISA, devido a discrepâncias inevitáveis entre os dois métodos. Dos 674 soros estudados, 178 (26,41%) não apresentaram anticorpos detectáveis (< 0,0025 UI/ml); 413 (61,28%) apresentaram resultados iguais ou superiores a 0,01 UI/ml e, em 232 (34,42%) os títulos foram iguais ou superiores a 0,06 UI/ml. A porcentagem de indivíduos protegidos foi inversamente proporcional à idade: cerca de 50% do grupo mais jovem (homens de 18 a 35 anos e mulheres de 18 a 23 anos) contra 10% do grupo de mais de 42 anos apresentaram títulos seguramente protetores ($\geq 0,06$ UI/ml).

REMERCIEMENTS

Nous remercions la *Sté Biosys* (Compiègne, France) et le Dr. Bertrand Favreau, pour les réactifs du test ELISA-TETANOS. Nous remercions également le Dr. Mafalda Megumi Yoshinaga Novaes pour nous avoir fourni les échantillons de sérum qui ont servi à notre travail, ainsi que Mme. Nicole Markman pour la traduction et révision du texte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BERGER, S. A.; CHERUBIN, C. E.; NELSON, S. & LEVINE, L. — Tetanus despite preexisting antitetanus antibody. *J. Amer. med. Ass.*, 240: 769-770, 1978.

2. BIZZINI, B.; TURPIN, A. & RAYNAUD, M. — Production et purification de la toxine tétanique. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 116: 686-712, 1969.
3. BOURLEAUD, J. & HUET, M. — Contribution in the study of tetanus in France. *Méd. et Mal. infect.*, 15: 7-16, 1985.
4. BYCHENCO, B.; GRIN, E.; MATVEEV, K. I.; CVJETANOVIC, B.; VORST, E. A. & STROGANOVA, M. — The level of tetanus immunity in the population of villages in Bosnia and Herzegovina. *Bull. Wld. Hith. Org.*, 45: 431-443, 1971.
5. CASOS notificados de enfermedades del Programa Ampliado de Inmunización en las Américas. *Bol. inform. PAI Org. panamer. Salud*, 10(1): 7, 1988.
6. FAVREAU, B.; WAREING, C. J. & BIZZINI, B. — Développement d'une technique immuno-enzymatique pour le titrage d'anticorps antitétaniques. (Personal communication, 1985).
7. FURSTE, W. — The fifth international conference on tetanus, Ronneby, Sweden, 1978. *J. Trauma*, 20: 101-105, 1980.
8. GALEN, R. S. & GAMBINO, S. R. — Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York, John Wiley & Sons, 1975. 236 p.
9. GERMAN-FATTAL, M.; LE PAGE, C.; GERMAN, A.; RABARON, A. & BIZZINI, B. — Titrage des anticorps antitétaniques par immuno-enzymologie. Etudes statistiques de validation. *Ann. pharm. franç.*, 45: 5-14, 1987.
10. HOEL, P. G. — Estatística elementar. São Paulo, Atlas, 1981. 430 p.
11. LAU, R. C. H. — Detection of tetanus toxoid antibodies in human sera in New Zealand by ELISA. *Epidem. Infect.*, 98: 199-202, 1987.
12. LEEN, C. L. S.; BARCLAY, G. R. & McCLELLAND, D. B. L. — Selection of plasma donors suitable for tetanus boosting. *Vox Sang.*, 51: 197-201, 1986.
13. MATZKIN, H. & REGEV, S. — Naturally acquired immunity to tetanus toxoid in an isolated community. *Infect. Immun.*, 48: 267-268, 1985.
14. RAY, S. N.; RAY, K.; GROVER, S. S.; SHARMA, R. S. & SHARMA, S. P. — Sero-survey of diphtheria and tetanus antitoxin. *Indian J. med. Res.*, 68: 901-904, 1978.
15. SEDWICK, A. K.; BALLOU, M.; SPARKS, K. & TILTON, R. C. — Rapid quantitative microenzyme-linked immunosorbent assay for tetanus antibodies. *J. clin. Microbiol.*, 18: 104-109, 1983.
16. STOCKER, J. W. & HEUSER, C. H. — Methods for binding cells to plastic: application to a solid-phase radioimmunoassay for cell-surface antigens. *J. immunol. Meth.*, 26: 87-95, 1979.

FERRATTO, L. C. C.; VAZ, A. J.; CAMARGO, E. D. & SOUZA, A. M. C. de — Determination du niveau d'anticorps antitétaniques en donneurs de sang au moyen du test ELISA-TETANOS (São Paulo, SP, Brésil). *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 32(6): 461-466, 1990.

17. VARELA, L. R.; BLACK, F. L. & MENDIZABAL-MORRIS, C. A. — Tetanus antitoxin titers in women of child-bearing age from nine diverse population. *J. Infect. Dis.*, 151: 850-853, 1985.
18. VERONESI, R. — Prophylaxis. In: VERONESI, R. — *Tetanus: important new concepts*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1981. p. 238-263.
19. WORLD HEALTH ORGANIZATION — Manual of details of tests required on final vaccines used in the WHO expanded programme of immunization. BLG/UNDP/82.1 Rev. 1.

Recebido para publicação em 24/1/1990.