

00568

3



UNIVERSIDAD NACIONAL<sup>24</sup>  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Ensayo de Diferentes Combinaciones de  
Antigenos para la Selección de la Mejor  
Vacuna Cuadruple Contra *Haemophilus*  
*influenzae* Tipo b - DTP

T E S I S

Que para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS, FARMACIA  
(CONTROL DE MEDICAMENTOS)

p r e s e n t a

MARIA ANTONIETA ROMAN TIBURCIO



México, D. F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

257604



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud bajo la acertada dirección de la Dra. Ma. De los Angeles Cortés Castillo y bajo el patrocinio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Las pruebas de potencia de las fracciones diftérica, tetánica y pertussis fueron realizadas por personal del Laboratorio de Control Biológico y Químico del Instituto Nacional de Higiene.

Los estudios de maestría que realicé fueron patrocinados a través de una beca-crédito por el CONACYT.

**PAGINACIÓN**

**DISCONTINUA**

## DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado esta gran oportunidad

A mis padres a quienes debo todo lo que soy

A Guillermo

A mis hermanos

Al Dr. Juan Ruiz Gómez por su gran apoyo

A mis maestros

A los miembros del jurado

A mis compañeros

A mis amigos

**"ENSAYO DE DIFERENTES COMBINACIONES DE ANTIGENOS PARA LA SELECCION DE LA MEJOR VACUNA CUADRUPLE CONTRA *Haemophilus influenzae* TIPO b - DTP".**

**I. CONTENIDO GENERAL**

	<b>PAGINA</b>
<b>1. RESUMEN EN ESPAÑOL Y EN INGLES (abstract )</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
2.1 Objetivo general.	1
2.2 Objetivos especificos.	1
2.3 Planteamiento del problema.	2
2.4 Hipótesis.	4
<b>3. GENERALIDADES</b>	
3.1 Incidencia de las enfermedades ocasionadas por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Clostridium tetani</i> y <i>Bordetella pertussis</i> .	5
3.2 Vacuna contra <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.	7
3.3 Vacuna antipertussis con toxoides diftérico y tetánico adsorbidos.	13
3.4 Vacunas combinadas.	15
3.5 Vacunas combinadas Hib-DTP.	16
3.6 Requerimientos de control de calidad para las vacunas Hib y DTP.	18
3.7 Técnica de ELISA	19
<b>4. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>21</b>
4.1 Material, equipo y reactivos.	21
4.2 Métodos y técnicas.	24

<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
	5.1 Estandarización de los esquemas de inmunización y de las condiciones para la técnica de ELISA.	49
	5.2 Evaluación de la potencia de las vacunas Hib y DTP solas y combinadas.	53
	5.3 Título de anticuerpos de la fracción Hib para el estudio de disminución de la potencia de la fracción Hib después de 7 días de refrigeración (2-8°C) para las diferentes combinaciones de la vacuna Hib+DTP.	82
<b>6.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>86</b>
	6.1 Estandarización de la técnica de ELISA.	86
	6.2 Evaluación de la potencia de las vacunas Hib y DTP solas y combinadas	87
	6.3 Evaluación de la potencia de las vacunas Hib y DTP solas y combinadas.	90
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>APENDICE</b>	<b>94</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>97</b>

## **II. INDICE DE TABLAS**

<b>TABLA</b>	<b>TITULO</b>	<b>PAGINA</b>
1	Vacunas conjugadas contra <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	3
2	Inmunogenicidad de tres vacunas contra <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b entre niños	10
3	Eficacia de las vacunas Hib conjugadas en niños	11
4	Esquema de inmunización de conejas con PRP	24

5	Esquema de inmunización de ratones con PRP. (Esquema 1)	25
6	Esquema de inmunización de ratones con PRP. (Esquema 2)	26
7	Distribución de las vacunas Hib y de sus respectivas combinaciones con DTP a los 10 grupos de conejos	32
8	Serie problema	37
9	Serie patrón	37
10	Esquema de operación - serie patrón	43
11	Esquema de operación - serie muestra	43
12	Determinación del factor de corrección (F.C.) a partir de la serie patrón	44
13	Logaritmos del suero problema a partir del tiempo y número de muertes	45
14	Distribución de los grupos de los conejos participantes en el estudio de disminución de la potencia inmunológica de la fracción Hib de las combinaciones Hib+DTP a temperatura de refrigeración (2-8°C)	48
15	Condiciones de la técnica de ELISA para la titulación de los sueros de conejo de la cepa NZW inmunizados con PRP	49
16	Datos para el cálculo de la precisión del sistema	50
17	Datos para el cálculo de la precisión del método	51
18	Lecturas de densidad óptica de los sueros anti-PRP obtenidos de conejos inmunizados con HbOC (Grupo 1) con HbOC+DTP (Grupo 2). (Media geométrica grupal)	54
19	Lecturas de densidad óptica de los sueros anti-PRP obtenidos de los conejos inmunizados con PRP-D (grupo 3) o con PRP-D+DTP (grupo 4). (media geométrica grupal)	59
20	Lecturas de densidad óptica de los sueros anti-PRP obtenidos de los conejos inmunizados con PRP-OMP (Grupo 5) o con PRP-OMP+DTP (Grupo 6). (media geométrica grupal)	64
21	Lecturas de densidad óptica de los sueros anti-PRP obtenidos de los conejos inmunizados con PRP-T <sup>(a)</sup> (Grupo 7) o con PRP-T <sup>(a)</sup> +DTP (Grupo 8). (media	

	geométrica grupal)	69
22	Lecturas de densidad óptica de los sueros anti-PRP obtenidos de los conejos inmunizados con PRP-T <sup>(b)</sup> (Grupo 9) o con PRP-T <sup>(b)</sup> +DTP (Grupo 10). (media geométrica grupal)	74
23	Título de los sueros de conejo anti-PRP probados por medio de la técnica de ELISA, considerando como punto de corte 0.139	78
24	Potencia de las fracciones diftérica, tetánica y pertussis para las diferentes combinaciones de la vacuna Hib+DTP	80
25	Lecturas de densidad óptica de los sueros anti-PRP obtenidos de los conejos inmunizados para el estudio de disminución de la potencia inmunológica de la fracción Hib después de 7 días de refrigeración (2-8°C) para las diferentes combinaciones de vacuna Hib+DTP	83
26	Título de los sueros de conejo anti-PRP obtenidos de los conejos inmunizados para el estudio de disminución de la potencia inmunológica de la fracción Hib después de 7 días de refrigeración (2-8°C) para las diferentes combinaciones de vacuna Hib+DTP, considerando como punto de corte 0.192	85
27	Análisis de varianza de los resultados de la titulación de la fracción Hib de los sueros extraídos de los conejos inmunizados con las vacunas Hib sólo y combinadas con DTP (grupos 1 al 10)	88
28	Análisis de varianza de los resultados del estudio de disminución de la potencia inmunológica de la fracción Hib de las vacunas combinadas y mantenidas en refrigeración (2-8°C) 7 días después de su mezcla (grupos 11, 13 y 14)	92

### III. INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Cuantificación de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA	20
2	Esquema para la titulación de los sueros de conejo por medio de la técnica de ELISA	34

#### **IV. INDICE DE DIAGRAMAS DE FLUJO**

<b>DIAGRAMA DE FLUJO</b>	<b>TITULO</b>	<b>PAGINA</b>
1	Diagrama de flujo general	28
2	Inmunización de los conejos y conservación de los sueros	
3	Titulación de los sueros por medio de la técnica de ELISA	30
4	Titulación de la fracción diftérica	35
5	Titulación de la fracción tetánica	38
6	Titulación de la fracción pertussis	41
7	Estudio de disminución de la potencia de la fracción Hib de las vacunas Hib+DTP en refrigeración (2-8°C)	46

#### **V. INDICE DE GRAFICAS**

<b>GRAFICA</b>	<b>TITULO</b>	<b>PAGINA</b>
1	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con HbOC (grupo 1) o con HbOC+DTP (grupo 2). 1ª sangría	55
2	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con HbOC (grupo 1) o con HbOC+DTP (grupo 2). 2ª sangría	56
3	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con HbOC (grupo 1) o con HbOC+DTP (grupo 2). 3ª sangría	57
4	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con HbOC (grupo 1) o con HbOC+DTP (grupo 2). 4ª sangría	58
5	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados	

	con PRP-D (grupo 3) o con PRP-D+DTP (grupo 4). 1ª sangría	60
6	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-D (grupo 3) o con PRP-D+DTP (grupo 4). 2ª sangría	61
7	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-D (grupo 3) o con PRP-D+DTP (grupo 4). 3ª sangría	62
8	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-D (grupo 3) o con PRP-D+DTP (grupo 4). 4ª sangría	63
9	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-OMP (grupo 5) o con PRP-OMP+DTP (grupo 6). 1ª sangría	65
10	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-OMP (grupo 5) o con PRP-OMP+DTP (grupo 6). 2ª sangría	66
11	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-OMP (grupo 5) o con PRP-OMP+DTP (grupo 6). 3ª sangría	67
12	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-OMP (grupo 5) o con PRP-OMP+DTP (grupo 6). 4ª sangría	68
13	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-T <sup>(a)</sup> (Grupo 7) o con PRP -T <sup>(a)</sup> +DTP (Grupo 8). 1ª sangría	70
14	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-T <sup>(a)</sup> (Grupo 7) o con PRP -T <sup>(a)</sup> +DTP (Grupo 8). 2ª sangría	71
15	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-T <sup>(a)</sup> (Grupo 7) o con PRP -T <sup>(a)</sup> +DTP (Grupo 8). 3ª sangría	72
16	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con o con PRP -T <sup>(a)</sup> +DTP (Grupo 8). 4ª sangría	73
17	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-T <sup>(b)</sup> (Grupo 9) o con PRP -T <sup>(b)</sup> +DTP (Grupo 10). 1ª sangría	75
18	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados con PRP-T <sup>(b)</sup> (Grupo 9) o con PRP -T <sup>(b)</sup> +DTP (Grupo 10). 2ª sangría	76
19	Titulación de anticuerpos anti-PRP en conejos inmunizados	

	con PRP-T <sup>(b)</sup> (Grupo 9) o con PRP -T <sup>(b)</sup> +DTP (Grupo 10). 3ª sangría	77
20	Potencia de las fracciones diftérica, tetánica y pertussis para las diferentes combinaciones de la vacuna Hib+DTP	81
21	Titulación de anticuerpos anti-PRP para el estudio de <i>disminución de la potencia inmunológica</i> después de 7 días de refrigeración (2-8°C) para las diferentes combinaciones de las vacunas Hib+DTP	84

# "ENSAYO DE DIFERENTES COMBINACIONES DE ANTIGENOS PARA LA SELECCION DE LA MEJOR VACUNA CUADRUPLE CONTRA *Haemophilus influenzae* TIPO b - DTP".

## 1. RESUMEN EN ESPAÑOL Y EN INGLES (abstract)

### a) RESUMEN

En México se ha demostrado que *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) es un agente causal de meningitis y otras enfermedades, por lo que es necesario contar con una vacuna contra dicha bacteria. Actualmente existe la tendencia de administrar simultáneamente varias vacunas, cuyos esquemas de aplicación son coincidentes. Hoy en día en muchos países es frecuente utilizar vacunas combinadas de difteria, tétanos, pertussis (DTP) y Hib conjugada, por lo que en México se desea disponer de una vacuna combinada Hib+DTP, en la cual la fracción DTP sea producida en el país y la fracción Hib proporcionada por algún proveedor externo. Dado que existen diversos proveedores de vacunas Hib es necesario combinar cada una de las diferentes vacunas Hib disponibles, con la vacuna DTP para seleccionar la combinación más inmunogénica, para realizar estudios posteriores con mayor profundidad. En este trabajo se evaluó la potencia de diferentes vacunas combinadas Hib+DTP en modelos animales por medio de la técnica de ELISA para la fracción Hib y a través de pruebas de seroneutralización para las fracciones diftérica y tetánica y pruebas de reto para la fracción pertussis. Entre todas las combinaciones probadas no se detectaron diferencias inmunogénicas de importancia y se demostró que la combinación de los antígenos probados no afectó la inmunogenicidad de éstos entre sí.

### b) ABSTRACT

In Mexico it has been demonstrated that *Haemophilus influenzae* type b (Hib) is a causative agent of meningitis and other diseases, so it is necessary to have a vaccine against this bacteria. At present, there is a tendency of administering simultaneously a lot of vaccines with similar application schedules. Nowadays in a lot of countries it is frequent to use combined diphtheria, tetanus, pertussis (DTP) and conjugated Hib vaccines, and for these reasons we want to have in Mexico a combined Hib+DTP vaccine, in which the DTP fraction has been produced inside the country and the Hib fraction supplied by an external vendor. Because there are different Hib vaccines vendors, it is necessary to combine each one of the different available Hib vaccines with the DTP in order to select the most immunogenic combination, for developing subsequent deeper studies. In this work the potency of different combined Hib+DTP vaccines was evaluated in animal models by ELISA for the Hib fraction, by seroneutralization tests for the diphtheria and tetanus fractions and by challenge tests for the pertussis fraction. We did not detect any important immunogenic difference among all the combinations that were proved and it was demonstrated that the combination of the proven antigens did not affect the immunogenicity among them.

## 2. INTRODUCCION

### 2.1 OBJETIVO GENERAL:

Seleccionar la mejor combinación de una vacuna cuádruple que contenga el antígeno protector contra Hib más la vacuna triple DTP.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

2.2.1 Realizar diferentes combinaciones de la vacuna DTP producida en el Instituto Nacional de

### 3. GENERALIDADES

#### 3.1 INCIDENCIA DE LAS ENFERMEDADES OCASIONADAS POR *Haemophilus influenzae* TIPO b, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* Y *Bordetella pertussis*.

##### 3.1.1 *Haemophilus influenzae*

*Haemophilus influenzae* es una bacteria gramnegativa, pequeña, no móvil, no formadora de esporas y es un parásito de los humanos, que se encuentra principalmente en el tracto respiratorio superior.<sup>(4)</sup>

Existen cepas encapsuladas (tipos a-f) y no encapsuladas, siendo *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) la principal bacteria causante de infecciones invasivas en niños. El espectro de las enfermedades incluye infecciones del sistema nervioso central (meningitis), del tracto respiratorio (epiglotitis y neumonía), de las coyunturas sinoviales (artritis purulenta) y de los tejidos suaves (celulitis).<sup>(4)</sup>

La meningitis es la más grave y la más común de estas infecciones; casi todos los casos de estas enfermedades bacterémicas causadas por *Haemophilus influenzae* se deben a los organismos tipo b, uno de los seis tipos de polisacáridos capsulares de esta especie.<sup>(1,5,6,7)</sup>

Las infecciones invasivas por Hib ocurren alrededor de todo el mundo, aunque las proporciones de ataque varían substancialmente dependiendo de factores tales como la densidad de población, etnicidad, estatus socioeconómico y estación. La incidencia anual de meningitis ocasionada por Hib entre niños de 0 - 4 años de edad difiere considerablemente en diferentes grupos y en diferentes partes del mundo. En los países desarrollados el índice de fatalidad es del 1 - 8% y en los países en vías de desarrollo es de 30%.<sup>(5)</sup>

Además de causar la muerte en algunos niños, la meningitis bacteriana es una de las causas más importantes de retraso mental adquirido, sordera, crisis convulsivas, ceguera, defectos en el lenguaje, disfunción motora y alteraciones en la conducta de manera permanente en hasta el 38% de los sobrevivientes.<sup>(1,5)</sup>

Con el aumento progresivo en el número de niños que acuden a guarderías y jardines de niños, la transmisión de Hib ha incrementado su prevalencia, además de que, las enfermedades por *Haemophilus influenzae* se han vuelto resistentes al tratamiento con algunos antibióticos. Está demostrado que el riesgo de adquirir enfermedad sistémica por *Haemophilus influenzae* b en un niño sano que esté en íntimo contacto con otro niño que haya tenido la enfermedad es 400 veces superior a la de un niño de la población general.<sup>(1)</sup>

En un niño, el riesgo acumulado de desarrollar enfermedad sistémica por Hib alguna vez durante los primeros cinco años de la vida es de cerca de 0.5%, sin embargo el índice de ataque de la enfermedad por Hib es máximo entre los seis meses y el año de edad declinando posteriormente. Aproximadamente del 35 al 40% de los casos de enfermedad por Hib ocurre en niños menores de 18 meses o más; en niños de 24 meses o mayores, el porcentaje es del 25%.<sup>(1)</sup>

La enfermedad invasiva ocasionada por *H. influenzae* tipo b se manifiesta de manera importante en los grupos de 1 a 11 meses de edad y más de la mitad de los casos ocurre alrededor de los 18 meses de edad. El porcentaje de los portadores de Hib en niños mexicanos recién nacidos, hasta los 5 años de edad se ha estimado como un 3.5% y de manera similar a otros países

latinoamericanos la ocurrencia de enfermedad ocasionada por Hib es aproximadamente de 21 casos por cada 100,000 niños.<sup>(8)</sup>

La respuesta inmune contra Hib está dirigida contra el antígeno polirribitol fosfato (PRP). PRP se refiere a las unidades repetidas de ribosa y de ribitol fosfato que conforman la cápsula de Hib. La cápsula protege a Hib de los procesos de lisis y de fagocitosis del huésped. Sin embargo, en presencia de anticuerpos anti-PRP, Hib se vuelve susceptible a las defensas del cuerpo, por esta razón el PRP es el antígeno idóneo para inducir una respuesta protectora anti Hib.<sup>(1)</sup>

### 3.1.2 Difteria, tétanos y tos ferina.

La difteria, el tétanos y la tos ferina son enfermedades bacterianas agudas, no invasivas, generalmente con resultados fatales.<sup>(2)</sup>

La difteria es principalmente una intoxicación localizada y generalizada, causada por la toxina diftérica, un metabolito proteico extracelular de cepas toxinogénicas de *Corynebacterium diphtheriae*.<sup>(9)</sup>

El tétanos es una intoxicación manifestada principalmente por trastornos neuromusculares ocasionados por la exotoxina producida por *Clostridium tetani*. Las esporas de *C. tetani* son ubicuas, y esencialmente no existe inmunidad natural a la toxina tetánica.<sup>(9)</sup>

La tos ferina es una enfermedad de las vías respiratorias causada por *Bordetella pertussis*, que es un cocobacilo gramnegativo productor de componentes activos variables, incluso endotoxina y varias otras sustancias que se han definido principalmente en base a su actividad biológica en animales. Estos componentes activos han sido asociados con numerosos efectos como linfocitosis, leucocitosis, sensibilidad a la histamina, cambios en las concentraciones de glucosa y/o insulina, posibles efectos neurológicos y actividad coadyuvante. La tos ferina es altamente contagiosa. Se han reportado índices de ataques de más de 90% en contactos no inmunizados que comparten el hogar.<sup>(9)</sup>

No existen datos precisos, ya que la confirmación bacteriológica de la tos ferina puede obtenerse en menos de la mitad de los casos sospechados. La mayoría de las enfermedades reportadas como causadas por *B. pertussis* ocurren en lactantes y niños pequeños; dos tercios de las muertes reportadas ocurren en niños menores de un año. Los niños mayores y los adultos, en los cuales a menudo los signos clásicos están ausentes, pueden no ser diagnosticados y servir como reservorios de la enfermedad.<sup>(9)</sup>

### Vacuna DTP.

Antes de la era de la inmunización, estas enfermedades eran la causa de muertes alrededor del mundo y la prevención y erradicación de estas enfermedades requiere vacunas que induzcan la formación de anticuerpos toxina-neutralizantes.<sup>(2)</sup>

Desde 1924, la destoxificación efectiva de las toxinas tetánica y diftérica con formaldehído descrita por Ramón en Francia y por Glenn y Hopkins en Inglaterra, facilitó la introducción de la inmunización masiva, que condujo a una erradicación casi completa de ambas enfermedades desde los países desarrollados con excepción de algunos casos que todavía se reportan, los cuales ocurren en la mayoría de los pacientes que no recibieron el esquema de inmunización completo durante la infancia o que posteriormente no recibieron refuerzos adecuados.<sup>(2)</sup>

La vacuna celular contra pertussis, compuesta de células de *Bordetella pertussis* inactivadas químicamente o por calor, fue introducida en los años 40, y desde entonces se ha utilizado efectivamente para controlar la tos ferina alrededor del mundo.<sup>(2)</sup>

Aunque la vacuna pertussis celular aún se utiliza, la enfermedad es todavía un problema de salud significativo en los países desarrollados; la Organización Mundial de la Salud estimó que el número total de casos de tos ferina alrededor del mundo anualmente es de 60 millones y que la enfermedad podría ser responsable de muchos millones de muertes por año. Muchas de estas muertes ocurren en niños no inmunizados en países desarrollados.<sup>(2)</sup>

La vacuna combinada difteria - tétanos y pertussis celular (DTP) como vacuna triple fue introducida a principios de los cincuentas, y consistía en tres dosis a intervalos de 4-6 semanas, los cuales prevenían o controlaban las tres enfermedades en las comunidades en donde se ha preparado adecuadamente y utilizado de acuerdo con las recomendaciones respectivas.<sup>(2)</sup>

### 3.2 VACUNA CONTRA *Haemophilus influenzae* TIPO b.

La incidencia de las infecciones ocasionadas por Hib y las dramáticas secuelas después de la meningitis, a pesar de terapias con antibióticos oportunas y bien orientadas, enfatizan la necesidad de prevención de dichas enfermedades sistémicas. Durante las pasadas dos décadas, la prevención de las enfermedades infecciosas por Hib mediante la inmunización, ha sido objeto de intensas investigaciones.<sup>(10)</sup>

La primera vacuna Hib disponible para pruebas de campo contenía la porción del polisacárido puro (PRP) de Hib. Este producto se probó en campo en Finlandia en 1974, durante una larga epidemia de meningitis meningocócica. El estudio fue abierto aleatorio y en éste se administraron a niños de tres meses a cinco años las vacunas Hib - PRP y la vacuna meningocócica tipo A. Entre los niños de 18 a 71 meses que recibieron las vacunas Hib - PRP o la meningocócica, hubo cero y once casos de Hib sistémico en el primer año de vida, respectivamente. Durante el segundo año del estudio, ocurrieron dos casos en el grupo Hib - PRP y cinco casos en el de la vacuna meningocócica. En niños menores de 18 meses de edad que recibieron la vacuna Hib - PRP, se observaron siete casos de Hib en el primer año y un caso en el segundo año. En los receptores de vacuna meningocócica menores de 18 meses de edad, hubo un caso de Hib en el primer año y tres en el segundo año. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa.<sup>(11)</sup>

Este estudio demostró que Hib - PRP fue eficaz en niños mayores de 18 meses de edad pero no menores de esa edad. Este producto fue autorizado en Estados Unidos para su uso rutinario en niños de 24 meses o mayores, en 1985.<sup>(1,11,12)</sup>

Se pensó que esta vacuna actuaba como un antígeno timo-independiente (Ti), activador de las células B para diferenciar entre células productoras de anticuerpos sin ayuda obvia de las células T-cooperadoras. La vacunación con PRP no conjugado no induce la memoria inmunológica, ya que no se observan respuestas de refuerzo con las re-inyecciones.<sup>(1,12)</sup>

En 1973, Paul Williams postuló que la diferencia en la respuesta de anticuerpos contra sacáridos o proteínas puede tener aplicaciones en las vacunas para niños. Williams sugirió que al unir el sacárido a una proteína convertiría a éste de un antígeno T-independiente a uno T-dependiente, incrementado así su habilidad inmune. La habilidad de los epitopos de la proteína en el conjugado para propiciar la ayuda de las células T puede permitir la activación de las células B específicas para el componente polisacárido del conjugado, a una edad en que las células B de los niños no responden normalmente a la activación mediante PRP sin conjuguar. Con base en esta hipótesis,

se han estudiado numerosos conjugados sacárido proteína como potenciales inmunógenos contra patógenos frecuentes en los niños tales como el meningococo, el pneumococo y el *Haemophilus influenzae* tipo b. Sea cual sea el mecanismo, las vacunas conjugadas de Hib son más inmunogénicas en niños que las de PRP no conjugadas.<sup>(1,3,12,13)</sup>

### 3.2.1 Vacunas conjugadas

El propósito de una vacuna es estimular al organismo para que produzca niveles más elevados de anticuerpos circulantes o de inmunidad celular contra un antígeno particular. Cuando se trata de respuestas de anticuerpos, la exposición inicial a un antígeno estimula la producción de anticuerpos IgM que tienen una vida media corta. Sin embargo posteriormente se producen anticuerpos IgG que duran más y son más abundantes. Es la presencia de anticuerpos IgG la que indica si una vacuna ha sido capaz de inmunizar exitosamente a un paciente contra la infección. La evidencia clínica sugiere que esta respuesta de anticuerpos difiere dependiendo de si el antígeno fue timo dependiente o timo independiente. Este hecho puede explicar el por qué la respuesta inmune es mayor después de la inmunización con vacunas conjugadas.<sup>(1,13)</sup>

Para mejorar la primera generación de vacunas anti Hib, se han producido nuevas vacunas semisintéticas, estables y fácilmente reproducibles, que generan inmunidad en niños pequeños. Estas nuevas vacunas conocidas como vacunas conjugadas están hechas de material sacarídico de la cápsula de la bacteria unida covalentemente a una proteína transportadora. Los diferentes productos que así se han desarrollado difieren en el tamaño y el contenido de sacáridos bacterianos, la proteína transportadora y el tipo de enlace químico utilizado.<sup>(1,14)</sup>

Para poder desarrollar vacunas conjugadas proteína-sacárido es necesario entender la estructura química que sirve para unir los sacáridos a las proteínas. La selección del método se determina según el tamaño molecular del sacárido que se vaya a utilizar. Los polisacáridos requieren conjugación al azar y los monosacáridos pueden conjugarse por activación selectiva utilizando un sitio específico de la molécula para hacerlo. Actualmente esta última activación es la que se prefiere, debido a que estas moléculas actúan como mejores inmunógenos.<sup>(1)</sup>

Las cuatro vacunas conjugadas contra Hib autorizadas en diferentes países se muestran en la tabla 1.

#### a) Inmunogenicidad.

Se han llevado a cabo estudios con las cuatro vacunas conjugadas mostradas en la tabla 1, para determinar su inmunogenicidad en niños de 2-6 meses de edad. Es difícil la comparación directa de los estudios debido a los diferentes esquemas de vacunación, de toma de muestras y a las variaciones interlaboratorio en la medición de anticuerpos anti-PRP.<sup>(3)</sup>

Después de tres vacunaciones a edades de 2,4 y 6 meses, cada una de tres vacunas conjugadas (HbOC, PRP-OMP y PRP-T) produjo niveles protectores de anticuerpos anticapsulares. Un estudio en el que participaron 30,400 niños, reportó la inmunogenicidad comparada entre PRP-OMP, HbOC y PRP-T, y otros dos estudios compararon la inmunogenicidad de las cuatro vacunas conjugadas ( $p=0.05$ . Tabla 2). En este grupo de edad sólo la vacuna PRP-OMP produjo un incremento substancial de anticuerpos después de una dosis. La respuesta de anticuerpos entre los niños que siguieron una serie de tres vacunaciones con PRP-D es limitada y es menor que con HbOC, PRP-OMP o PRP-T.<sup>(3,15,16)</sup>

Las proteínas acarreadoras utilizadas en PRP-T, PRP-D y HbOC (pero no PRP-OMP) se

derivan de los toxoides empleados en la vacuna DTP. Se cuenta con datos limitados en los que se ha indicado que la administración a priori o concurrente de la vacuna DTP puede incrementar la respuesta de anticuerpos anti-PRP siguiendo la vacunación con estas vacunas Hib. Para niños, la inmunogenicidad de PRP-OMP aparentemente no se ve afectada por la ausencia de vacunación con DTP a priori o concurrente.<sup>(3)</sup>

b) **Eficacia.**

En la tabla 3 se presentan los resultados resumidos de los estudios de eficacia de las vacunas conjugadas antes de ser autorizadas. La vacuna PRP-D protegió a los niños finlandeses vacunados a los 3,4 y 6 meses de edad, pero esta vacuna no proporcionó una protección significativa a los niños nativos de Alaska vacunados a los 2,4 y 6 meses. En contraste, en los niños Navajo, otra población con un alto riesgo de enfermedad por *Haemophilus influenzae* tipo b, la vacunación con PRP-OMP fue altamente eficaz cuando se administró a los 2 y 4 meses de edad. También se observó una protección por poco tiempo después de una dosis individual de PRP-OMP dada a los 2 meses de edad, un hallazgo que correlaciona con la habilidad de esta vacuna a esa edad para incrementar la respuesta de anticuerpos en el suero después de una inyección.<sup>(3,11,17,18,19)</sup>

Tabla 2. Inmunogenicidad de tres vacunas contra *Haemophilus influenzae* tipo b entre niños. (3, WHEAT 42: 13,

1-15, 1963)

Vacuna + Estudio	Estado del estudio	Título de estudio (medida de inmunogenicidad)			
		Anticuerpo (título)	Resistencia (titulación)	Presencia de toxina	Resistencia celular
Estudio 1	Tennessee				
PRP-D		0.07	—	0.08	0.28
PRP-OMP		0.11	0.83	0.84	1.14
HbOC		0.07	0.09	0.13	3.08
PRP-T		0.10	0.05	0.30	3.84
Estudio 2	Alaska				
PRP-D		0.06	0.04	0.06	0.55
PRP-OMP		0.16	1.37	2.71	—
HbOC		0.15	0.07	0.59	13.70
PRP-T		0.18	0.06	0.32	2.46
Estudio 3	Minnesota/ Missouri/ Texas				
PRP-OMP		0.18	2.89	4.00	5.21
HbOC		0.17	0.11	0.45	6.31
PRP-T		0.25	0.19	1.25	6.37

\* Medido por radioinmunoensayo; - Datos no disponibles + En todos los estudios, la vacuna se administró a los 2, 4 y 6 meses de edad.

**Tabla 3. Eficacia de las vacunas de Hib conjugadas en niños.<sup>(3,17)</sup>**

Vacuna	Población	Diseño	Edad de la vacunación (meses)	% de eficacia <sup>A</sup>
PRP-D	Finlandia	Abierto, al azar	3,4,6	89 (70-96)
	Nativos de Alaska	Controlado con placebos, al azar.	2,4,6	35 (-57-73)
PRP-OMP	Navajo	Controlado con placebo, al azar.	2,4	93 (53-98) 100 (67-100)
HbOC	California	Abierto, parcialmente al azar.	2,4,6	100 (67-100)
	Finlandia	Abierto	4,6	97
PRP-T	California	Controlado, al azar.	2,4,6	***
	Reino Unido	Abierto, controlado.	2,3,4	++
	Finlandia	Controles históricos.	4,6	++

<sup>A</sup> Intervalo de confianza=95%

\*\*\* El estudio se suspendió antes de concluir.

++ Incluye casos que ocurrieron antes de los 18 meses de edad.

La eficacia de la vacuna HbOC fue evaluada en un estudio llevado a cabo al norte de California en el que participaron 61,080 niños. Después de un esquema de tres dosis la eficacia de la vacuna fue alta. La vacuna también puede proteger después de dos dosis, pero el reducido número de meses para el seguimiento entre la segunda y la tercera dosis y el correspondiente número pequeño de casos observados en los testigos no vacunados en este período limitó el análisis. No se observó protección significativa en este estudio después de una dosis de HbOC.<sup>(3,10,17,20)</sup>

Dos estudios al azar ( $n_1=5212$  y  $n_2=1035$ ) controlados para evaluar la eficacia de la vacuna PRP-T administrada a los 2,4 y 6 meses de edad fueron concluidos antes de lo previsto porque se eliminó el uso de placebos testigo. Por lo tanto, la licencia para PRP-T se basó principalmente en datos de inmunogenicidad. Sin embargo, en los dos estudios incompletos, no ocurrieron casos de enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* tipo b en los aproximadamente 6000 niños vacunados con PRP-T. Los resultados de otro estudio de eficacia hecho en el Reino Unido ( $n=107$ ) sugieren que el PRP-T es protector cuando se administra a los 2,3 y 4 meses de edad.<sup>(3, 16, 21, 22)</sup>

En un programa nacional de inmunización que se implementó en Finlandia en enero de 1990, se estudió la eficacia de la vacuna PRP-T. No se reportaron casos de enfermedad invasiva por Hib entre más de 97,000 niños que recibieron dos o más dosis de PRP-T. Dos niños desarrollaron la enfermedad después de una dosis de vacuna.<sup>(3,10,17,21-23)</sup>

En Estados Unidos de Norteamérica (E.U.A.), se han reportado de 30-50 casos de enfermedad invasiva por Hib entre niños que recibieron vacunación apropiada con la vacuna Hib conjugada y por lo tanto se esperaba que tuvieran niveles adecuados de anticuerpos protectores. Estos casos pueden representar un fracaso de la vacuna.<sup>(3,17)</sup>

De acuerdo con el Northern California Kaiser Permanent Medical Care Program (NCKPMCP), la aplicación de vacunas conjugadas contra Hib ha eliminado casi por completo la enfermedad causada por *Haemophilus influenzae* tipo b en su población de 2.5 millones de habitantes, semejando el efecto reportado en Finlandia. Hasta 1993 se habían aplicado en E.U.A. 38 millones de dosis de vacunas conjugadas (35 millones de HbOC y 3 millones de PRP-OMP), reportándose una disminución en la incidencia de la enfermedad por Hib, disminuyendo de 18,000 casos por año a menos de 1,300 en 1992. Esta disminución considerable en la incidencia de la enfermedad ha permitido un importante ahorro en los costos de atención médica, reportándose por el NCKPMCP un ahorro de 1.35 millones de dólares en su grupo de estudio, y se ha calculado un ahorro total en E.U.A. de 500 millones de dólares con la aplicación de las vacunas conjugadas, en 1992.<sup>(24)</sup>

### 3.3 VACUNA ANTIPERTUSSIS CON TOXOIDES DIFTERICO Y TETANICO ADSORBIDOS (DTP)

La vacuna de uso más común en todo el mundo para controlar la difteria, el tétanos y la tos ferina es la vacuna DTP, es decir, la mezcla tradicional de las preparaciones destoxificadas de las toxinas de *Corynebacterium diphtheriae* cepa PW8 y la de *Clostridium tetani*, con una suspensión de *Bordetella pertussis* celular inactivada, adsorbidos en un adyuvante apropiado de aluminio que puede ser hidróxido o fosfato, o bien hidróxido de calcio.<sup>(2)</sup>

#### 3.3.1 Toxoide Diftérico

El toxoide diftérico fue una de las primeras vacunas disponibles para protección contra la enfermedad bacteriana y su uso, ha reducido notoriamente la incidencia de la difteria.<sup>(25)</sup>

Las vacunas convencionales de toxina diftérica fueron preparadas inicialmente a través del crecimiento de las bacterias en un medio que contenía digerido de buey. Después de 36-48 horas o cuando la concentración de la toxina en el medio alcanzara de 0.375 a 0.625 mg/ml, el proceso de fermentación se completaba, las bacterias se removían por centrifugación y se añadía formaldehído al medio libre de células a una concentración final de 0.75%. La toxina que contenía el medio se mantenía a 37°C entre 4 a 6 semanas para permitir la destoxificación completa de la toxina.<sup>(2)</sup>

La cepa Parke Williams 8 de *Corynebacterium diphtheriae* ha demostrado ser satisfactoria para producir vacunas antidiftérica potentes. El toxoide diftérico es el producto derivado de la toxina obtenida de *Corynebacterium diphtheriae*, propagado en medio sumergido de Müller & Miller, la cual, mediante la reacción con formaldehído pierde toxicidad, conservando antigenicidad y especificidad; el toxoide se purifica por ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio. El objetivo que debe alcanzarse en la producción de la vacuna antidiftérica es obtener la mayor cantidad posible de toxina durante la fase de crecimiento de los microorganismos y posteriormente convertir la toxina en un toxoide estable.<sup>(25)</sup>

#### 3.3.2 Toxoide Tetánico

El toxoide tetánico es un producto derivado de la toxina obtenida del *Clostridium tetani*, cultivado en medio líquido de Latham, la cual es destoxificada por adición de formaldehído, perdiendo toxicidad y conservando su antigenicidad y especificidad.<sup>(25)</sup>

Para su empleo en el hombre se adsorbe en hidróxido de aluminio que actúa como adyuvante, para dar una respuesta inmunogénica más intensa y persistente.<sup>(25)</sup>

El toxoide tetánico es uno de los antígenos más inmunogénicos disponibles para protección contra enfermedades infecciosas. En los países desarrollados, el uso del toxoide tetánico ha disminuido notablemente la incidencia del tétanos, así como la demanda de antitoxina tetánica; sin embargo, en los países en vías de desarrollo es necesario trabajar más para incrementar su uso.<sup>(25,26)</sup>

Los factores biogeográficos y el desarrollo sociocultural y económico influyen sobre la incidencia de la enfermedad. Algunas condiciones que intervienen para el mantenimiento prolongado de las esporas del bacilo en concentraciones elevadas, son temperaturas medias anuales de 20-25°C, humedad relativa superior al 70%, abono de la tierra con materia fecal de animales y humanos, explosión demográfica y falta de servicios de seguridad social.<sup>(26)</sup>

La toxina tetánica se produce de una manera similar a la toxina diftérica, cultivando las bacterias en un medio semisintético (modificado del de Müller & Miller) en un fermentador durante una semana, hasta que las bacterias se lisan y liberan la toxina en el medio a concentraciones entre 0.15 a 0.2 mg/ml. El medio filtrado que contiene la toxina se destoxifica añadiendo formaldehído a una concentración final de 0.5% a un pH=7.6. Este se almacena a 37°C por 4 semanas para la completa destoxificación.<sup>(2)</sup>

Para purificar el toxoide tetánico, la preparación cruda se concentra por ultrafiltración y posteriormente fraccionamiento por uno o una combinación de los siguientes métodos: sulfato de amonio, diálisis, filtración en gel y cromatografía en DEAE-celulosa.<sup>(2)</sup>

### 3.3.3 Vacuna Pertussis

El tipo de vacuna pertussis más ampliamente utilizado es uno que consiste en células bacterianas completas, preparadas a través del cultivo de una cepa o cepas de *Bordetella pertussis*. Los microorganismos pueden crecer ya sea en un medio sólido, o más comúnmente en fermentadores con oportunidad de variación antigénica. Los cultivos bacterianos se inactivan por calor o por formaldehído, o ambos. Un almacenamiento prolongado en el frío se utiliza para reducir la toxicidad. La suspensión bacteriana posteriormente se estandariza para contener el antígeno protector en cantidades suficientes, un estimado de la potencia de no menos de 4 UI de actividad protectora con un límite superior de 20,000 x 10<sup>6</sup> organismos en una dosis humana individual. La estandarización se alcanza inmunizando ratones y por comparación con una vacuna de referencia. Esta vacuna pertussis debe administrarse como una suspensión bacteriana, o adsorbida en un adyuvante (tal como hidróxido de aluminio) que incrementa la respuesta inmune.<sup>(2)</sup>

Antes del descubrimiento de los diferentes serotipos de *Bordetella pertussis*, las primeras vacunas se elaboraban a partir de aislados frescos que eran predominantemente del tipo 1 y 2 y raramente del 3. Esto fue muy efectivo contra las cepas prevalentemente, pero condujo lentamente a la emergencia de los tipos 1 y 3 en muchos países. La eficacia de la vacuna cayó a un nivel bajo. Sin embargo, cuando todas las aglutininas fueron incorporadas en la vacuna, la eficacia fue de aproximadamente 95% con un esquema de inmunización primario completo de 3 dosis de la vacuna adsorbida.<sup>(2)</sup>

La vacuna Pertussis está compuesta por microorganismos muertos e inactivados por calor de *Bordetella pertussis*. Las cepas de *B. pertussis* deben seleccionarse de tal forma que la vacuna final incluya los aglutinógenos 1, 2 y 3.<sup>(25)</sup>

Las cepas de *Bordetella pertussis* se cultivan en medios semisintéticos, en fermentadores de diferentes capacidades; a los cultivos obtenidos de dichos fermentadores se les agrega ácido cítrico para concentrar el paquete celular, el cual es posteriormente inactivado a través de diversos ciclos de incubaciones tiempo-temperatura, con formalina, timerosal, almacenamiento a largo plazo a 2-8°C o alguna combinación de estos métodos. La inactivación de la vacuna incluye la muerte de la bacteria, sin destruir su inmunogenicidad, y la inactivación de la toxina termolábil.<sup>(2)</sup>

Se requieren cepas adecuadas de *B. pertussis* para producir la vacuna; estas cepas deben ser estables en subcultivos y proporcionar vacunas potentes con una mínima toxicidad. La selección de las cepas y la combinación son necesarias principalmente para asegurar que la vacuna terminada contiene los aglutinógenos 1, 2 y 3. Aunque los tres aglutinógenos son importantes en la protección contra la infección ocasionada por pertussis, la selección de la cepa, o de la combinación de las cepas es importante para reducir las reacciones adversas. Algunas cepas producen mayores cantidades de algunos aglutinógenos, por lo tanto la necesidad de un mayor contenido celular en la vacuna puede reducirse para incrementar su seguridad.<sup>(2)</sup>

En unión con los toxoides tetánico y diftérico, que se encuentran adsorbidos en hidróxido de aluminio, la vacuna Pertussis forma parte de la vacuna DTP.<sup>(25)</sup>

### **3.4 VACUNAS COMBINADAS.**

Una vacuna combinada contiene dos o más vacunas administradas en una sola inoculación. Debido a que los niños algunas veces reciben tres o más inyecciones en una sola visita, la disponibilidad de las vacunas combinadas puede evitar dichas inyecciones múltiples proporcionando tantas vacunas diferentes como sea posible en una sola inoculación, lo que redundará en una mayor aceptación y en un incremento de la cobertura de los niveles de vacunación en la población.<sup>(2,27,28)</sup>

Estas vacunas combinadas han establecido el principio de que una vacuna efectiva para la prevención de enfermedades, puede ser similarmente efectiva cuando se combina con otras vacunas. Existen tres formas para combinar vacunas:

- a) Mezclando los graneles de varias vacunas en un vial durante el proceso de fabricación, para tener un solo producto terminado.
- b) Llenando diferentes vacunas en compartimientos separados de una jeringa con dos compartimientos.
- c) Mezclando las vacunas de viales separados en el momento de su administración.<sup>(27,28)</sup>

El éxito en el desarrollo de cualquier vacuna combinada para una sola inyección depende de mantener la inmunogenicidad que induce cada componente de la vacuna al administrarse por separado, así como la inocuidad. La interferencia entre los componentes antigénicos en la vacuna combinada para inducir al sistema inmune debe ser mínima y también debe mantenerse una consistencia de lote a lote para la inducción de la inmunogenicidad.<sup>(2)</sup>

Cada antígeno que participará en la combinación debe seleccionarse de acuerdo con lo siguiente:

1. Cada componente de la vacuna debe recomendarse para ser administrado a la misma edad. Esto sólo puede establecerse a través de estudios clínicos.<sup>(27,28)</sup>
2. El producto final debe ser farmacéuticamente estable y aceptable en términos de interacciones físicas entre las vacunas individuales y otros componentes que se incluyan, es decir que la mezcla de las vacunas no debe afectar la estabilidad de los componentes durante su preparación y almacenamiento.<sup>(2,27,28)</sup>
3. La evaluación clínica debe incluir la determinación de la seguridad, tolerancia e inmunogenicidad sistémica y local en estudios bien controlados comparando la combinación con los componentes autorizados de la vacuna. La inmunogenicidad de cada vacuna en la combinación debe ser tan buena clínicamente como la de las vacunas administradas individualmente, basándose en ensayos serológicos para anticuerpos específicos para cada componente de la vacuna, o las correspondientes que miden otras fases de la inmunidad.<sup>(2,27,28)</sup>
6. Se debe considerar el volumen final de la vacuna. La mayor cantidad de vacuna que debe administrarse a un infante se encuentra entre 0.5 y 1.0 ml.<sup>(2)</sup>

7. La conveniencia para el uso. Las vacunas deben presentarse en la forma más simple posible para el médico y el usuario, en términos de un etiquetado claro con respecto a la edad de administración, identidad de los componentes de las vacunas y compatibilidad e incompatibilidad para la administración simultánea con otras vacunas.<sup>(27)</sup>

8. La selección de una combinación de vacunas debe llevarse a cabo para satisfacer las necesidades de cada Nación individual.<sup>(2)</sup>

Combinar vacunas es un proceso complejo, que consume tiempo; sin embargo, el resultado de estos programas, si es exitoso, será una reducción en el número de jeringas y agujas en los dos primeros años de vida de aproximadamente 15 a cinco, una sola inyección liberará varios antígenos, se simplificarán los esquemas de vacunación, y será más económico, con lo que se incrementarán las tasas de inmunización.<sup>(2,27,29)</sup>

Las vacunas del futuro indudablemente serán combinaciones de múltiples componentes. Estas pueden incluir DTP, vacuna inactivada contra la polio (IPV), vacuna contra hepatitis B (HB) y el componente de *Haemophilus influenzae* tipo b.<sup>(2,13)</sup>

### 3.5 VACUNAS COMBINADAS Hib-DTP.

Dado que las vacunas contra Hib han demostrado ser efectivas en la reducción de la incidencia de las enfermedades sistémicas causadas por Hib, es adecuado combinar estas vacunas con otros inmunógenos tales como la vacuna contra difteria, tétanos y pertussis (DTP), que se administra a los niños de rutina. En Estados Unidos de Norteamérica (E.U.A.), como en otros países, la vacuna contra Hib se administra a los 2, 4 y 6 meses de edad, concurrentemente con DTP, seguida por un refuerzo de ambas vacunas a la edad de 15 a 18 meses.<sup>(24)</sup>

Se han realizado diversos estudios en los cuales se han combinado algunas de las diferentes vacunas contra Hib conjugadas de las que se dispone actualmente, con la vacuna triple DTP.

En el NCKPMCP, se desarrolló un estudio al respecto que involucró a más de 10,000 niños. Se hicieron comparaciones entre niños de 2, 4 y 6 meses, que recibieron inyecciones de HbOC y DTP separadas y niños que recibieron una sola inyección de 0.5 ml de ambos productos combinados. Los resultados inmunológicos de este estudio reflejan que los títulos de anticuerpos son muy semejantes a los de los receptores de HbOC y DTP separados en estudios similares.<sup>(24)</sup>

En otro estudio que se llevó a cabo en E.U.A. con 150 niños que recibieron inmunizaciones a los 2, 4 y 6 meses con las vacunas HbOC y DTP combinadas o por separado, se demostró que los niveles de anticuerpos para PRP y DTP fueron significativamente mayores ( $p=0.05$ ) en los niños que recibieron la vacuna combinada, en comparación con aquéllos que recibieron las vacunas por separado. En esencia parecía existir una sinergia entre estos antígenos en la mezcla. La razón de esta reacción no pudo ser explicada.<sup>(24)</sup>

En diversos estudios se ha observado que al administrar la vacuna contra *Haemophilus influenzae* b conjugada con toxoide tetánico (PRP-T) combinada con la vacuna triple DTP se presenta un fenómeno de interferencia anti-pertussis. En un estudio participaron 278 infantes, de los cuales 222 concluyeron el protocolo completo. Uno de tres regímenes se administró a los participantes del estudio, a las edades de 2, 4 y 6 meses. El grupo 1 recibió DTP mezclado en la misma jeringa con PRP-T. El grupo 2 recibió DTP y PRP-T en sitios de inyección separados y el grupo 3 recibió PRP-

T sin DTP. En contraste con el grupo 3, que recibió la vacuna DTP sin la vacuna PRP-T, los dos grupos que recibieron la vacuna DTP con PRP-T exhibieron títulos ligeramente menores para los anticuerpos anti-toxoides diftérico después de la segunda y tercera dosis. No se detectaron diferencias significativas ( $p=0.05$ ) entre los títulos de anticuerpos anti-toxoides tetánico de los tres grupos. Sin embargo, la administración concurrente de la vacuna PRP-T con DTP, ya sea en la misma jeringa, o en diferentes sitios, interfirió con la respuesta anti-pertussis en las series primarias de las inmunizaciones. Además, en el grupo que recibió ambas vacunas mezcladas en la misma jeringa se observó que los títulos anti-PRP se deprimieron en un 60% con respecto a los dos grupos restantes. Estas observaciones constituyeron la primera demostración de interferencia mutua con las respuestas inmunes al administrarse en la misma jeringa las vacunas Hib y DTP, y también la primera demostración de que una vacuna contra Hib puede interferir en la respuesta inmune de otra vacuna administrada concurrentemente, incluso al administrar ambas vacunas en sitios separados.<sup>(29)</sup>

En Chile se llevó a cabo un estudio en el que participaron 278 niños, los cuales fueron distribuidos en tres grupos: Grupo A, recibió PRP-T mezclado con DTP en una misma jeringa; Grupo B, PRP-T administrado en un brazo y DTP en el otro; Grupo C, DTP en un brazo, y un placebo en el otro. Los infantes fueron inmunizados a los 2, 4 y 6 meses de edad. Después de tres dosis de vacunas, se observó que los niños que recibieron la vacuna PRP-T como una inoculación separada tuvieron un título medio geométrico para PRP significativamente mayor ( $p=0.05$ ) que los niños que recibieron la vacuna PRP-T combinada con DTP en una sola jeringa. Sin embargo, finalmente se encontró que ambas vacunas interactuaron de tal forma que la inmunogenicidad del PRP-T se vio disminuida.<sup>(30)</sup>

Se ha demostrado que la adsorción de PRP-T a un adyuvante con hidróxido de aluminio reduce la respuesta a los componentes PRP y toxoides tetánico de la vacuna conjugada. Dicha interpretación puede explicar las menores respuestas anti-PRP observadas en los estudios mencionados en los dos párrafos anteriores al mezclar las vacunas PRP-T y DTP en la misma jeringa. Esto sugiere que este tipo de interacción también condujo a respuestas disminuidas de la vacuna DTP cuando ambas vacunas se administraron en la misma jeringa. Sin embargo, la base biológica de dichas observaciones aún permanece sin explicación.<sup>(24, 29)</sup>

En otros estudios se han observado efectos contrarios a los mencionados anteriormente, como es el caso de un trabajo realizado en Nueva Orleans, el cual involucró a 150 niños sanos de dos meses de edad, que fueron distribuidos al azar en tres grupos, para ser vacunados a los 2, 4 y 6 meses de edad con una de las siguientes condiciones: Grupo 1, recibió la vacuna PRP-T reconstituida con DTP; Grupo 2, PRP-T y DTP administradas en diferentes sitios de inyección; Grupo 3, HbOC y DTP en sitios separados. Las concentraciones medias de anticuerpos para la fracción pertussis no difirieron significativamente entre los tres grupos en ningún momento. Para los anticuerpos anti-toxinas diftérica y tetánica, no se observaron diferencias significativas entre los grupos PRP-T (1 y 2). Sin embargo, después de la 2a. y 3a. dosis, los receptores de HbOC tuvieron concentraciones medias de anticuerpos anti-toxinas tetánica y diftérica mayores que las de los grupos 1 y 2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración media de anticuerpos anti-PRP entre los receptores de la inyección combinada PRP-T/DTP y los que recibieron PRP y DTP de forma separada después de una, dos y tres dosis. Este hallazgo contrasta con los datos obtenidos en Chile; además, se observó que la concentración media de anticuerpos anti-PRP después de dos dosis fue mayor para los receptores de la vacuna PRP-T (grupos 1 y 2) que para los de la vacuna HbOC (grupo 3). Después de tres dosis se observó algo similar, pero la concentración fue significativamente mayor sólo para los receptores de PRP-T/DTP.<sup>(31)</sup>

En Canadá se llevó a cabo un estudio con 367 niños de 18 a 19 meses de edad, los cuales

anteriormente habían recibido una inmunización primaria con PRP-T. Se formaron dos grupos; en el grupo 1 se incluyeron los niños que recibieron una inyección combinada de PRP-T/DTP mezcladas en una jeringa y en el grupo 2, los que recibieron inyecciones separadas de estos dos productos. El estudio demostró que las vacunas DTP y PRP-T pueden combinarse en una sola jeringa para una administración conveniente sin evidencias de interferencia en la respuesta inmune de los antígenos individuales. No se observaron diferencias para ninguno de los antígenos probados, incluyendo PRP, pertussis y las antitoxinas tetánica y diftérica.<sup>(32)</sup>

En el Reino Unido se realizó un estudio en el que participaron 175 niños con edades entre las 8 y las 12 semanas, los cuales recibieron la vacuna DTP mezclada con HbOC (n=75), o con PRP-T (n=100) en la misma jeringa. El grupo seleccionado para la comparación de los resultados, fue uno formado por niños que recibieron las vacunas DTP y Hib en la misma visita, pero en brazos separados. No se observaron diferencias significativas ( $p=0.05$ ) en los títulos de anticuerpos anti-PRP, anti-pertussis y anti-toxina diftérica entre los niños que recibieron las vacunas Hib y DTP combinadas o separadas. En contraste, los títulos de anticuerpos anti-toxina tetánica fueron significativamente mayores en aquéllos que recibieron las vacunas Hib y DTP mezcladas en la misma jeringa en comparación con el grupo que las recibió separadas.<sup>(33)</sup>

En un estudio en el que la vacuna conjugada era PRP/toxoide diftérico conjugado (PRP-D), los niños que recibieron esta vacuna combinada con DTP produjeron cantidades significativamente menores ( $p=0.05$ ) de anticuerpos anti-toxoide diftérico y de anti-pertussis, que aquéllos que recibieron PRP-D y DTP como inmunógenos separados.<sup>(24)</sup> La interferencia con los anticuerpos antipertussis también se encontró en otro estudio con la vacuna combinada PRP-D/DTP, para el cual se incluyeron 175 niños, entre los 18 y los 19 meses de edad, de los cuales 109 recibieron ambas vacunas combinadas y 66 las recibieron en sitios separados. En este caso no se observaron diferencias significativas en cuanto a los títulos de anticuerpos anti-PRP, anti-toxoide diftérico, ni anti-toxoide tetánico; sin embargo, los títulos de aglutininas anti-pertussis fueron menores en los receptores de la vacuna combinada, que en los receptores de las vacunas separadas.<sup>(24,34)</sup>

En Gambia se llevó a cabo un estudio que involucró a 126 infantes gambeses, de los cuales 60 recibieron la vacuna PRP-OMP mezclada con DTP en la misma jeringa, 66 recibieron las vacunas por separado a las 8, 12 y 16 semanas de edad. Los títulos medios geométricos de la fracción PRP fueron idénticos para ambos grupos y las concentraciones de anticuerpos anti-difteria, anti-tétanos y anti-pertussis no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos.<sup>(35)</sup>

### 3.6 REQUERIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD PARA LAS VACUNAS Hib Y DTP.

#### 3.6.1 Vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b.

Las características comunes de las vacunas conjugadas *Haemophilus influenzae* tipo b son que contienen determinantes antigénicos capaces de estimular la producción de anticuerpos IgG séricos contra el polisacárido de *H. influenzae* tipo b, y que son capaces de producir una respuesta de refuerzo en los niños pequeños previamente inmunizados. Como se emplean diferentes métodos de producción, las vacunas conjugadas *H. influenzae* tipo b producidas por distintos fabricantes difieren en su composición química, de modo que ciertas pruebas de control deben ser específicas respecto del producto.<sup>(7)</sup>

Por la misma razón, las normas para las vacunas conjugadas *Haemophilus influenzae* tipo b deben tener en cuenta las diferencias que presenta la composición de las vacunas.<sup>(7)</sup>

Actualmente, la norma internacional que establece los requisitos que deben cumplir las vacunas *Haemophilus influenzae* b, es el el reporte técnico N°814, publicado por la Organización Mundial de

la Salud en 1991. En este reporte se señalan los controles que se deben aplicar durante la producción de la vacuna, en la etapa de granel y como producto terminado. En el caso del presente trabajo, sólo es de interés considerar las pruebas de control efectuadas al producto terminado, ya que éste fue proporcionado por los proveedores en esta presentación. Las pruebas que deben realizarse son las siguientes: Identificación, esterilidad, contenido de polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b, actividad, inmunogenicidad, contenido de humedad, contenido de sustancias pirógenas, contenido de coadyuvantes, contenido de agentes conservadores, inocuidad, estabilidad e inspección de los envases definitivos.<sup>(7)</sup>

Además de las pruebas mencionadas en el párrafo anterior, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6ª edición indica que se deben realizar las determinaciones del contenido de ADN y del contenido de proteínas.

### 3.6.2 Vacuna triple DTP.

La Organización Mundial de la Salud, en su reporte técnico N° 800 de 1990, establece las pruebas de control que deben efectuarse a las vacunas tetánica, diftérica y pertussis por separado, así como a la vacuna combinada DTP. Al igual que para la vacuna *Haemophilus* tipo b, en este reporte se incluyen los controles que se deben aplicar durante la producción de cada una de las vacunas, en las etapas de granel y como productos terminados, ya sean separadas, o combinadas.

Las pruebas de control que deben efectuarse a cada uno de estos productos terminados, son las siguientes: identidad, esterilidad, potencia, inocuidad, contenido de adyuvante, contenido de preservativo, pH, estabilidad, e inspección de los envases finales.<sup>(25)</sup>

A la vacuna DTP como producto terminado deben efectuársele las siguientes pruebas de control: potencia, toxicidad específica, identidad, potencia e inocuidad.<sup>(25)</sup>

La autoridad Nacional de Control, adicionalmente a sus responsabilidades con respecto a cada vacuna individual, incluyendo la liberación y la certificación, debe aprobar:<sup>(25)</sup>

- La formulación de la vacuna combinada para asegurar que los componentes estén presentes en las concentraciones apropiadas para su uso.
- La formulación incluyendo el preservativo y el adyuvante para asegurar que la estabilidad de la vacuna es tal que permanece efectiva hasta la fecha de caducidad, teniendo en cuenta que se ha almacenado a la temperatura recomendada, y
- Los protocolos para reportar los resultados de las pruebas aplicadas a la vacuna combinada.<sup>(25)</sup>

### 3.7 TECNICA DE ELISA

El desarrollo de la metodología inmunoenzimática ha tenido una gran difusión debido a que permite cuantificar con una buena sensibilidad componentes de interés biológico.

Los inmunoensayos utilizan a los anticuerpos como reactivos analíticos. Los ensayos se basan en la observación de que en un sistema que contiene el analito y un anticuerpo específico, la distribución del analito entre el enlace y las formas libres se puede relacionar cuantitativamente a la concentración total del analito.<sup>(36)</sup>

Las técnicas inmunoenzimáticas se basan en dos tipos de procedimientos:

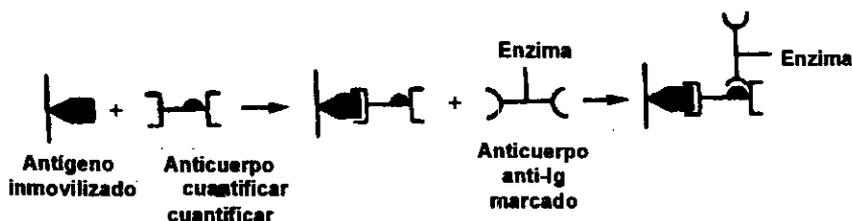
- 1) Se necesita una fase sólida para inmovilizar el antígeno o el anticuerpo asociado a la enzima y permitir así la evaluación de la actividad enzimática del complejo antígeno-anticuerpo-enzima (Cuantificaciones en fase heterogénea).<sup>(36)</sup>
- 2) Un procedimiento en el que no se necesita ninguna separación, porque la cuantificación del complejo antígeno-anticuerpo-enzima se efectúa directamente en la mezcla de reacción y es modificada su actividad según la extensión de la reacción antígeno-anticuerpo (cuantificaciones en fase homogénea).<sup>(36)</sup>

Las cuantificaciones inmunoenzimáticas en fase heterogénea fueron descritas para la cuantificación de antígenos y rápidamente se aplicaron a la cuantificación de anticuerpos. El nombre de ELISA ("Enzyme-linked-immunosorbent-assay") (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) se emplea actualmente para todas las determinaciones que utilizan enzimas marcadoras.<sup>(36)</sup>

Las reacciones inmunológicas se utilizan para ensayos o procedimientos de detección debido a que pueden dar altos niveles de especificidad y sensibilidad. Se ha encontrado que los anticuerpos o antígenos marcados son particularmente útiles para el ensayo de sustancias biológicas.<sup>(36)</sup>

En el presente trabajo la técnica de ELISA se utilizó para la cuantificación de anticuerpos, por lo que sólo se describirá esta aplicación, a pesar de que ésta es una técnica muy versátil.<sup>(36)</sup>

Según este procedimiento, los anticuerpos que se van a cuantificar se incuban para reaccionar en un primer tiempo con el antígeno inmovilizado, el cual previamente se adsorbió a la fase sólida (microplaca); después de los lavados necesarios para eliminar los anticuerpos que no reaccionaron, la preparación se incuba con un segundo anticuerpo (antiinmunoglobulina) marcado con una enzima, el cual se dirige hacia el anticuerpo específico que se va a detectar (vgr. si el anticuerpo inicial se obtuvo en conejos se debe utilizar una gamma globulina anticonejo), ya que mide la cantidad de anticuerpo fijada sobre el antígeno; siguiendo el período de incubación y de lavado, la preparación reacciona con el sustrato de la enzima y se obtiene un producto de reacción colorido, el cual puede medirse espectrofotométricamente con facilidad. La actividad enzimática es elevada cuando hay muchos anticuerpos marcados fijados, es decir, muchos anticuerpos que han reaccionado en el primer tiempo. Entonces, la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de anticuerpo que se va a detectar. (Figura 1).<sup>(36)</sup>



**Figura 1. Cuantificación de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA**

## 4. MATERIAL Y METODOS

### 4.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

#### 4.1.1 Material.

##### 4.1.1.1 Material biológico.

- Vacunas contra *Haemophilus influenzae* tipo b:

HbOC. Proveedor A.

PRP-D. Proveedor B.

PRP-OMP. Proveedor C.

PRP-T<sup>(a)</sup>. Proveedor D.

PRP-T<sup>(b)</sup>. Proveedor E.

- Vacuna DTP-Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud. Lote 198-12. Caducidad: Junio de 1996.

- Conejos hembras de la cepa NZW de 1.5 a 2.0 Kg de peso (3 meses de edad).

- Ratones albinos hembras de la cepa NIH de 16 a 18 g de peso (4 semanas de edad).

- Ratones albinos hembras de la cepa NIH de 10 a 18 g de peso (4 semanas de edad).

- Cobayos hembras de la cepa Hartley de 400 a 500 g de peso.

- Conjugado Sigma (IgG de cabra  $\alpha$ -inmunoglobulinas de conejo acopladas a peroxidasa).

- Conjugado Sigma (IgG de borrego sheep  $\alpha$ -inmunoglobulinas de ratón acopladas a peroxidasa).

- Conjugado Boehringer (IgG de chivos goat  $\alpha$ -inmunoglobulinas de ratón acopladas a peroxidasa).

- Conjugado Sigma Bio-sciences (IgG de chivos  $\alpha$ -inmunoglobulinas de ratón acopladas a peroxidasa).

- Toxina diftérica INH. Lote TD-01.

- Toxina tetánica INH. Lote TD-117.

- Vacuna pertussis de referencia LNSP.

- Cepa 18323 liofilizada de *Bordetella pertussis*

#### **4.1.1.2 Material de laboratorio.**

- Jeringas Becton Dickinson desechables de 1, 5 y 10 ml.
- Tubos de ensayo de 13x100 Kimax y Pyrex.
- Gradillas metálicas.
- Torundas de algodón Kendall.
- Aplicadores de madera.
- Criotubos Nunc con capacidad para 1.8 ml.
- Micropipetas de 10 a 100 ml y de 100 a 1000 ml Socorex.
- Puntas para micropipetas.
- Placas de poliestireno de fondo plano, para ELISA, con 96 pozos, Nunc.
- Micropipeta multicanal Costar.
- Papel aluminio.
- Pipetas graduadas de vidrio Kimax, de 1, 5 y 10 ml.
- Matraces volumétricos de vidrio, Kimax de 50, 100 y 250 ml.
- Probetas graduadas de 250 y 100 ml, Pyrex.
- Guantes de látex para cirujano.

#### **4.1.2 Equipo**

- *Centrífuga refrigerada Beckman modelo JT-6. Serie 8354*
- Estufa Hotpack sin modelo a 37°C
- Balanza analítica Sartorius modelo 2462. Máx. 200 g.
- Balanza analítica Mettler modelo AT20. Máx. 22 g.
- Potenciómetro Corning modelo 12.
- Lector de ELISA SLT Spectra tipo Spectra Shell.
- Impresora Epson LX-300 Quiet color.
- Rasuradora eléctrica Braun.
- Programa de cómputo para llevar a cabo los cálculos del método de Wilson y Worcester

para la potencia de la fracción pertussis.

#### 4.1.3 Reactivos

- Etanol Merck grado reactivo.
- Cloruro de sodio Merck grado reactivo.
- Fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) Merck grado reactivo.
- Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) Merck grado reactivo.
- Leche descremada Svelty de Nestlé.
- Tween 20 Sigma grado reactivo.
- Citrato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ) JT Baker grado reactivo.
- Acido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) JT Baker grado reactivo.
- O-fenilendiamina ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2$ ) Sigma grado analítico.
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) JT Baker grado reactivo.
- Acido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) Merck grado reactivo.
- Borato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) Mallinckrodt grado reactivo.
- Acido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) JT Baker grado reactivo.
- Almidón.
- Oxido de zinc ( $\text{ZnO}$ ) Monterrey grado reactivo.
- Sulfuro de bario ( $\text{BaS}$ ) grado reactivo.
- Peptona Difco.
- Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) Baker grado reactivo.
- Proteosa-peptona Difco.
- Agar bacteriológico Difco.
- Aminoácidos de caseína Difco.
- Papas crudas.

## 4.2 METODOS Y TECNICAS

El diseño de este estudio es en bloques al azar.

### 4.2.1 Estandarización de los esquemas de inmunización de los animales para la titulación de la fracción Hib y de las condiciones para la técnica de ELISA.

Antes de probar las combinaciones de las vacunas Hib/DTP fue necesario estandarizar las condiciones bajo las cuales se llevaría a cabo la titulación de los sueros para la potencia de la fracción Hib, ya que por el momento no existe un método oficial al respecto.

Las condiciones generales de la prueba (tipo de microplacas, lector de placas, soluciones de lavado, sustrato de la enzima y soluciones reguladoras, temperatura y tiempos de incubación y de lavado) se fijaron de acuerdo con lo establecido por Temynck Th. y Avrameas S.<sup>(36)</sup> Estas condiciones se fijaron en un trabajo previo (Sánchez Mellado, G. tesis profesional).

#### 4.2.1.1 Esquemas de inmunización.

Se probó un esquema de inmunización para conejos hembras de la cepa NZW, de 2.5 a 3.0 Kg de peso, y dos para ratones albinos hembras de la cepa NIH, de 16 a 18 g de peso. Los esquemas son los siguientes:

##### a) CONEJOS.

Se formaron 2 grupos de 3 conejos cada uno. El grupo A fue inmunizado con PRP y el grupo B fue inyectado con solución salina al 0.85%. (Tabla 4)

Tabla 4. ESQUEMA DE INMUNIZACION DE CONEJOS CON PRP.

GRUPO	TIEMPO (DÍAS)	ALIMENTO	DOSA (mg PRP)
1	0	VACUNA DE PRP CONJUGADA O SOLUCION SALINA	0.5 ml (10 mg)
2	15		0.5 ml (10 mg)
3	30		0.5 ml (10 mg)
4 (CONTROL)	45		0.5 ml (10 mg)

Se inmunizaron conejos de la cepa NZW de 2.5 a 3.0 Kg de peso, los que fueron inmunizados por vía

intramuscular.

b) RATONES

Se formaron 2 grupos de 10 ratones cada uno para cada esquema de inmunización. El grupo A fue inmunizado con PRP y el grupo B fue inyectado con solución salina al 0.85%. (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. ESQUEMA DE INMUNIZACION DE RATONES CON PRP. (Esquema 1)

GRUPO	EDAD (DÍAS)	INMUNIZACION	DOSIS (ml)
1	0	VACUNA DE PRP CONJUGADA O SOLUCION SALINA	0.1 ml (2 mg)
2	7		0.1 ml (2 mg)
3	14		0.1 ml (2 mg)
	21		0.1 ml (2 mg)

Se inmunizaron ratones de la cepa NIH de 10.0 a 18.0 g de peso, los que fueron inmunizados por vía intraperitoneal.

**Tabla 6. ESQUEMA DE INMUNIZACION DE RATONES CON PRP. (Esquema 2)**

1	0	VACUNA DE PRP CONJUGADA O SOLUCION SALINA	0.1 ml (2 mg)
2	15		0.13 ml (2.5 mg)
3	30		0.13 ml (2.5 mg)
	37		0.13 ml (2.5 mg)

Se inmunizaron ratones de la cepa NIH de 10.0 a 18.0 g de peso, los que fueron inmunizados por vía intraperitoneal

Llegado el tiempo de cada sangría, se extrajeron 10.0 ml de sangre por punción cardiaca a cada uno de los conejos, y una cantidad suficiente a cada ratón por medio de la vena caudal. La sangre se separó y se incubó a 37°C durante 30 minutos, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, se separó, se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos, se separó el suero del plasma, y se distribuyó en alícuotas de 1 ml, las cuales se almacenaron en criotubos a -70°C hasta el momento de su uso, para la titulación por medio de la técnica de ELISA.

#### 4.2.1.2 Técnica de ELISA.

Titulación de los antígenos y de los conjugados.

Se probaron los antígenos HbOC y PRP-T a 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 mg/ml, tanto para los sueros de conejo, como para los de ratón.

Para la titulación de los sueros de conejo se probó el conjugado IgG de cabra  $\alpha$ -inmunoglobulinas Sigma de conejo acopladas a peroxidasa en las siguientes diluciones: 1:1000, 1:2000 y 1:2500.

Para la titulación de los sueros de ratón se probaron los siguientes 4 conjugados: anti-IgG de ratón desarrollado en borrego sheep de Sigma; anti-IgS polivalente de ratón desarrollado en chivos goat de Sigma; anti-IgG de ratón desarrollado en chivos Goat, de Boehringer y anti-IgG de ratón desarrollado en chivos, de Sigma Bio-Sciences. Todos se titularon en las siguientes diluciones: 1:10, 1:100, 1:500, 1:800, 1:1000, 1:1500 y 1:2000.

Cada uno de los sueros de conejo y de ratón se probó por separado bajo las condiciones antes

expuestas, de acuerdo con la siguiente metodología:

#### 4.2.1.2.1 Sensibilización de las placas

a) Se adicionó 0.1 ml del antígeno correspondiente, a un número necesario de pozos de poliestireno de placas para ELISA y 0.1 ml de solución de PBS-leche a los pozos testigo que no contenían el antígeno.

b) Cada una de las placas se incubó a 37°C durante 1 hora.

c) Transcurrido ese período, las placas se mantuvieron en refrigeración (2-8°C) durante 24 horas.

#### 4.2.1.2.2 Titulación de los sueros

4.2.1.2.2.1 Se eliminaron las soluciones del antígeno remanente mediante succión con una micropipeta multicanal.

4.2.1.2.2.2 Se lavaron los pozos con 0.1 ml de PBS-T.

4.2.1.2.2.3 El amortiguador de lavado permaneció en los pozos durante 3 minutos. Al cabo de este tiempo se eliminó la solución de la manera descrita en 4.2.1.2.2.1; este proceso se repitió dos veces más, con el fin de eliminar el antígeno que no se adsorbió a la fase sólida.

4.2.1.2.2.4 Se agregaron 0.2 ml de PBS-leche al 1% a todos los pozos y se incubaron a 37°C por una hora para permitir que la leche reabriera los sitios en los que no se adsorbió el antígeno.

4.2.1.2.2.5 Se repitió el paso 4.2.4.2.2.1.

4.2.1.2.2.6 Se adicionó 0.1 ml de la dilución correspondiente de cada uno de los sueros obtenidos de los conejos o ratones a un número suficiente de pozos para titular por duplicado a cada uno de éstos; se emplearon las siguientes concentraciones de los sueros obtenidos de los conejos o de los ratones, según correspondiera al conjugado de prueba: sin diluir; 1:10; 1:100; 1:500 y 1:1000. En los testigos negativos para los sueros se adicionó 0.1 ml de PBS-leche al 1%.

4.2.1.2.2.7 Cada una de las placas se incubó a 37°C durante una hora y media para que se llevara a cabo la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ab).

4.2.1.2.2.8 Se repitieron los pasos 4.2.4.2.2.1 y 4.2.4.2.2.2 para eliminar el exceso de suero que no hubiera reaccionado.

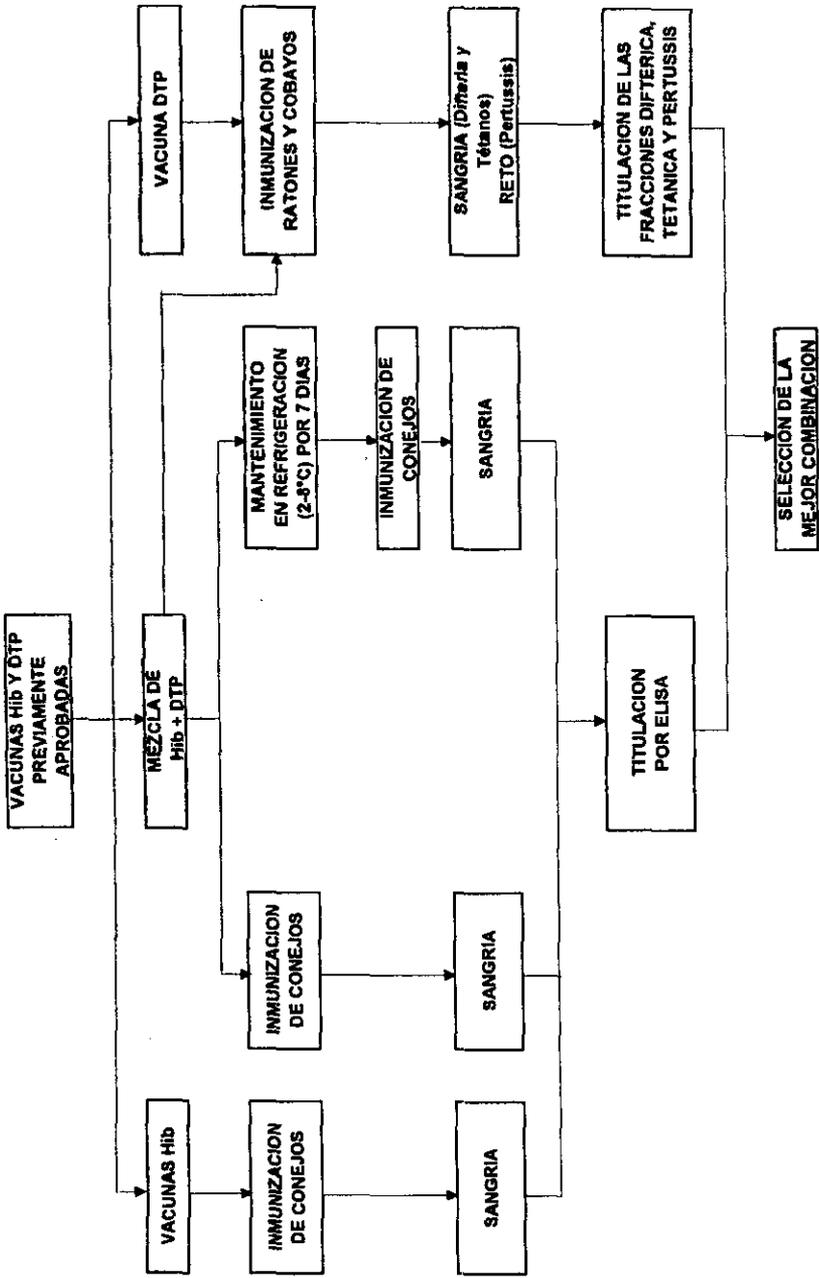
4.2.1.2.2.9 Se adicionó 0.1 ml del conjugado de prueba a todos los pozos, excepto a los testigos negativos para el conjugado.

4.2.1.2.2.10 Las placas se incubaron a 37°C por una hora.

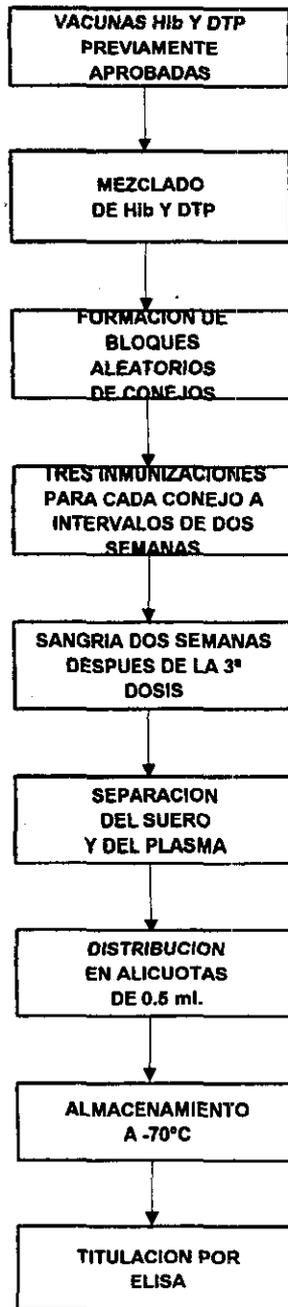
4.2.1.2.2.11 Se repitieron los pasos 4.2.4.2.2.1 y 4.2.4.2.2.2 para eliminar el exceso de conjugado que no hubiera reaccionado.

4.2.1.2.2.12 Se adicionó 0.1 ml de una solución recién preparada del sustrato de la enzima a

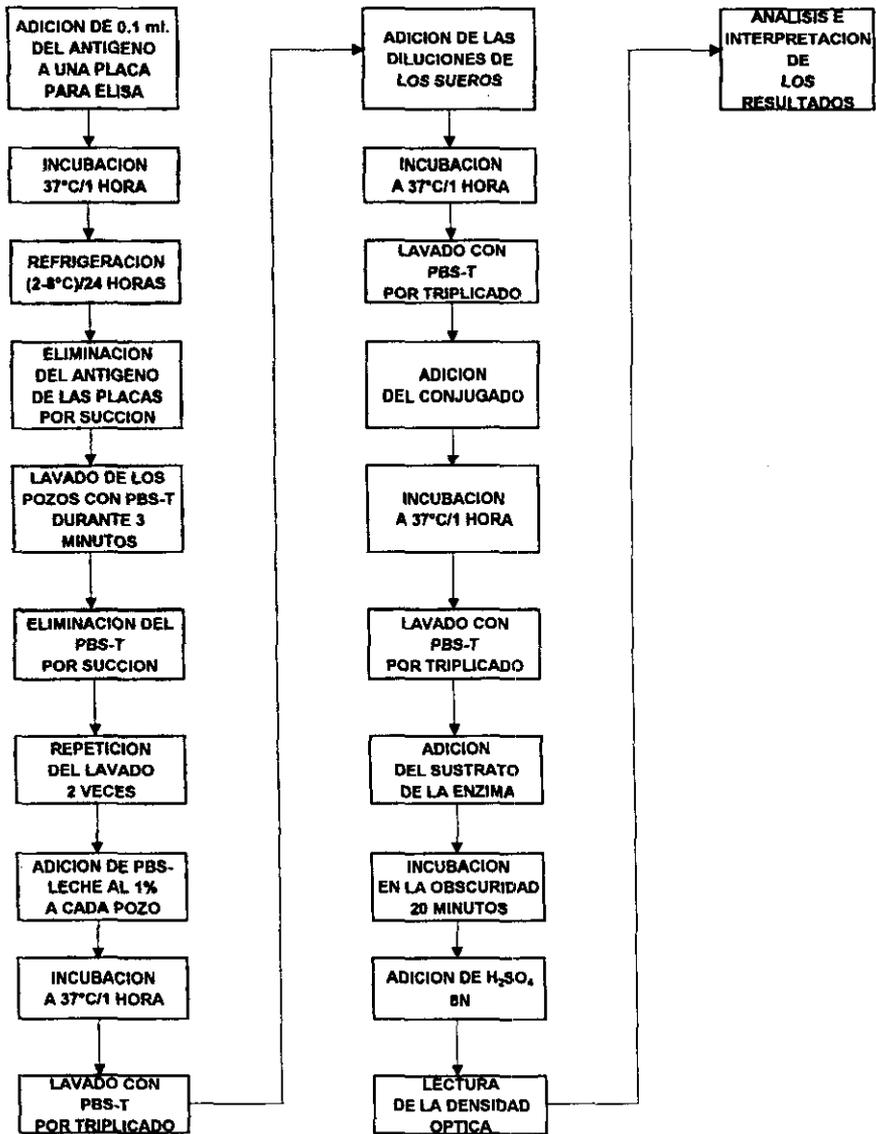
DIAGRAMA DE FLUJO 1. DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL



**DIAGRAMA DE FLUJO 2.  
INMUNIZACION DE LOS CONEJOS Y CONSERVACION DE LOS SUEROS**



**DIAGRAMA DE FLUJO 3.  
TITULACION DE LOS SUEROS POR MEDIO DE LA TECNICA DE ELISA**



cada uno de los pozos.

**4.2.1.2.2.13** Las placas se incubaron en la obscuridad para permitir la reacción enzimática y el consecuente desarrollo de color durante 20 minutos.

**4.2.1.2.2.14** La reacción enzimática se detuvo adicionando 12 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8N a cada pozo.

**4.2.1.2.2.15** Las lecturas de densidad óptica se llevaron a cabo a 492 nm en un lector de ELISA y se imprimieron.

**4.2.1.2.2.16** Se analizaron todas las lecturas obtenidas para cada caso, y se seleccionó el mejor modelo animal (conejo o ratón), así como la mejor dilución del mejor conjugado y la mejor dilución de cada uno de los dos antígenos de prueba.

**4.2.1.2.2.17** Con las condiciones seleccionadas se realizaron 45 repeticiones de la prueba, para calcular el coeficiente de variación (precisión) y el límite de detección del método, así como 20 repeticiones para calcular el coeficiente de variación (precisión) del sistema.

La regla de decisión se basa en lo especificado en el Manual de Procedimientos de validación de métodos analíticos de la Gerencia General de Biológicos y Reactivos.<sup>(41)</sup>

#### **4.2.2** COMBINACION DE LAS VACUNAS.

Cada frasco de cada una de las siguientes vacunas contra Hib:

HbOC.  
PRP-D.  
PRP-OMP y  
PRP-T<sup>(b)</sup>.

Se reconstituyó con 0.5 ml de vacuna DTP.

Cada frasco de la vacuna PRP-T<sup>(a)</sup> se reconstituyó con 5 ml del solvente destinado para ésta, y cada 0.5 ml de esta vacuna rehidratada se mezclaron en una jeringa con 0.5 ml de vacuna DTP.

Dichas combinaciones se mezclaron hasta obtener soluciones homogéneas y se utilizaron para inocular a los conejos por vía intramuscular para las pruebas de potencia de Hib, cobayos para las pruebas de potencia de los toxoides diftérico y tetánico y ratones para las pruebas de potencia del toxoide diftérico y de la fracción pertussis.

**NOTAS:** 1) Cada uno de los componentes individuales de cada formulación aprobó previamente las pruebas de control de calidad respectivas.

2) \*Hib es la fracción que contiene la parte antigénica de *Haemophilus influenzae* tipo b (PRP).

#### **4.2.3** INMUNIZACION DE LOS CONEJOS.

Se formaron diez grupos con dos conejos hembras por grupo, de la cepa NZW de 1.5 a 2 Kg de peso cada uno, y se distribuyeron las vacunas de la siguiente manera (tabla 7):

**Tabla 7. Distribución de las vacunas Hib y de sus respectivas combinaciones con DTP a los 10 grupos de conejos.**

GRUPO	VACUNA
1	HbOC
2	HbOC+DTP
3	PRP-D
4	PRP-D+DTP
5	PRP-OMP
6	PRP-OMP+DTP
7	PRP-T <sup>(a)</sup>
8	PRP-T <sup>(a)</sup> +DTP
9	PRP-T <sup>(b)</sup>
10	PRP-T <sup>(b)</sup> +DTP

PRP-T<sup>(a)</sup>: Vacuna del proveedor D.

PRP-T<sup>(b)</sup>: Vacuna del proveedor E.

Cada uno de los conejos recibió tres dosis de la combinación correspondiente por vía intramuscular en el muslo posterior derecho o izquierdo (alternados) a intervalos de 15 días, y dos semanas después de la tercera dosis, se sangraron los conejos por punción cardíaca, hasta obtener 10 ml de sangre.

La sangre se separó y se incubó a 37°C durante 30 minutos, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, se separó, se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos, se separó el suero del plasma, y se distribuyó en alícuotas de 1 ml, las cuales se almacenaron a -70°C hasta el momento de su uso, para la titulación por medio de la técnica de ELISA.

#### **4.2.4 PRUEBAS DE POTENCIA PARA LA FRACCIÓN Hib (TECNICA DE ELISA).**

##### **4.2.4.1 Sensibilización de las placas**

- Se adicionó 0.1 ml del antígeno\*, a un número necesario de pozos (Ver figura 1) de poliestireno de placas para ELISA y 0.1 ml de solución de PBS-leche a los pozos testigo que no contenían el antígeno.
- Cada una de las placas se incubó a 37°C durante 1 hora.
- Transcurrido ese período, las placas se mantuvieron en refrigeración (2-8°C) durante 24 horas.

\* **NOTA:** El antígeno que se utilizó para titular los sueros de los conejos de los grupos 1 al 6 fue la vacuna HbOC; para titular los sueros de los conejos de los grupos 7 al 10 se utilizó como antígeno la vacuna PRP-T, debido a que era necesario utilizar antígenos heterólogos, ya que sólo se deseaba medir la reacción anti-

PRP y no la reacción anti-Hib total.

#### 4.2.4.2 Titulación de los sueros

4.2.4.2.1 Se eliminaron las soluciones del antígeno remanente mediante succión con una micropipeta multicanal.

4.2.4.2.2 Se lavaron los pozos con 0.1 ml de PBS-T.

4.2.4.2.3 El amortiguador de lavado permaneció en los pozos durante 3 minutos. Al cabo de este tiempo se eliminó la solución de la manera descrita en 4.2.4.2.1; este proceso se repitió dos veces más, con el fin de eliminar el antígeno que no se adsorbió a la fase sólida.

4.2.4.2.4 Se agregaron 0.2 ml de PBS-leche al 1% a todos los pozos y se incubaron a 37°C por una hora para permitir que la leche reabriera los sitios en los que no se adsorbió el antígeno.

4.2.4.2.5 Se repitió el paso 4.2.4.2.1.

4.2.4.2.6 Se adicionó 0.1 ml de la dilución correspondiente de cada uno de los sueros problema a un número suficiente de pozos (ver figura 1) para titular por duplicado a cada uno de éstos; se emplearon las siguientes concentraciones de los sueros: sin diluir, 1:10, 1:100, 1:500 y 1:1000. En los testigos negativos para los sueros se adicionó 0.1 ml de PBS-leche al 1%.

4.2.4.2.7 Cada una de las placas se incubó a 37°C durante una hora y media para que se llevara a cabo la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ab).

4.2.4.2.8 Se repitieron los pasos 4.2.4.2.1 y 4.2.4.2.2 para eliminar el exceso de suero que no hubiera reaccionado.

4.2.4.2.9 Se adicionó 0.1 ml del conjugado IgG de cabra  $\alpha$ -inmunoglobulinas de conejo acopladas a peroxidasa) a todos los pozos, excepto a los testigos negativos para el conjugado.

4.2.4.2.10 Las placas se incubaron a 37°C por una hora.

4.2.4.2.11 Se repitieron los pasos 4.2.4.2.1 y 4.2.4.2.2 para eliminar el exceso de conjugado que no hubiera reaccionado.

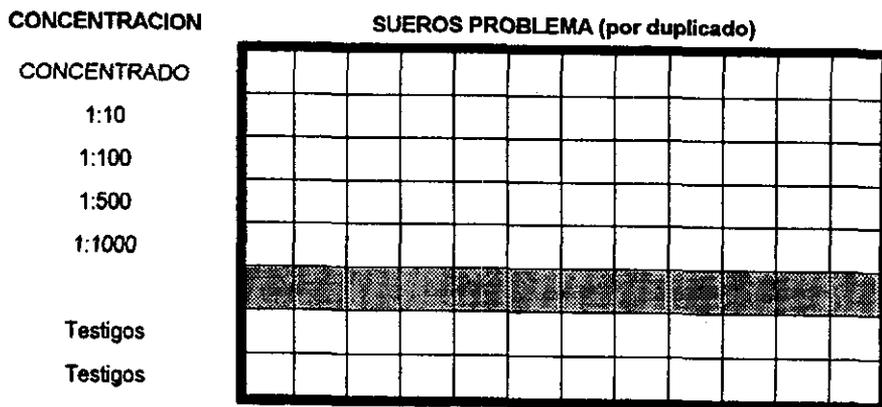
4.2.4.2.12 Se adicionó 0.1 ml de una solución recién preparada del sustrato de la enzima a cada uno de los pozos.

4.2.4.2.13 La placa se incubó en la obscuridad para permitir la reacción enzimática y el consecuente desarrollo de color durante 20 minutos.

4.2.4.2.14 La reacción enzimática se detuvo adicionando 12 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8N a cada pozo.

4.2.4.2.15 Las lecturas de densidad óptica se llevaron a cabo a 492 nm en un lector de ELISA y se imprimieron.

**FIGURA 2. ESQUEMA PARA LA TITULACION DE LOS SUEROS DE CONEJO POR MEDIO DE LA TECNICA DE ELISA**



4.2.4.2.16 El punto de corte de la prueba se calculó como la media de la densidad óptica más dos desviaciones estándar de las lecturas de densidad óptica de los pozos correspondientes a los testigos negativos.<sup>(37,38)</sup>

#### 4.2.5 PRUEBAS DE POTENCIA DE LAS FRACCIONES DIFTERICA, TETANICA Y PERTUSSIS.<sup>(39)</sup>

##### 4.2.5.1 Titulación de la fracción diftérica.

Depilación de los cobayos.- Se removió el pelo de los flancos y el dorso de los animales, usando una rasuradora eléctrica. Se humedeció la región rasurada con agua tibia, y se aplicó sobre la piel una pasta de consistencia cremosa, preparada a partir de los siguientes ingredientes:

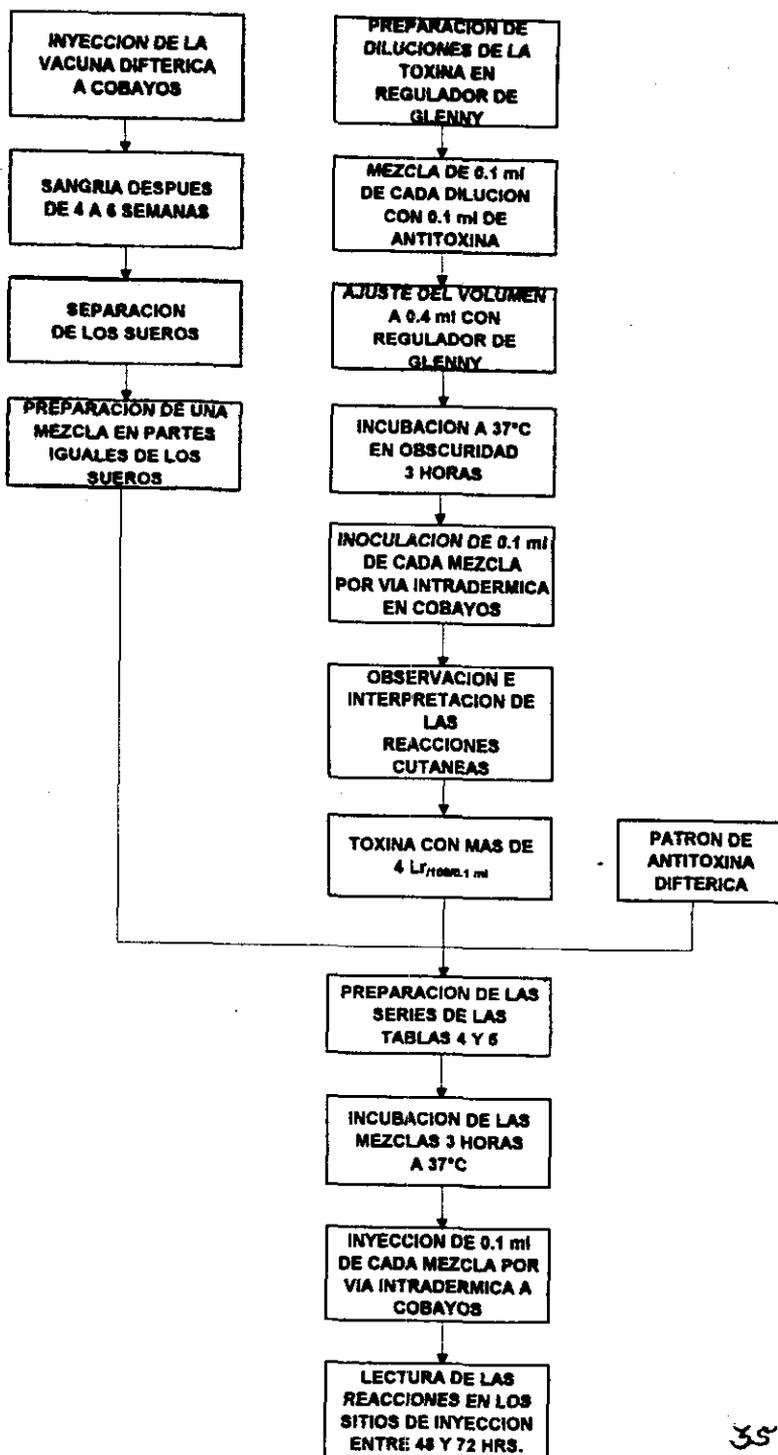
Almidón	120 g
Oxido de zinc	70 g
Sulfuro de bario	60 g

Agua en cantidad suficiente para obtener la consistencia deseada.<sup>(39)</sup>

Esta mezcla se aplicó ligeramente sobre la piel de los cobayos usando un guante y se dejó actuar durante 2 a 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se enjuagó escrupulosamente con agua y se secó perfectamente. Los cobayos se conservaron en un cuarto con temperatura controlada.<sup>(39)</sup>

a) Inmunización de los cobayos para la obtención de suero antidiftérico. Se inyectó por vía subcutánea una y media dosis individual humana de cada una de las combinaciones Hib+DTP y de la vacuna DTP sin combinar al correspondiente grupo de no menos de cuatro cobayos de 450 a 550 g de peso. Después de 4 semanas como mínimo y no más de 6 semanas, se sangraron los animales y se separaron los sueros. Se preparó una mezcla a partes iguales del suero de cada cobayo y en ésta se valoró la concentración de antitoxina presente.<sup>(39)</sup>

**DIAGRAMA DE FLUJO 4.  
TITULACION DE LA FRACCION DIFTERICA**



b) Titulación de la toxina diftérica en Lr/100.

Definición. La dosis Lr/100 de una toxina diftérica es una unidad de combinación que consiste en la cantidad mínima de toxina que al ser mezclada con 0.01 UI de antitoxina, es neutralizada parcialmente, quedando la suficiente toxina libre para producir una reacción eritematosa característica de aproximadamente 10 mm de diámetro entre las 48 y 72 horas posteriores a la inyección intradérmica de la mezcla en cobayos o conejos.<sup>(36)</sup>

Procedimiento. Se preparó una serie de diluciones de la toxina a probar en regulador de Glenny, con un factor de dilución que permitió observar una respuesta graduada. De cada dilución se depositó 0.1 ml en un recipiente adecuado; se agregó 0.1 ml de antitoxina patrón diluida con solución 0.15M de NaCl a 0.4 UI/ml y se ajustó el volumen a 0.4 ml con regulador de Glenny. Se incubaron las mezclas a 37°C y protegidas de la luz durante tres horas. Transcurrida la incubación, se inoculó 0.1 ml de cada mezcla por vía intradérmica en sitios espaciados e identificados, seleccionados al azar, de la piel depilada o rasurada del lomo del cobayo. Se observaron las reacciones cutáneas al final del período previamente establecido.<sup>(36)</sup>

Interpretación. Aquella dilución de la toxina que mezclada con 0.04 UI causó una reacción eritematosa característica de 10 mm de diámetro o mayor al final del período previamente establecido contiene 4 Lr/100/0.1 ml.<sup>(36)</sup>

c) Titulación de los sueros antidiftéricos. Se usó una toxina titulada en Lr/100/ml, los sueros problema y un patrón de antitoxina diftérica, aprobado por la autoridad sanitaria y se prepararon las series indicadas en las tablas 4 y 5.<sup>(36)</sup>

Se incubaron las mezclas durante 3 horas a 37°C. se inyectó 0.1 ml de cada mezcla por vía intradérmica a cobayos de 400 a 500 g. Las inyecciones se efectuaron a ambos lados de la espina dorsal del cobayo previamente rasurado o depilado, en un sentido para una serie y en el opuesto para la otra. Se leyeron las reacciones en los sitios de inyección entre las 48 h y 72 h posteriores a ella. Se obtuvo el contenido de unidades internacionales de antitoxina por mililitro de un suero en función de las unidades esperadas correspondientes a la mezcla que dio lugar a una reacción eritematosa de aproximadamente 10 mm de diámetro. Se procuró que una reacción equivalente apareciera con la mezcla correspondiente al tubo N° 3 de la serie patrón.<sup>(36)</sup>

**Tabla 8. SERIE PROBLEMA <sup>(39)</sup>**

Nº de tubo	Dilución del suero problema	Suero diluido (ml)	Regulador de Glenny (ml)	Toxina diluida a 40 U <sub>1920</sub> /ml	Unidades esperadas UJA/ml
1	I- 1:2.5 0.5 ml de suero + 0.75 ml de solución 0.15 M de NaCl	0.2	0.1	0.1	0.5
2		0.1	0.2	0.1	1.0
3	II- 1:10 0.5 ml de dilución I + 1.5 ml de NaCl 0.15 M	0.2	0.1	0.1	2.0
4	III- 1:25 0.5 ml de dilución II + 0.75 ml de solución de NaCl 0.15 M	0.2	0.1	0.1	5.0
5		0.1	0.2	0.1	10.0

**TABLA 9. SERIE PATRON. <sup>(39)</sup>**

Nº de tubo	Antitoxina patrón (U <sub>1920</sub> / 0.1 ml)	Regulador de Glenny (ml)	Toxina diluida a 40 U <sub>1920</sub> /ml (ml)
1	1.200	0.000	0.3
2	0.600	0.300	0.3
3	0.300	0.600	0.3
4	0.150	0.750	0.3
5	0.075	0.825	0.3

#### 4.2.5.2 Potencia de la fracción tetánica.

a) Inmunización de los cobayos para la obtención del suero antitetánico.

Se inyectó por vía subcutánea una y media dosis individual humana de cada una de las vacunas combinadas Hib+DTP y de la vacuna DTP sin combinar, al grupo correspondiente formado por no menos de cuatro cobayos de 450 a 550 g de peso. Después de 4 semanas como mínimo y no más de 6 semanas, se sangraron los animales y se separaron los sueros. Se

**DIAGRAMA DE FLUJO 5.  
TITULACION DE LA FRACCION TETANICA.**

**5a. INMUNIZACION  
DE LOS COBAYOS**

INYECCION  
POR VIA  
SUBCUTANEA

SANGRIA  
DE 4 A 6 SEMANAS  
DESPUES

SEPARACION  
DE LOS SUEROS

PREPARACION DE UNA  
MEZCLA A PARTES  
IGUALES DE CADA SUERO

SERIE DE  
PRUEBA

PREPARACION DE  
MEZCLAS  
CON  $0.25$ ,  $4 \times 10^{-2}$ ,  
 $6.2 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1.56 \times 10^{-3}$   
Y  $2.5 \times 10^{-6}$  ml  
DEL SUERO PROBLEMA  
COMBINADO CON  $1 L_{1/400/50}$   
POR DOSIS DE 0.5 ml

1

**5b. TITULACION DE LA  
TOXINA TETANICA**

$L_{1/400/50}$   
MEZCLA DE 0.1 ml DE  
CADA  
DILUCION CON 0.4 ml DE  
ANTITOXINA PATRON

AJUSTE DEL VOLUMEN  
A 4 ml CON AGUA  
PEPTONADA AL 1%

INCUBACION A  
TEMPERATURA  
AMBIENTE SIN LUZ  
1 HORA

INYECCION DE 0.5 ml DE  
CADA MEZCLA EN CADA  
UNO  
DE 6 RATONES

OBSERVACION DE  
ANIMALES  
POR 5 DIAS Y REGISTRO  
DE MUERTES

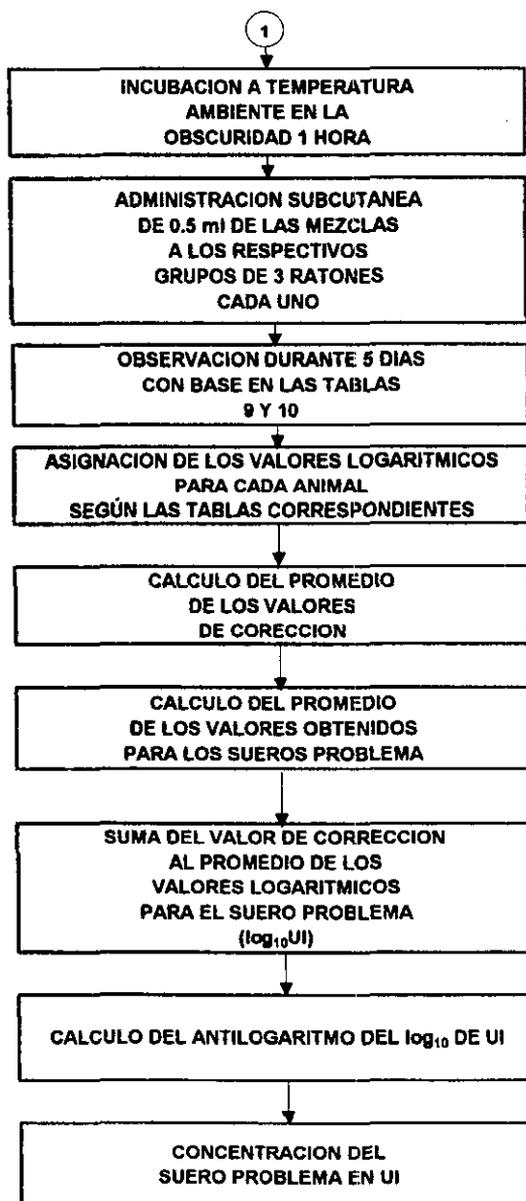
INTERPRETACION Y  
CALCULO  
DEL PUNTO FINAL.  
SPEARMAN-KARBER

SERIE  
PATRON

PREPARACION DE  
MEZCLAS  
QUE CONTENGAN  $3.5 \times 10^{-3}$ ,  
 $2.5 \times 10^{-3}$ ,  $1.75 \times 10^{-3}$ ,  $1.25 \times 10^{-3}$   
Y  $9 \times 10^{-4}$  U.I. DE  
ANTITOXINA  
COMBINADA CON  $1 L_{1/400/50}$   
DE TOXINA POR DOSIS DE

1

## DIAGRAMA DE FLUJO 5. (CONTINUACION) TITULACION DE LA FRACCION TETANICA



preparó una mezcla a partes iguales del suero de cada cobayo y en ésta se valoró la concentración de antitoxina presente.<sup>(36)</sup>

b) Titulación de la toxina tetánica en  $L_{1/40050}$ .

Definición. La dosis  $L_{1/40050}$  de una toxina tetánica es una unidad de combinación que consiste en la cantidad mínima de toxina que al ser mezclada con 0.0025 UI de antitoxina tetánica, es neutralizada parcialmente, quedando la suficiente toxina libre para matar al 50% de un grupo de ratones de 16 a 18 g de peso, inyectados por vía subcutánea, en un período de 4 a 5 días.<sup>(36)</sup>

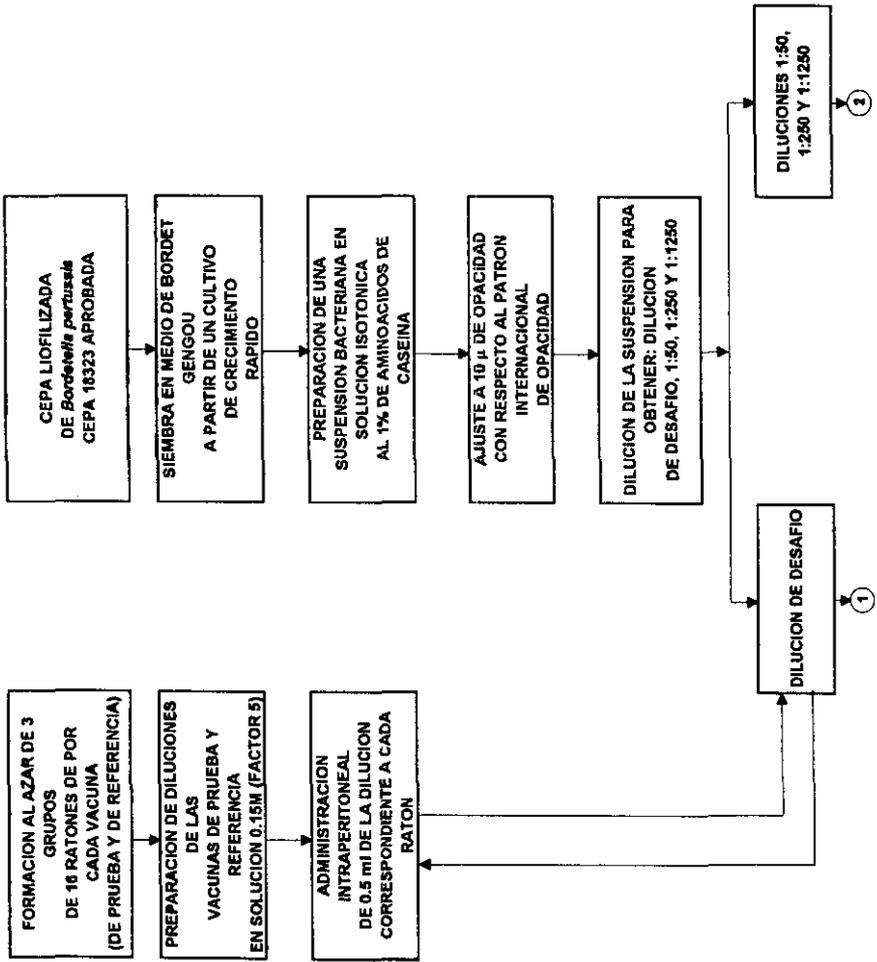
Procedimiento.- Se practicó una serie de diluciones de la toxina a probar en agua peptonada al 1% m/v con un factor de dilución que permitió observar una respuesta graduada. Se depositaron 2 ml de cada dilución en un recipiente y se agregaron 0.4 ml de antitoxina patrón diluida a 0.05 UI/ml con solución 0.15 M de NaCl. Se ajustó el volumen a 4 ml con agua peptonada al 1% m/v. Se incubaron las mezclas a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 1 hora. Transcurrida la incubación, se inyectaron 0.5 ml de cada mezcla en cada uno de 6 ratones de 16 a 18 g de peso por vía subcutánea, se observaron los animales durante 5 días, registrando las muertes diariamente y efectuando la lectura cada 24 horas considerado la hora de inyección.<sup>(36)</sup>

Interpretación. Aquella dilución de la toxina que mezclada con 0.02 UI causa la muerte de 3 ratones inyectados, entre el cuarto y quinto días posteriores a la inyección, contendrá  $4L_{1/40050}$  por mililitro. El punto final se calculó por el método de Spearman-Kärber.<sup>(36)</sup>

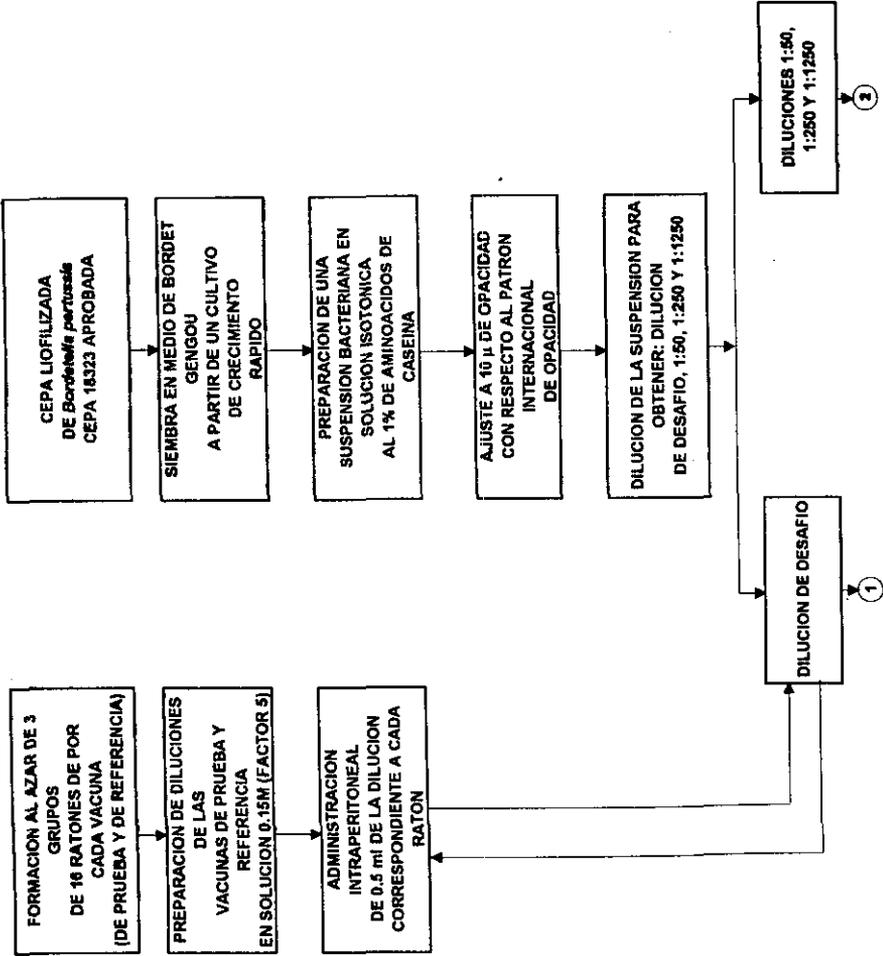
c. Titulación del suero antitetánico por el método de Ipsen.

En este método se utilizan dos series de ratones de 16 a 18 g de peso. En la serie del suero de prueba se administraron a cada uno de 6 ratones subcutáneamente 0.5 ml de cada una de 6 mezclas preparadas de manera que la dosis inyectada contuviera 0.25 ml, 0.04 ml, 0.0062 ml, 0.001 ml, 0.00156 ml y 0.000025 ml de cada uno de los sueros problema combinados con 1  $L_{1/40050}$ . Con el fin de corregir la variabilidad inherente a la sensibilidad de los ratones a la toxina, se preparó una serie patrón paralela a la serie de prueba. Se inyectaron subcutáneamente, en grupos de 3 ratones cada uno, 0.5 ml de una serie de 5 mezclas preparadas en tal forma que la dosis inyectada contuviera 0.0035 UI, 0.0025 UI, 0.00175 UI, 0.00125 UI y 0.0009 UI de antitoxina mezclada con  $L_{1/40050}$  de toxina. Se incubaron las mezclas a temperatura ambiente en la oscuridad durante una hora. Las diluciones del suero se efectuaron en una solución 0.15M de NaCl (solución salina isotónica); se preparó la suficiente cantidad de mezcla para tomar la dosis cuantitativamente, utilizando agua peptonada al 1% m/v para completar el volumen. Los ratones inyectados se observaron durante 5 días, practicando las lecturas en los tiempos especificados en las tablas 9 y 10 y se mantuvo un registro de los muertos; el quinto día se anotaron los muertos y los sobrevivientes con signos de tétanos. Se asignó a cada animal muerto o tetanizado el valor logarítmico que le correspondía, leído en la tabla apropiada. La tabla 6 muestra los valores de corrección para los animales individuales. Se calculó el promedio de todos los valores de corrección, considerando los signos. Al aplicar la tabla 7 a los sueros problema, la lectura de los valores se efectuaba en el grupo de dosis que correspondía a la dosis mayor de suero a la que un animal moría (tabla 9, columna titulada "Grupo primer ratón muerto"). Se calculó el promedio de todos los valores obtenidos para un suero problema determinado, sin olvidar los signos. Se sumó el valor de corrección (promedio de los valores de corrección individuales) al promedio de los valores logarítmicos para cada uno de los sueros problema, considerando una vez más los signos. Este valor representa el  $\log_{10}$  del contenido de unidades internacionales de antitoxinas por ml del suero problema. Obteniendo el antilogaritmo

DIAGRAMA DE FLUJO 6.  
TITULACION DE LA FRACCION PERTUSSIS



**DIAGRAMA DE FLUJO 6.  
TITULACION DE LA FRACCION PERTUSSIS**



de este valor, se obtuvo la concentración de cada suero problema en Unidades Internacionales de antitoxina por ml.<sup>(39)</sup>

#### 4.2.5.3 Potencia de la fracción pertussis.

El número de unidades protectoras por dosis individual humana se determina para cada lote de vacuna en base a los resultados de pruebas simultáneas en ratón, de la vacuna problema y la de referencia.<sup>(39)</sup>

**TABLA 10. ESQUEMA DE OPERACION - SERIE PATRON<sup>(39)</sup>**

Porción de suero problema (ml)	Porción de suero patrón (ml)	Volumen total (suero problema + suero patrón) (ml)	Unidades de toxina protectoras	Suero patrón (UI/ml)
0.28	0.72	1.0	1	0.0035
0.20	0.80	1.0	1	0.0025
0.14	0.86	1.0	1	0.00175
0.10	0.90	1.0	1	0.00125
0.072	0.93	1.0	1	0.0009

Incubar 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad

**TABLA 11. ESQUEMA DE OPERACION - SERIE MUESTRA<sup>(39)</sup>**

Porción de suero problema (ml)	Porción de suero patrón (ml)	Volumen total (suero problema + suero patrón) (ml)	Unidades de toxina protectoras	Suero patrón (UI/ml)	
Sin diluir	0.60	0.0	0.60	1	0.25
Sin diluir	0.096	0.5	0.60	1	0.04
A = 0.05 ml de suero + 1.95 ml de solución salina isotónica = 1:40	0.60	0.00	0.60	1	0.0062
1:40	0.096	0.5	0.60	1	0.001
0.05 ml de A + 1.95 ml de solución salina isotónica = 1:1600	0.60	0.0	0.60	1	0.000156
1:1600	0.096	0.5	0.60	1	0.000025

**TABLA 12. DETERMINACION DEL FACTOR DE CORRECCION (F.C.) A PARTIR DE LA SERIE PATRON<sup>(29)</sup>**

DOSIS UNIDADES ANTILOGICAS	Terapia			3º día de tratamiento antes de las 16 horas		3º día de tratamiento antes de las 16 horas		3º día		4º día		M 5º día	
	9 h	12 h	16 h	9 h M	16 h	9 h	16 h	9 h	16 h	12 h	16 h	12 h	Telanzados
1	0.0035	0.93	0.83	0.60	0.73	0.46	0.40	0.29	0.26	0.20	0.26	0.15	0.05
2	0.0025	0.78	0.68	0.45	0.58	0.31	0.25	0.14	0.11	0.05	0.11	0.00	-0.10
3	0.00175	0.63	0.53	0.30	0.43	0.16	0.10	-0.01	-0.04	-0.10	-0.04	-0.15	-0.25
4	0.00125	0.48	0.38	0.15	0.28	0.01	-0.05	-0.16	-0.19	-0.25	-0.19	-0.30	-0.40
5	0.0009	0.33	0.23	0.00	0.13	-0.16	-0.20	-0.31	-0.34	-0.40	-0.34	-0.45	-0.55



**DIAGRAMA DE FLUJO 7.  
ESTUDIO DE DISMINUCION DE LA POTENCIA DE LA FRACCION Hib DE LAS VACUNAS  
Hib+DTP EN REFRIGERACION (2-8°C)**



Vacuna de referencia.- Aprobada por la autoridad sanitaria y establecida en comparación con el patrón internacional.<sup>(39)</sup>

Ratones.- Se utilizaron ratones sanos de 10 a 18 g de la cepa NIH, con pesos individuales que no variaran más de 4 g en una sola prueba. Se empleó un sistema de distribución al azar para asignar a los animales a los grupos, su posición en los anaqueles del bioterio y determinar el orden de desafío. Para cada vacuna Hib+DTP combinada se formaron tres grupos de no menos de 16 animales cada uno. Además, se utilizaron 3 grupos de no menos de 16 ratones cada uno, para titular la virulencia de la cepa de desafío.<sup>(39)</sup>

Vacunación.- Se hicieron diluciones de las vacunas de prueba y de la de referencia en solución 0.15 M de cloruro de sodio con factor de dilución de 5. Entre las diluciones escogidas debía estar comprendido el 50% de protección tanto de las vacunas problema como de la vacuna de referencia. Se inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal 0.5 ml de la dilución correspondiente. Se dejó un intervalo de tiempo entre vacunación y desafío de 14 a 17 días. Al menos 94% de los ratones incluidos en cada grupo debería sobrevivir durante este período y cada ratón debía parecer sano al momento del desafío.<sup>(39)</sup>

Desafío.- Se utiliza *Bordetella pertussis* cepa 18323, aprobada por la autoridad sanitaria.<sup>(39)</sup>

El cultivo para desafío para cada prueba, se preparó a partir de una cepa liofilizada.<sup>(39)</sup>

La suspensión bacteriana empleada para el reto se preparó a partir de un cultivo de 20 a 24 horas, desarrollado en medio de Bordet-Gengou, que hubiera sido sembrado de un cultivo de crecimiento rápido que no tuviera más de 30 horas de edad.<sup>(39)</sup>

Se preparó una suspensión bacteriana a partir de este cultivo en solución isotónica al 1% de aminoácidos de caseína pH=7.1±0.1. Se ajustó la suspensión a 10  $\mu$  de opacidad comparada con el patrón internacional de opacidad de manera que la dilución (1:1250) de la de desafío contuviera entre 10 y 50 UFC en el volumen de inoculación. Se diluyó la suspensión original a manera de obtener una dilución de desafío y diluciones 1:50, 1:250 y 1:1250 de la misma para titular la virulencia. Cada ratón vacunado se inoculó por vía intracerebral con la suspensión de desafío, así como los tres grupos testigo con cada una de las tres diluciones indicadas para titular la virulencia.<sup>(39)</sup>

Registro de los resultados.- Se observaron los ratones durante 14 días. Aquéllos que murieron dentro de 72 h después del desafío se excluyeron de la prueba. Se mantuvo un registro de animales muertos entre el cuarto y décimo cuarto día de observación, y se utilizaron para el cálculo de las DE<sub>50</sub> de ambas vacunas y de la DL<sub>50</sub> de la cepa de desafío. Todos los ratones que al final del período de observación mostraran signos de encefalitis se consideraron como muertos para el propósito de determinar la DE<sub>50</sub> y la DL<sub>50</sub>.<sup>(39)</sup>

Validez de la prueba.- La prueba se consideró válida si cumplió los requisitos siguientes:

1. La DE<sub>50</sub> de la vacuna problema y la de referencia se encontró entre la dosis mayor y la dosis menor que se aplicaron.
2. Los límites de una desviación estándar de cada DE<sub>50</sub> cayeron dentro del intervalo de 64 a 156 %.
3. Se debió tener una respuesta graduada en relación a las dosis aplicadas de vacuna.
4. Las curvas dosis-respuesta de las vacunas problema y de la de referencia debían ser paralelas.
5. La dosis de desafío debía contener entre 100 y 1000 DL<sub>50</sub>.

6. La DL<sub>50</sub> no debía contener más de 300 UFC.

7. La dilución (1:1250) de la dosis de reto no debía contener menos de 10 UFC ni más de 50 UFC en el volumen de inoculación.<sup>(36)</sup>

Cálculo de la potencia.- La DE<sub>50</sub> de las vacunas se calculó por el método de Wilson y Worcester a través de un programa de cómputo proporcionado por la Autoridad Nacional de Control. El valor de las unidades protectoras de la dosis individual humana de la vacuna problema se calculó en términos del valor en unidades de la vacuna de referencia.<sup>(36)</sup>

#### 4.2.6 ESTUDIO DE DISMINUCIÓN DE LA POTENCIA INMUNOLÓGICA DE LA FRACCIÓN Hib A TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN (2-8°C).

4.2.6.1 Cada una de las vacunas mencionadas en la sección 4.2.2 se combinó con un lote de la vacuna DTP tal como se indicó en dicha sección.

Se formaron cuatro grupos con dos conejos hembras de la cepa NZW de 1.5 a 2.0 Kg de peso cada uno, y se distribuyeron las combinaciones tal como se indica en la tabla 14:

**Tabla 14. Distribución de los grupos de los conejos participantes en el estudio de disminución de la potencia inmunológica de la fracción Hib de las combinaciones Hib+DTP a temperatura de refrigeración (2-8°C).**

GRUPO	COMBINACIÓN
11	HbOC+DTP
12	PRP-D+DTP
13	OMP+DTP
14	PRP-T <sup>(b)</sup> +DTP

NOTA: La combinación de las vacunas PRP-T<sup>(b)</sup> (Proveedor E) + DTP (INH) no fue incluida en el estudio, debido a que no se contó con una cantidad suficiente de la vacuna PRP-T<sup>(b)</sup>.

4.2.6.2 Las combinaciones se mantuvieron en refrigeración (2-8°C) durante 7 días y transcurrido este tiempo se inocularon las mezclas a los conejos respectivos, siguiendo los esquemas de inmunización mencionados en la sección 4.2.3.

4.2.6.3 Los sueros obtenidos se titularon siguiendo la misma metodología que se empleó para la determinación de la combinación más inmunogénica.

4.2.6.4 El punto de corte para estas determinaciones se calculó de la manera descrita en 4.2.4.2.16 de esta sección.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ESTANDARIZACION DE LOS ESQUEMAS DE INMUNIZACION Y DE LAS CONDICIONES PARA LA TECNICA DE ELISA.

Se probaron los esquemas de inmunización propuestos para conejos y para ratones, así como los antígenos y los conjugados disponibles en las concentraciones indicadas.

#### 5.1.1 Conejos

El esquema propuesto para la inmunización de los conejos resultó ser adecuado, debido a que los animales respondieron favorablemente y mantuvieron un buen estado de salud. Las condiciones más adecuadas para la titulación de los sueros de conejo se muestran a continuación en la tabla 15:

**Tabla 15. Condiciones de la técnica de ELISA para la titulación de los sueros de conejo de la cepa NZW inmunizados con PRP**

ESQUEMA	ANTIGENO		CONJUGADO	
	TIPO	CONCENTRACION	TIPO	CONCENTRACION
1	PRP-T* HbOC*	10 mg/ml 5 mg/ml	IgG de cabra α- inmunoglobulinas Sigma de conejo acopladas a peroxidasa	1:2000

\* NOTA: Se seleccionaron los dos antígenos, ya que el PRP-T se utilizó para titular los sueros de los conejos que no fueron inmunizados con alguna de las vacunas PRP-T y el antígeno HbOC se utilizó para titular los sueros de los conejos inmunizados con las vacunas PRP-T.

#### 5.1.2 Ratones

En general las lecturas obtenidas bajo todas las condiciones de prueba fueron muy bajas, y por consiguiente este modelo de prueba no es recomendable.

Por lo tanto, el modelo animal seleccionado fue el conejo, y las condiciones del antígeno y del conjugado para llevar a cabo la técnica de ELISA son las mencionadas en la tabla 15.

#### 5.1.3 Coeficiente de variación (precisión) y límite de detección .

El coeficiente de variación del sistema se calculó con la fórmula:

$$\%C.V._e = (S_e/X_e) \times 100_{(40)}$$

Donde:

$\%C.V._e$  = % del coeficiente de variación del sistema

$S_e$  = Desviación estándar de las lecturas de densidad óptica de una misma

muestra

$X_g$  = Media geométrica de las lecturas de densidad óptica de una misma muestra

La precisión del sistema (PS) se define como:  $PS = 100 - \%C.V._s$

**C.V. del sistema\* = 5.313%**  
**Precisión del sistema\* = 94.687%**

\*Los datos utilizados para los cálculos se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16. Datos para el cálculo de la precisión del sistema**

L1	L2	X geom	s	%C.V.
0.560	0.581	0.570	0.014	2.602
1.137	1.059	1.098	0.055	5.023
1.208	1.179	1.193	0.020	1.718
0.727	0.725	0.726	0.001	0.194
0.441	0.491	0.466	0.035	7.586
0.103	0.089	0.096	0.009	10.311
0.542	0.611	0.576	0.048	8.463
0.453	0.602	0.527	0.105	19.973
0.250	0.233	0.241	0.012	4.977
0.125	0.129	0.127	0.002	2.227
0.490	0.538	0.514	0.033	6.603
0.775	0.796	0.785	0.014	1.890
1.034	1.034	1.034	0.000	0.000
0.914	0.848	0.881	0.046	5.297
0.746	0.748	0.747	0.001	0.189
0.315	0.379	0.347	0.045	13.041
0.723	0.682	0.702	0.028	4.126
1.052	1.013	1.032	0.027	2.670
0.969	0.910	0.939	0.041	4.440
0.846	0.789	0.817	0.040	4.930
			<b>X geom</b>	<b>0.55%</b>

L1: Lectura 1

L2: Lectura 2

X geom.: media geométrica

s: Desviación estándar

%C.V.: % del coeficiente de variación

y el coeficiente de variación del método fue calculado con la fórmula:

$$\%C.V._m = (S_m/X_m) \times 100_{(40)}$$

Donde:

$S_m$  = Desviación estándar de las lecturas de densidad óptica de todas las muestras

$X_m$  = Media geométrica de las lecturas de densidad óptica de todas las muestras

La precisión del método (PM) se define como:  $PM = 100 - \%C.V._m$

C.V. del método\*\* = 5.16%  
 Precisión del método\*\* = 94.84%

\*\*Los datos utilizados para los cálculos se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17. Datos para el cálculo de la precisión del método**

L1	L2	X geom.	s	% C.V.
0.560	0.581	0.570	0.014	2.602
1.137	1.059	1.098	0.055	5.023
1.208	1.179	1.193	0.020	1.718
0.727	0.725	0.726	0.001	0.194
0.441	0.491	0.466	0.035	7.586
0.261	0.272	0.266	0.007	2.918
0.877	0.822	0.849	0.038	4.578
1.126	1.095	1.110	0.021	1.973
0.816	0.860	0.838	0.031	3.712
0.564	0.566	0.565	0.001	0.250
0.327	0.263	0.295	0.045	15.340
0.797	0.743	0.849	0.038	4.578
1.039	1.156	1.097	0.082	7.538
0.669	0.557	0.613	0.079	12.910
0.398	0.424	0.411	0.018	4.473
0.103	0.089	0.096	0.009	10.311
0.542	0.611	0.576	0.048	8.463
0.453	0.602	0.527	0.105	19.973
0.250	0.233	0.241	0.012	4.977
0.125	0.129	0.127	0.002	2.227
0.257	0.165	0.211	0.065	30.830
0.403	0.382	0.392	0.014	3.783
0.546	0.517	0.531	0.020	3.858
0.345	0.344	0.344	0.001	0.205
0.262	0.248	0.255	0.009	3.882
0.490	0.538	0.514	0.033	6.603
0.775	0.796	0.785	0.014	1.890
1.034	1.034	1.034	0.000	0.000

L1	L2	X geom.	s	% C.V.
0.914	0.848	0.881	0.046	5.297
0.746	0.748	0.747	0.001	0.189
0.315	0.379	0.347	0.045	13.041
0.723	0.682	0.702	0.028	4.126
1.052	1.013	1.032	0.027	2.670
0.969	0.910	0.939	0.041	4.440
0.846	0.789	0.817	0.040	4.930
0.900	0.897	0.898	0.002	0.236
0.901	0.931	0.916	0.021	2.315
1.049	1.066	1.057	0.012	1.136
1.045	1.058	1.051	0.009	0.874
0.985	0.970	0.977	0.010	1.085
0.790	0.757	0.773	0.023	3.016
0.851	0.843	0.847	0.005	0.667
1.069	1.069	1.069	0.000	0.000
1.029	1.000	1.041	0.033	3.227
0.917	0.766	0.841	0.106	12.688
			X geom.	5.162

L1: Lectura 1

L2: Lectura 2

X geom.: media geométrica

s: Desviación estándar

%C.V.: % del coeficiente de variación

Es importante mencionar que en general para el caso de los métodos biológicos, se acepta hasta un 20% de coeficiente de variación, aunque es posible establecer límites para cada método en particular <sup>(41)</sup>

El límite de detección del método (punto de corte/sensibilidad) se calculó como la media de la densidad óptica más dos desviaciones estándar de las lecturas de los pozos que contenían al testigo negativo: <sup>(38)</sup>

$$X = 0.066$$

$$s = 0.009$$

$$X + 2s = 0.084$$

Por lo que el valor del límite de detección del método es = 0.084.

Cada una de las vacunas contra *Haemophilus influenzae* tipo b producidas por distintos proveedores (HbOC, PRP-D, PRP-OMP, PRP-T<sup>(a)</sup> y PRP-T<sup>(b)</sup>) se probó sola y combinada con la vacuna DTP producida en el Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud para ser inoculada a conejos y ratones, con el objetivo de comparar la inmunogenicidad de las vacunas combinadas con respecto a la correspondiente vacuna Hib y DTP sin combinar.

En el estudio de inmunogenicidad de la fracción Hib participaron 20 conejos hembras de la cepa NZW de 1.5 a 2 Kg de peso cada uno, de los cuales murió uno, perteneciente al grupo 6, el cual fue vacunado con la mezcla PRP-OMP+DTP. Este conejo murió una semana antes de la tercera sangría y se

desconocen las causas de su muerte. En los conejos restantes no se observaron síntomas de enfermedad o malestar, ya que su comportamiento y su alimentación, así como su aspecto se *observaron estables* durante todo el estudio.

Además, se llevaron a cabo las pruebas de potencia para las fracciones diftérica, tetánica y pertussis de cada una de las combinaciones propuestas (excepto la combinación formada por las vacunas PRP-T<sup>(b)</sup> y DTP del Instituto Nacional de Higiene), tal como se describió en la sección 4.2.5.

Para llevar a cabo el estudio de pérdida de la potencia inmunológica de la fracción Hib después de haber realizado las combinaciones de las vacunas Hib proporcionadas por diversos proveedores, con la vacuna DTP producida en el Instituto Nacional de Higiene y habiendo mantenido las mezclas durante 7 días a la temperatura de refrigeración (2-8°C), se formaron cuatro grupos de conejos (11 al 14) como se describió en la sección 4.2.6.

## 5.2 EVALUACION DE LA POTENCIA DE LAS VACUNAS Hib Y DTP SOLAS Y COMBINADAS

### 5.2.1 TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-PRP (FRACCION Hib) PARA LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE VACUNA Hib+DTP.

En las tablas 18 a la 22 y en las gráficas 1 a la 10, se muestran las medias geométricas de las lecturas de densidad óptica ( $\lambda=492$  nm) de los sueros correspondientes a cada una de las cuatro sangrías de los 10 grupos de conejos formados. En los grupos 1 al 6 y en el grupo 8, se llevó a cabo la titulación de cuatro sangrías; en el caso de los grupos 7, 9 y 10 sólo se efectuaron tres sangrías, debido a que no se contó con los reactivos suficientes para titular los sueros pertenecientes a la tercera sangría.

El punto de corte para esta prueba es de 0.139, ya que la media de las lecturas de densidad óptica de los testigos negativos fue de 0.093, y la desviación estándar fue de 0.020. Por lo tanto, el título para cada una de las sangrías se determinó como la última dilución en la que se presentó una lectura de densidad óptica superior a 0.139, sin considerar los valores de los sueros concentrados, debido a no es posible tener una zona de equivalencia con la enzima del sustrato entre el antígeno y los anticuerpos en ese punto a causa de que un exceso de anticuerpos bloquea la actividad de la enzima. En la tabla 23 se muestran los títulos de cada uno de los sueros probados.

Tabla 18. LECTURAS DE DENSIDAD OPTICA DE LOS SUEROS ANTI-PRP OBTENIDOS DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS CON HbOC (Grupo 1) O CON HbOC+DTP (Grupo 2). (Media geométrica grupal).

CONCENTRACION concentración	MEDIA GEOMETRICA DE LA DENSIDAD OPTICA (λ=492 nm)															
	SANGRIA 1		SANGRIA 2		SANGRIA 3		SANGRIA 4		GRUPO 1		GRUPO 2					
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 1	GRUPO 2				
1:10	0.840	0.825	0.991	0.940	1.00	0.975	0.336	0.515	0.690	1.466	0.879	1.045	0.764	1.087	0.502	0.799
1:100	0.276	0.716	0.357	0.880	0.267	0.790	0.247	0.539	0.260	0.176	0.103	0.459	0.113	0.337	0.144	0.265
1:1000	0.152	0.161	0.051	0.259	0.096	0.198	0.090	0.138								

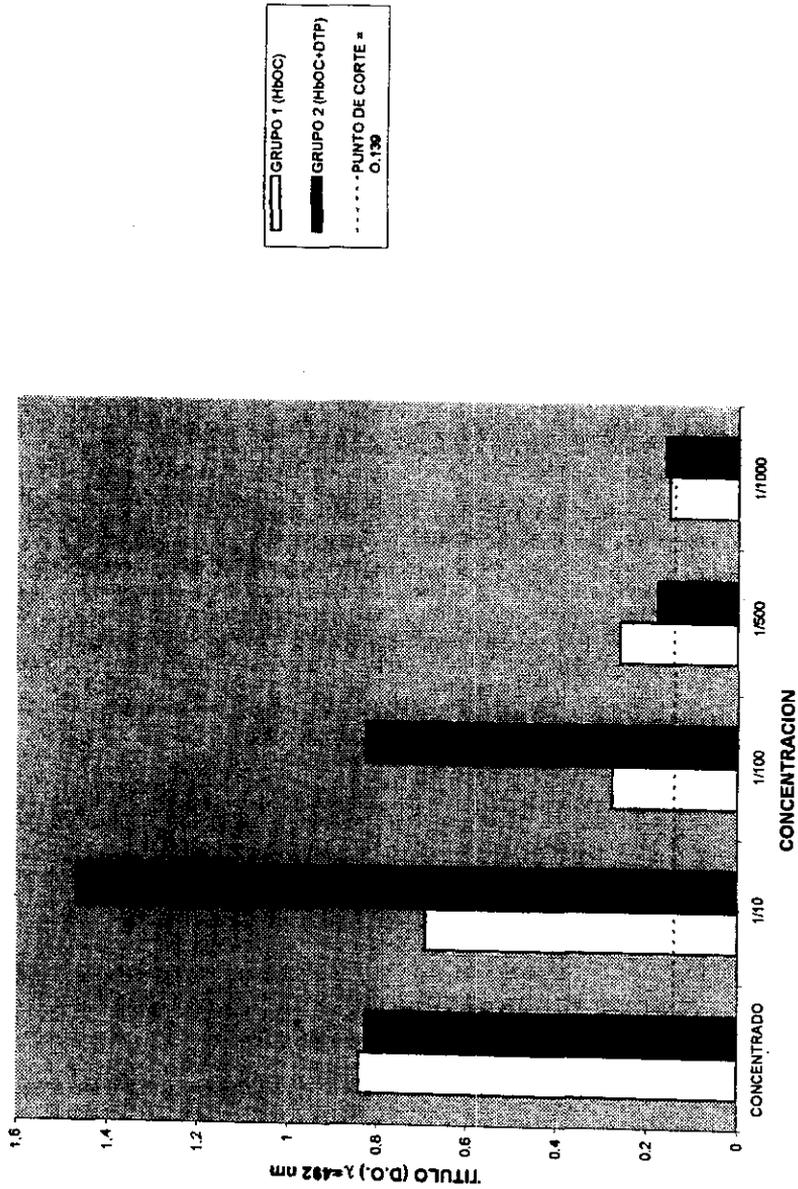
Sangría 1: 15 días después de la 3ª inmunización.

Sangría 2: 30 días después de la 3ª inmunización.

Sangría 3: 45 días después de la 3ª inmunización.

Sangría 4: 180 días después de la 3ª inmunización.

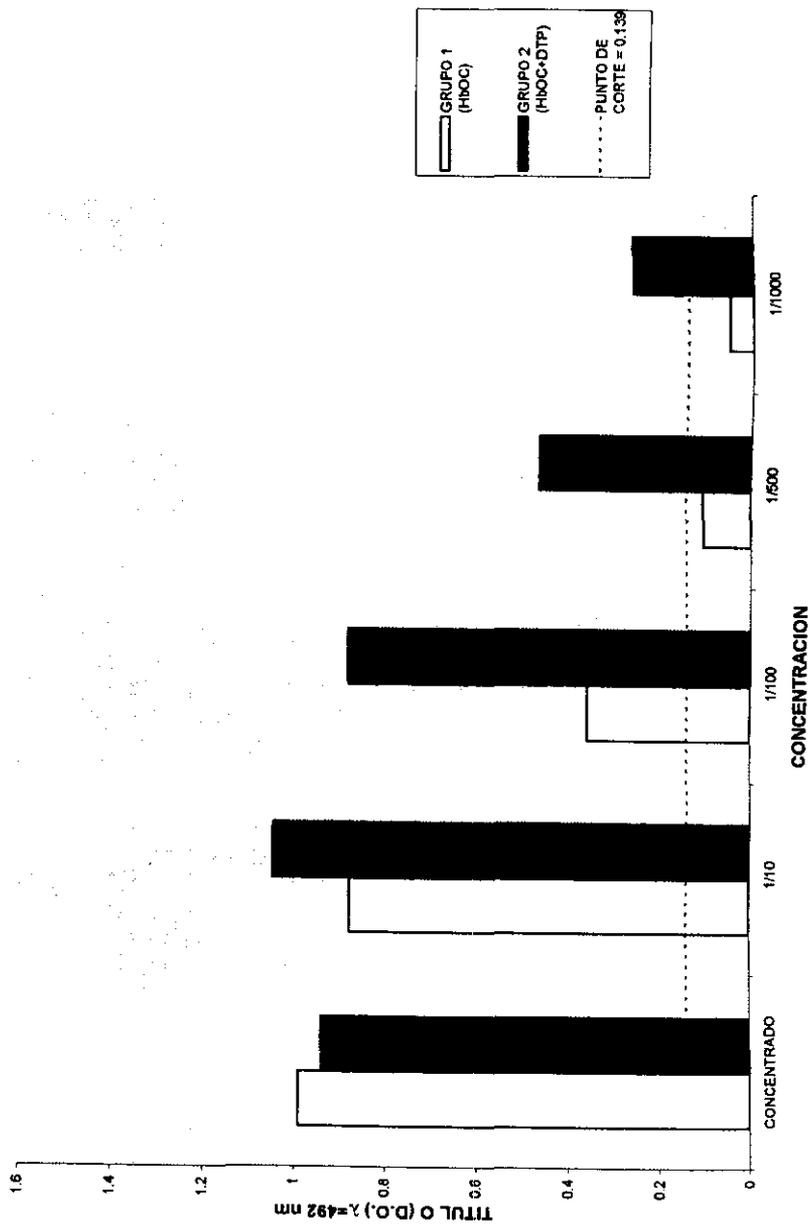
**GRAFICA 1. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON HbOC (GRUPO 1) O CON HbOC+DTP (GRUPO 2). 1ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de HbOC (grupo 1) o con tres dosis de HbOC+DTP (grupo 2). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

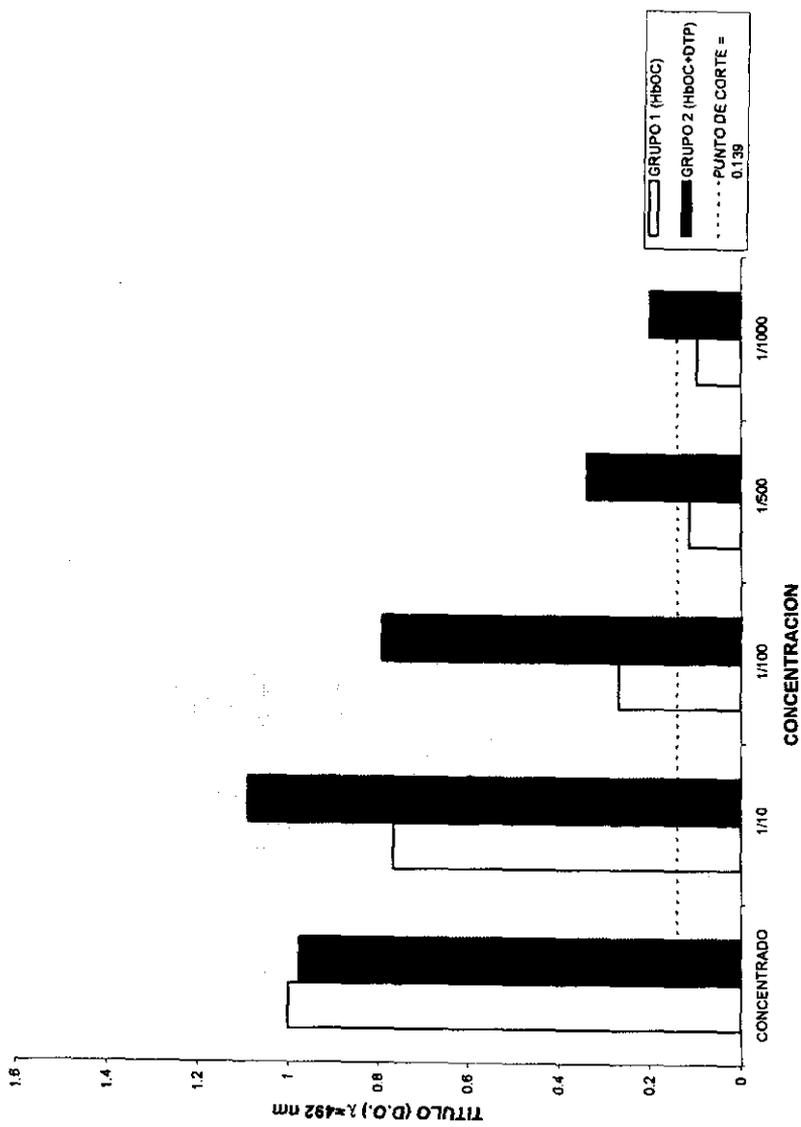
**GRAFICA 2. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON HbOC (GRUPO 1) O CON HbOC+DTP (GRUPO 2). 2ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de vacuna HbOC (grupo 1) o con tres dosis de vacuna HbOC+DTP (grupo 2). Los sueros fueron titulados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica a 492 nm.

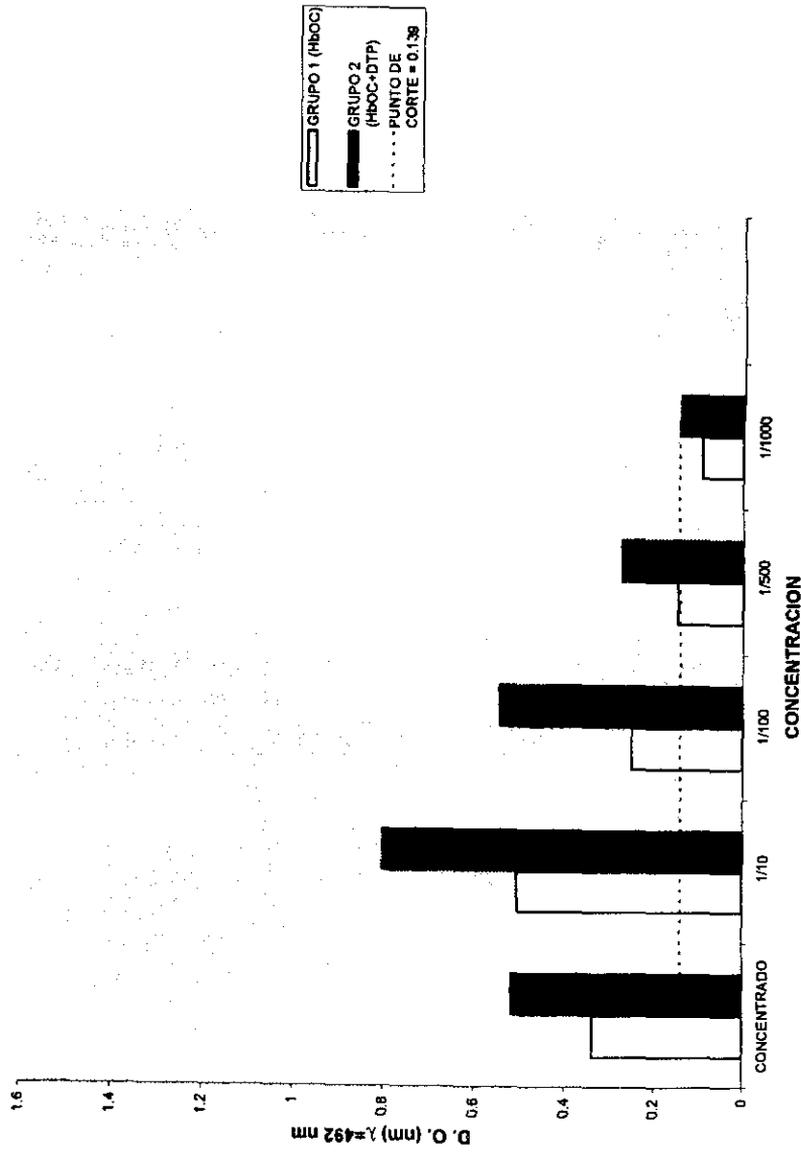
**GRAFICA 3. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON HbOC (GRUPO 1) O CON HbOC+DTP (GRUPO 2). 3ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de la vacuna HbOC (grupo 1) o con tres dosis de la vacuna HbOC+DTP (grupo 2). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

**GRAFICA 4. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON HbOC (GRUPO 1) O CON HbOC+DTP (GRUPO 2). 4ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de la vacuna HbOC (grupo 1) o con tres dosis de la vacuna HbOC+DTP (grupo 2). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica a 492 nm.

**Tabla 19. LECTURAS DE DENSIDAD OPTICA DE LOS SUEROS ANTI-PRP OBTENIDOS DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-D (Grupo 3) O CON PRP-D+DTP (Grupo 4). (Media geométrica grupal).**

CONCENTRACION	MEDIA GEOMETRICA DE LA DENSIDAD OPTICA (2-3) ml															
	SANGRIA 1				SANGRIA 2				SANGRIA 3							
	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO	GRUPO				
1:30	0.536	0.395	0.651	0.822	0.795	0.931	0.215	0.339	0.470	0.649	0.443	0.943	0.472	0.952	0.302	0.694
1:100	0.212	0.332	0.224	0.388	0.271	0.539	0.098	0.324	0.126	0.249	0.114	0.149	0.143	0.219	0.034	0.151
1:1000	0.096	0.127	0.085	0.117	0.093	0.144	0.026	0.083								

Sangría 1: 15 días después de la 3ª inmunización.  
 Sangría 2: 30 días después de la 3ª inmunización.  
 Sangría 3: 45 días después de la 3ª inmunización.  
 Sangría 4: 180 días después de la 3ª inmunización.

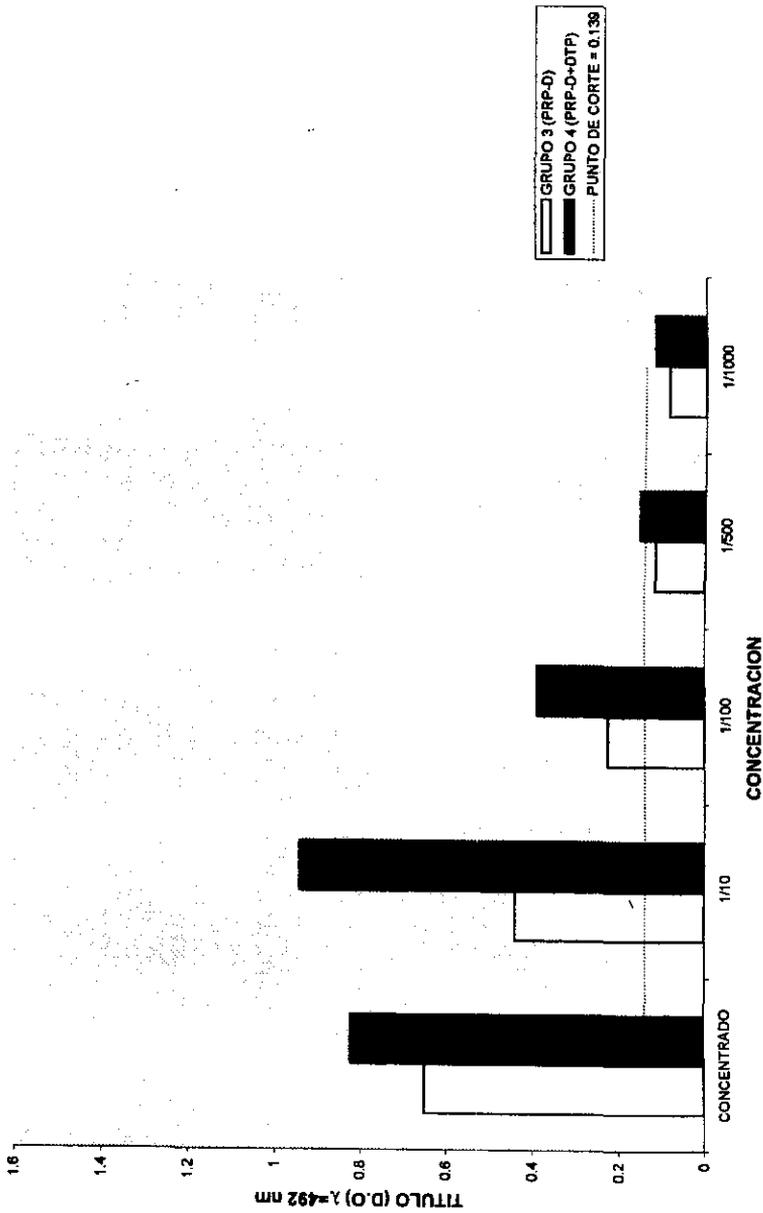
**GRAFICA 5. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-D (GRUPO 3) O CON PRP-D+DTP (GRUPO 4). 1ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW: Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-D (grupo 3) o con tres dosis de PRP-D+DTP (grupo 4). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

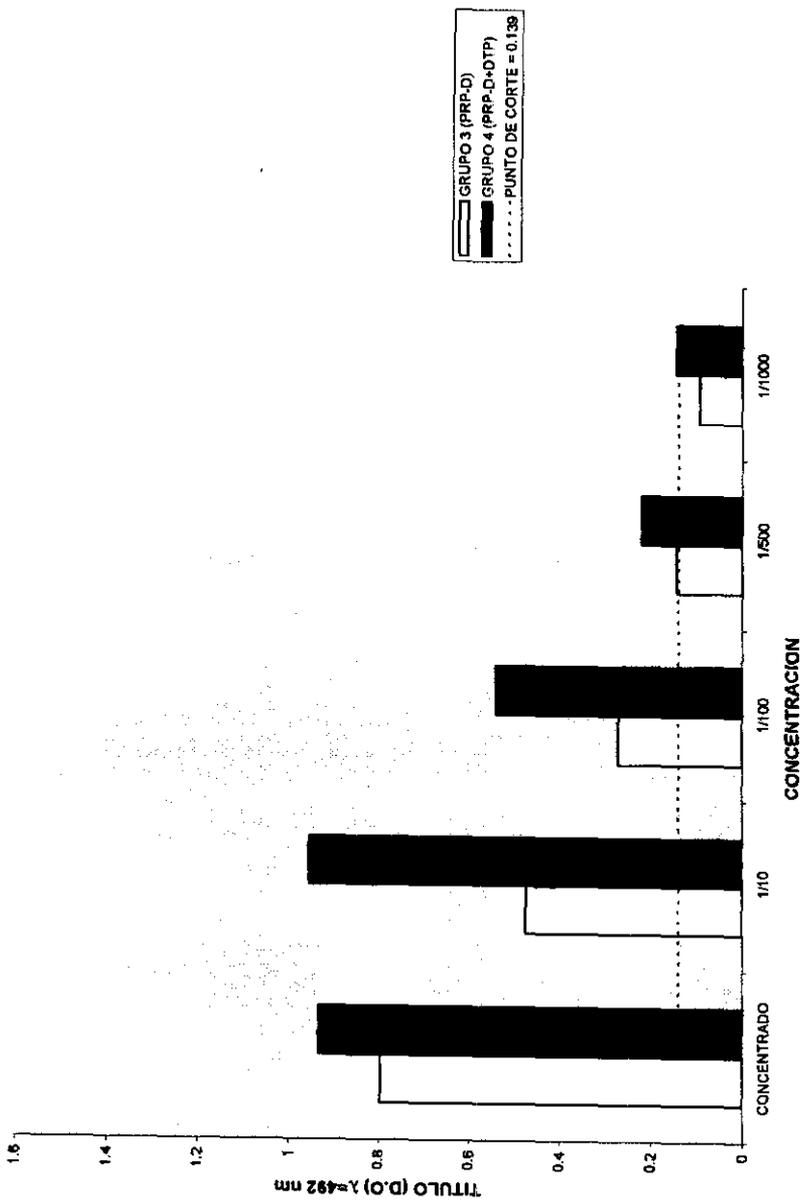
**GRAFICA 6. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-D (GRUPO 3) O CON PRP-D+DTP (GRUPO 4). 2ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-D (grupo 3) o con tres dosis de PRP-D+DTP (grupo 4). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

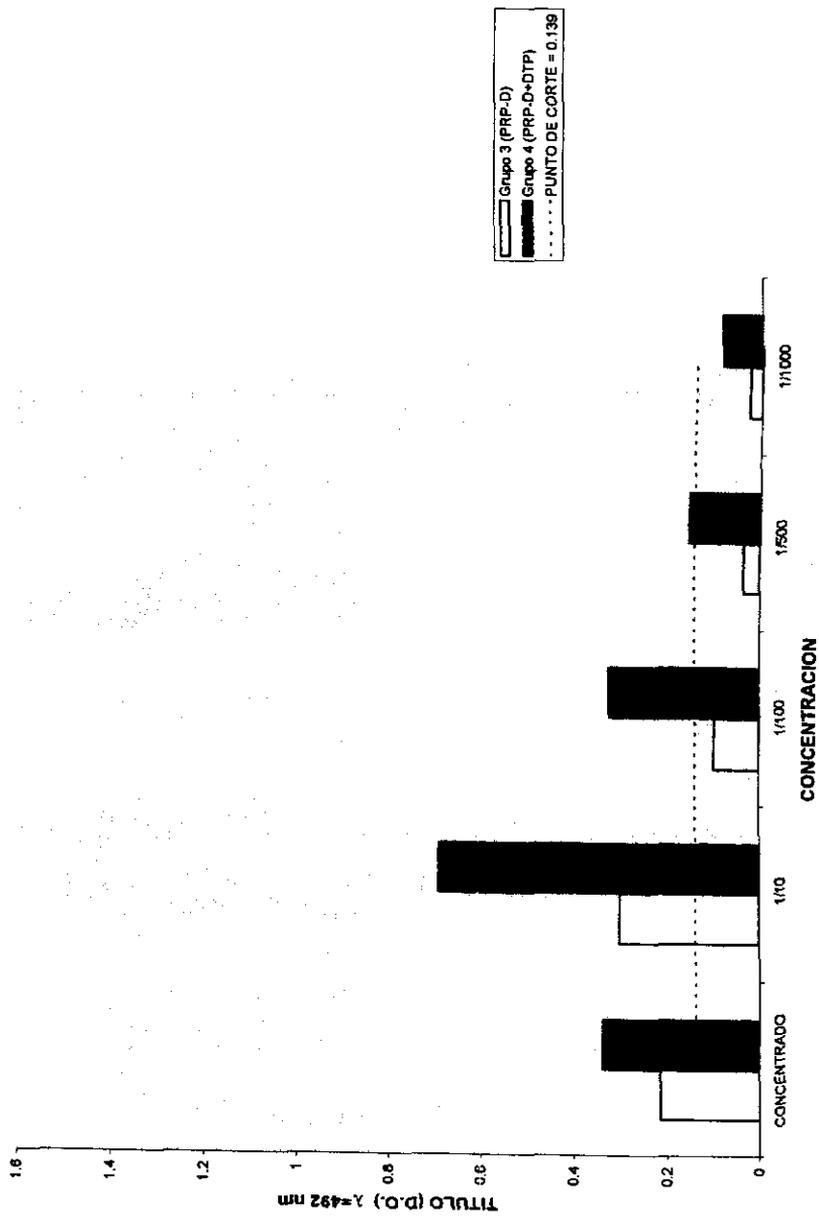
**GRAFICA 7. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-D (GRUPO 3) O CON PRP-D+DTP (GRUPO 4). 3ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-D (grupo 3) o con tres dosis de PRP-D+DTP (grupo 4). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

**GRAFICA 8. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-D (GRUPO 3) O CON PRP-D+DTP (GRUPO 4). 4ª SANGRIA.**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-D (grupo 3) o con tres dosis de PRP-D+DTP (grupo 4). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

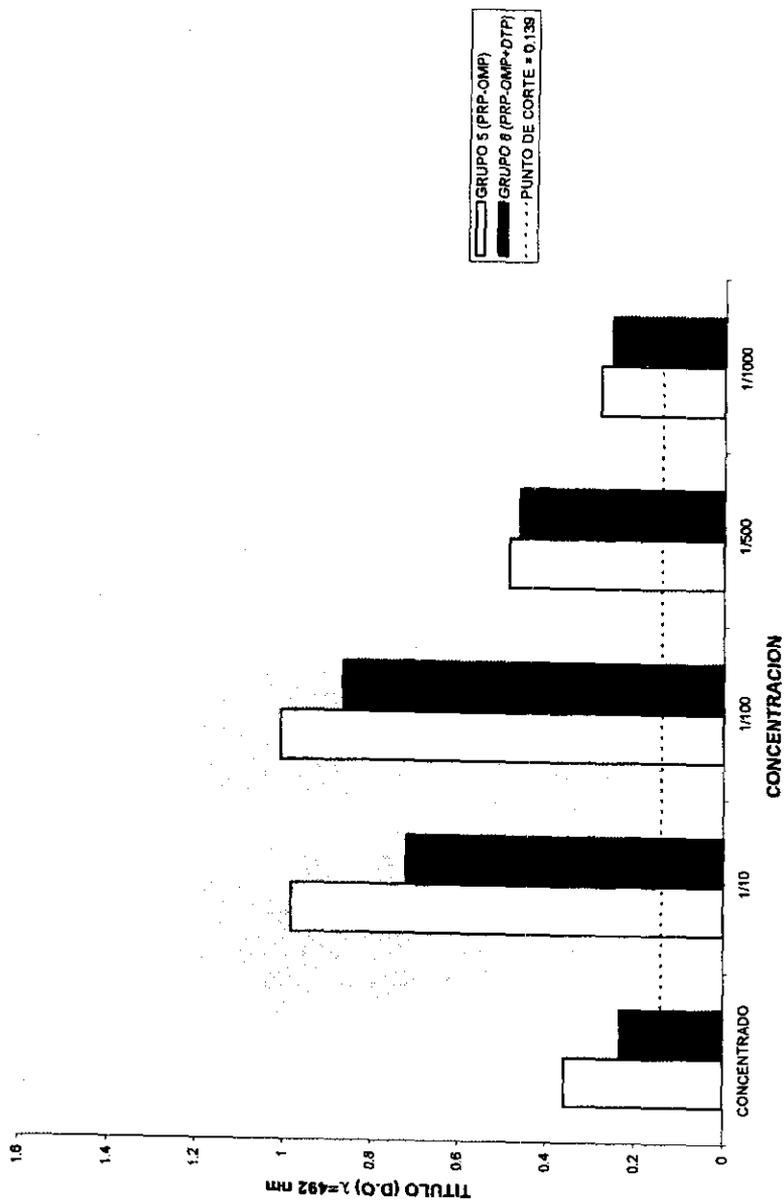
D.O.: Densidad óptica.

**Tabla 20. LECTURAS DE DENSIDAD OPTICA DE LOS SUEROS ANTI-PRP OBTENIDOS DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-OMP (Grupo 5) O CON PRP-OMP+DTP (Grupo 6). (Media geométrica grupal).**

CONCENTRACION	MEDIA GEOMETRICA DE LA DENSIDAD OPTICA (1:412 TIT)											
	SANGRIA 1		SANGRIA 2		SANGRIA 3		SANGRIA 4		SANGRIA 5		SANGRIA 6	
	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 5	GRUPO 6
1:50	0.357	0.231	0.546	0.548	0.739	0.715	0.538	0.444				
1:100	0.982	0.718	1.053	0.989	1.033	1.080	0.745	0.811				
1:500	1.004	0.863	0.969	0.949	0.705	0.803	0.456	0.719				
1:1000	0.484	0.461	0.591	0.584	0.348	0.487	0.179	0.276				
	0.278	0.253	0.418	0.344	0.222	0.330	0.102	0.090				

Sangría 1: 15 días después de la 3ª inmunización.  
 Sangría 2: 30 días después de la 3ª inmunización.  
 Sangría 3: 45 días después de la 3ª inmunización.  
 Sangría 4: 180 días después de la 3ª inmunización.

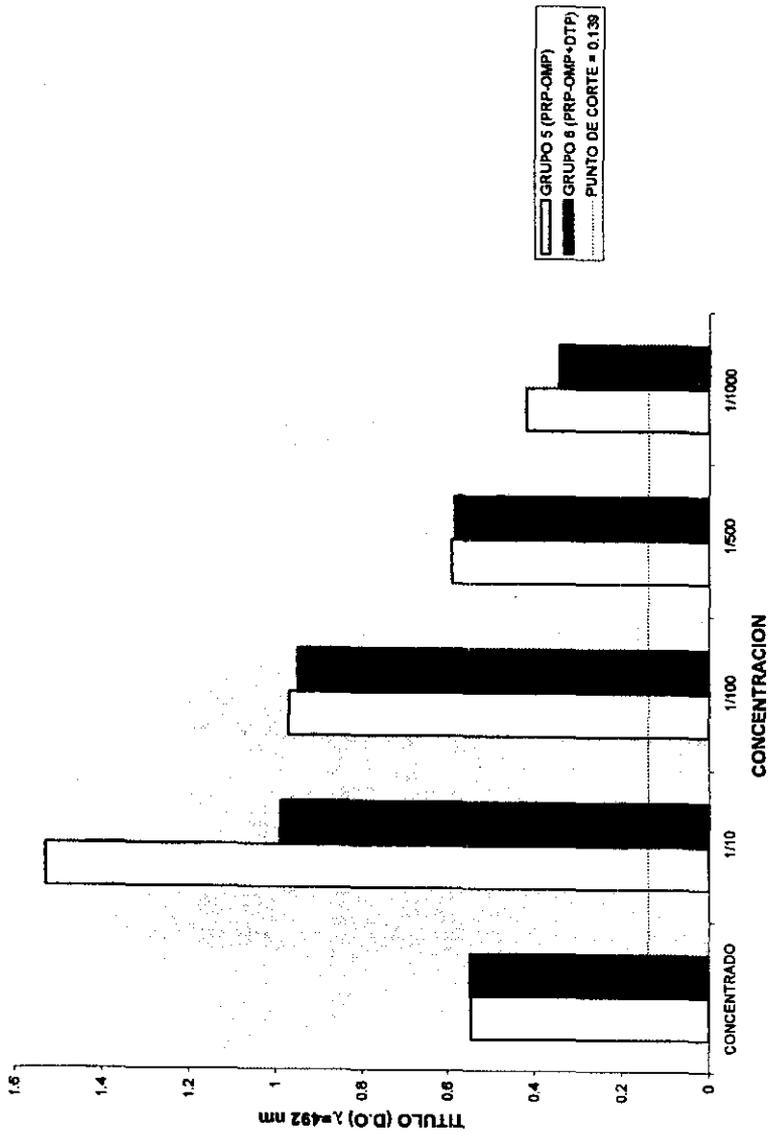
**GRAFICA 9. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-OMP (GRUPO 5) O CON PRP-OMP+DTP (GRUPO 6). 1ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-OMP (grupo 5) o con tres dosis de PRP-OMP+DTP (grupo 6). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

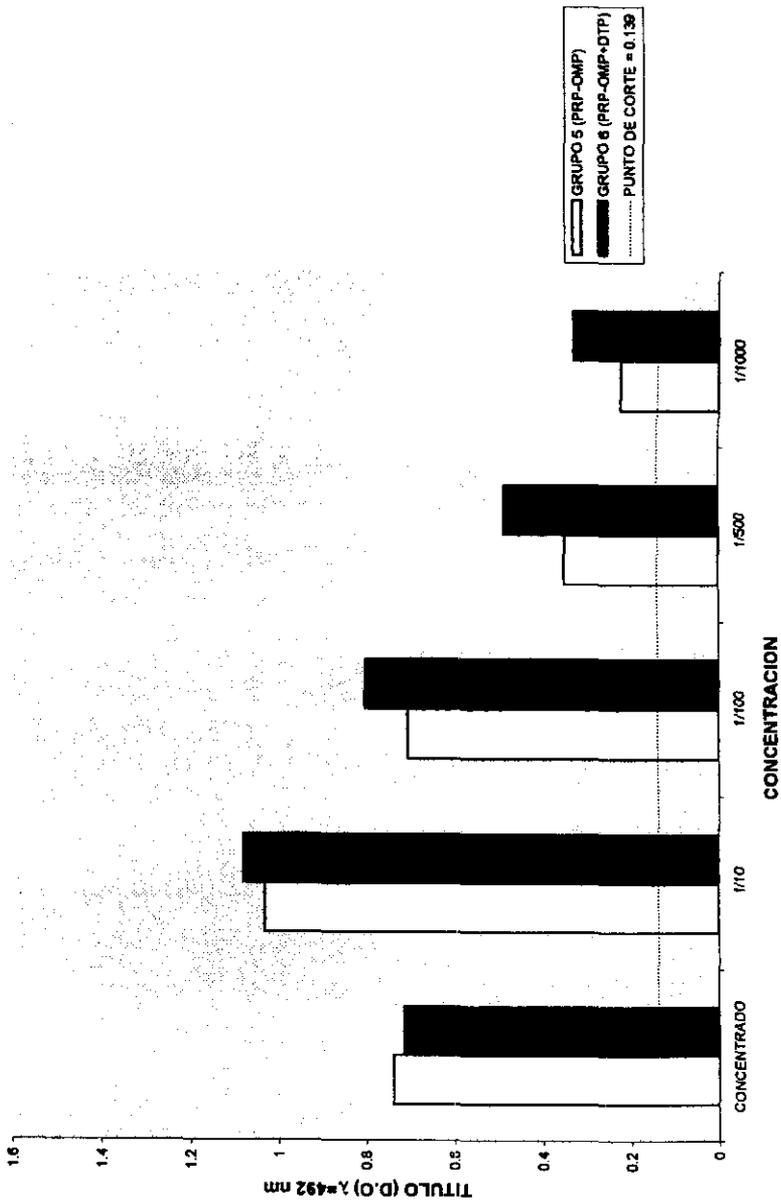
**GRAFICA 10. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-OMP (GRUPO 5) O CON PRP-OMP+DTP (GRUPO 6). 2ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-OMP (grupo 5) o con tres dosis de PRP-OMP+DTP (grupo 6). Los sueros fueron probados por ELISA opata determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

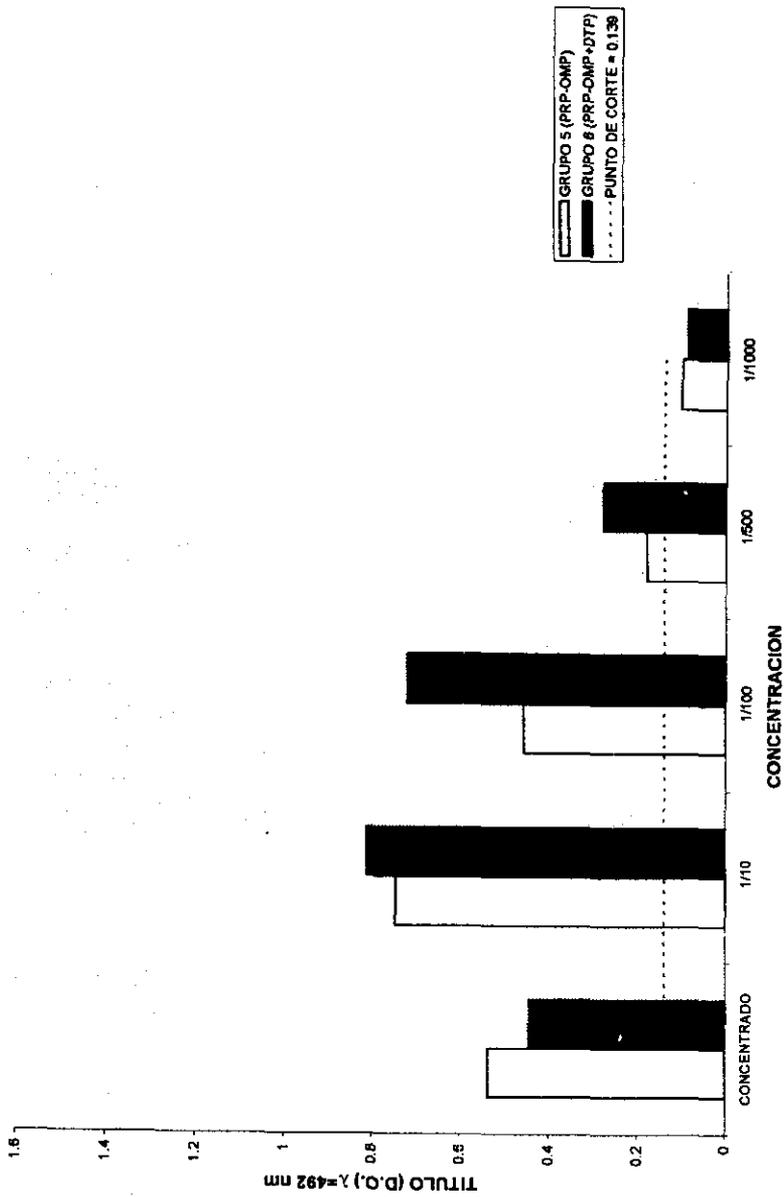
**GRAFICA 11. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-OMP (GRUPO 5) O CON PRP-OMP +DTP (GRUPO 6). 3ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-OMP (grupo 5) o con tres dosis de PRP-OMP+DTP (grupo 6). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica

**GRAFICA 12. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-OMP (GRUPO 5) O CON PRP-OMP+DTP (GRUPO 6). 4ª SANGRIA**



Conejos de la capa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-OMP (grupo 5) o con tres dosis de PRP-OMP+DTP (grupo 6). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

Tabla 21. LECTURAS DE DENSIDAD OPTICA DE LOS SUEROS ANTI-PRP OBTENIDOS DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-1<sup>(a)</sup> (Grupo 7) O CON PRP-1<sup>(a)</sup>+DTP (Grupo 8). (Media geométrica grupal).

CONCENTRACION	MEDIA GEOMETRICA DE LA DENSIDAD OPTICA (D <sub>550</sub> )											
	SANGRIA 1			SANGRIA 2			SANGRIA 3			SANGRIA 4		
	GRUPO 7	GRUPO 8	GRUPO 9	GRUPO 7	GRUPO 8	GRUPO 9	GRUPO 7	GRUPO 8	GRUPO 9	GRUPO 7	GRUPO 8	GRUPO 9
1:10	0.479	0.231	0.126	0.548	0.284	0.715	—	—	—	—	—	0.444
1:100	0.803	0.716	0.334	0.989	0.502	1.080	—	—	—	—	—	0.811
1:1000	0.884	0.863	0.439	0.949	0.627	0.803	—	—	—	—	—	0.719
1:1000	0.753	0.461	0.379	0.584	0.281	0.487	—	—	—	—	—	0.276
1:1000	0.690	0.253	0.387	0.344	0.164	0.330	—	—	—	—	—	0.090

Sangría 1: 15 días después de la 3ª inmunización.

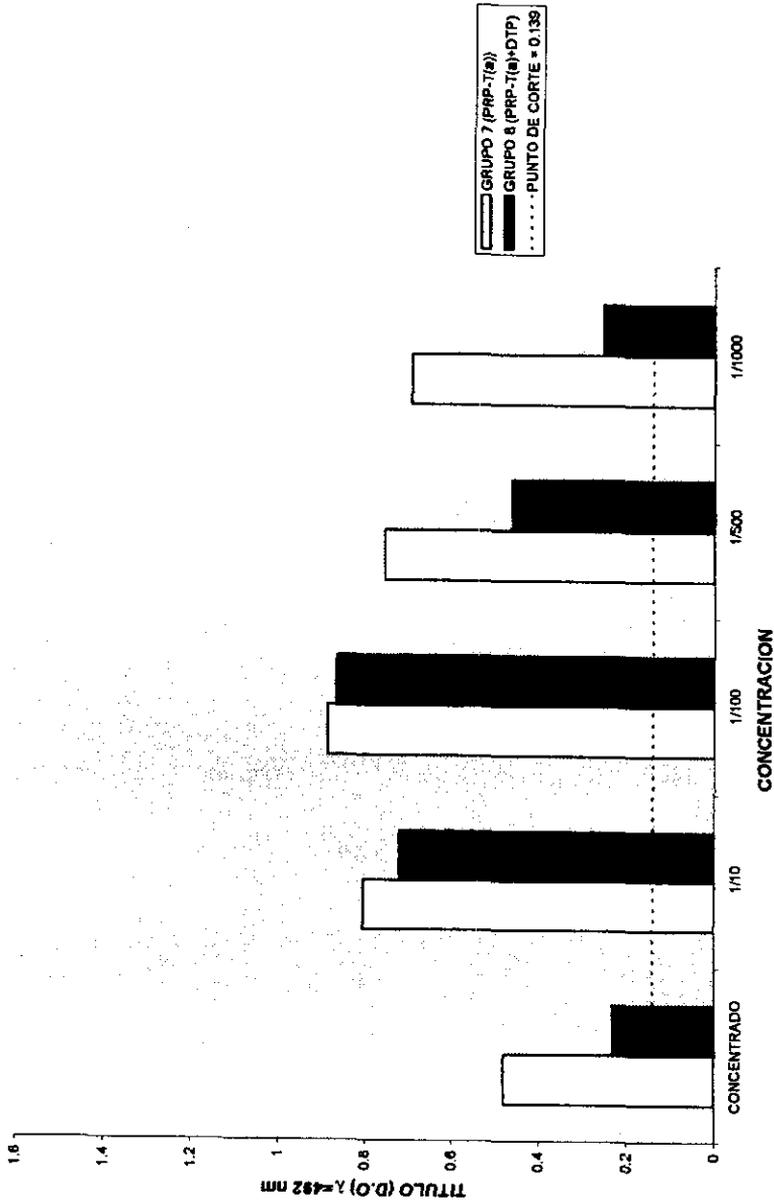
Sangría 2: 30 días después de la 3ª inmunización.

Sangría 3: 45 días después de la 3ª inmunización.

—: No se realizó la 4ª. sangría.

PRP-1<sup>(a)</sup>: Vacuna del proveedor D.

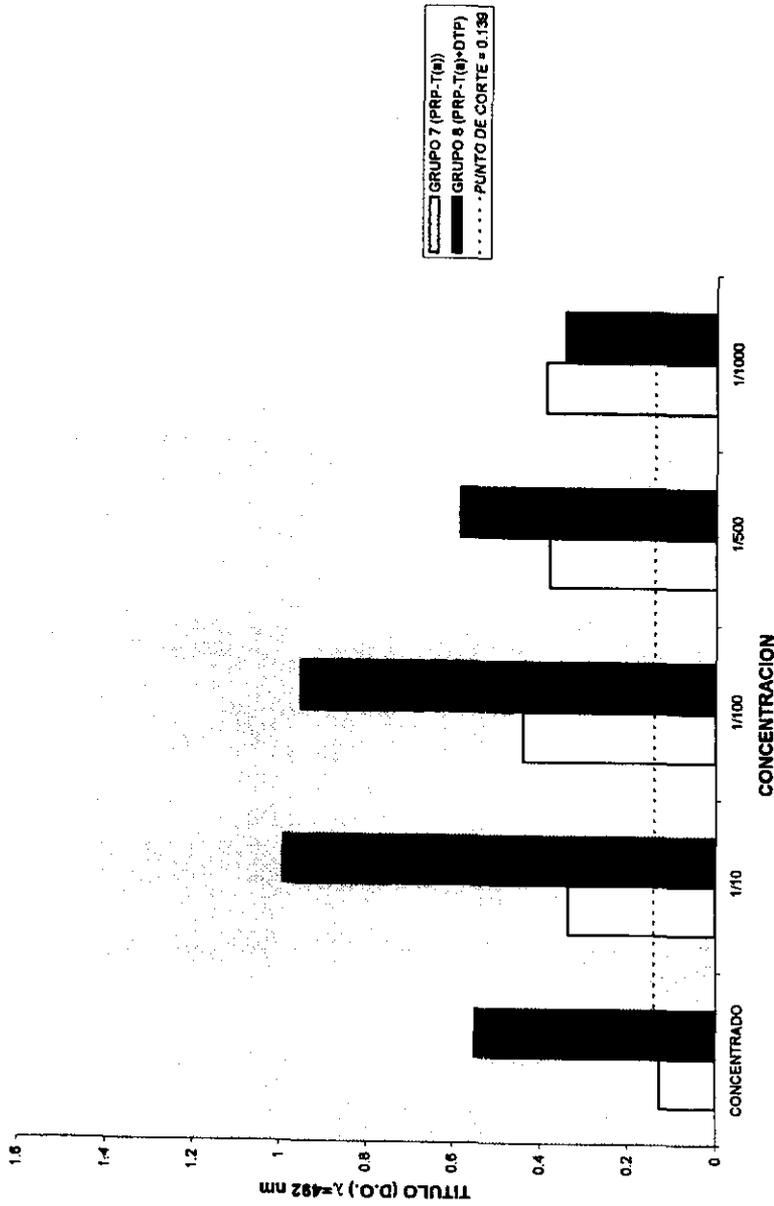
**GRAFICA 13. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-T<sup>60</sup> (GRUPO 7) O CON PRP-T<sup>60</sup>+DTP (GRUPO 8). 1ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-T<sup>60</sup> (grupo 7) o con tres dosis de PRP-T<sup>60</sup>+DTP (grupo 8). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

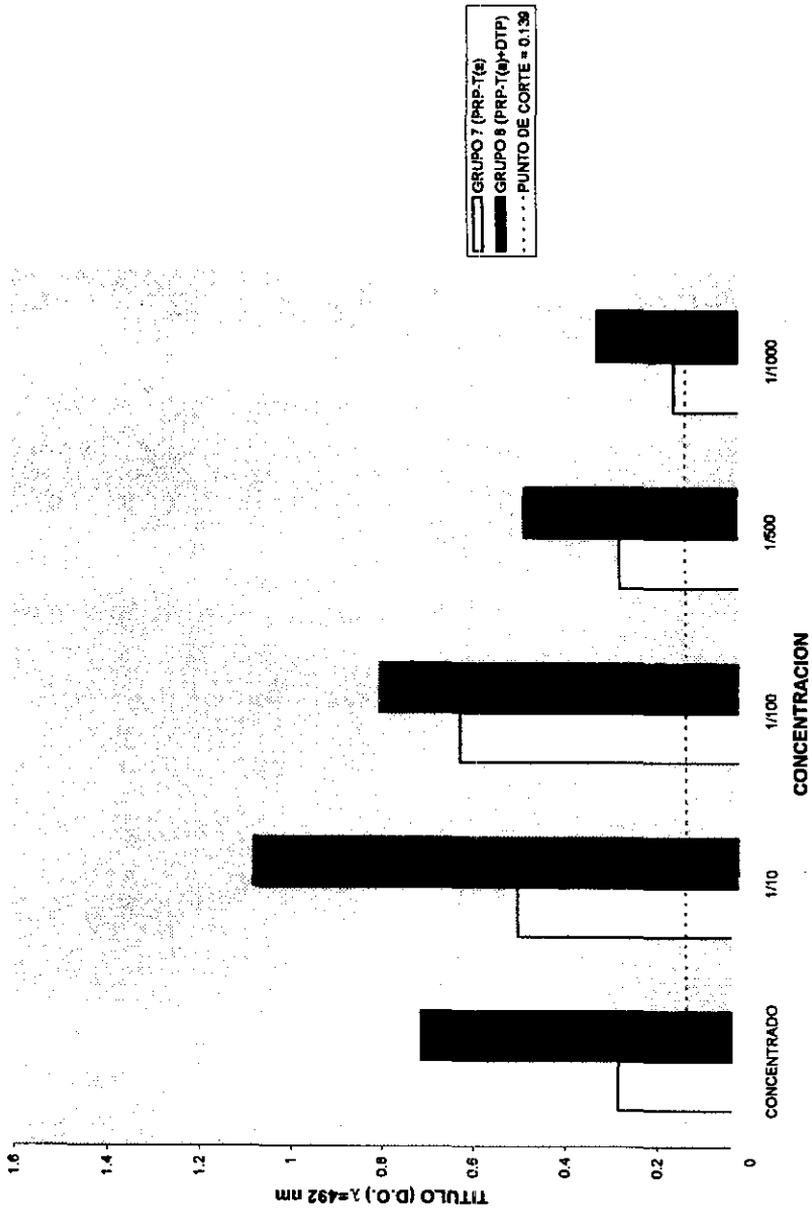
**GRAFICA 14. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-1<sup>63</sup> (GRUPO 7) O CON PRP-1<sup>63</sup>+DTP (GRUPO 8). 2<sup>a</sup> SANGRIA**



Conjeto de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-1<sup>63</sup> (grupo 7) o con tres dosis de PRP-1<sup>63</sup>+DTP (grupo 8). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Demalind Optica.

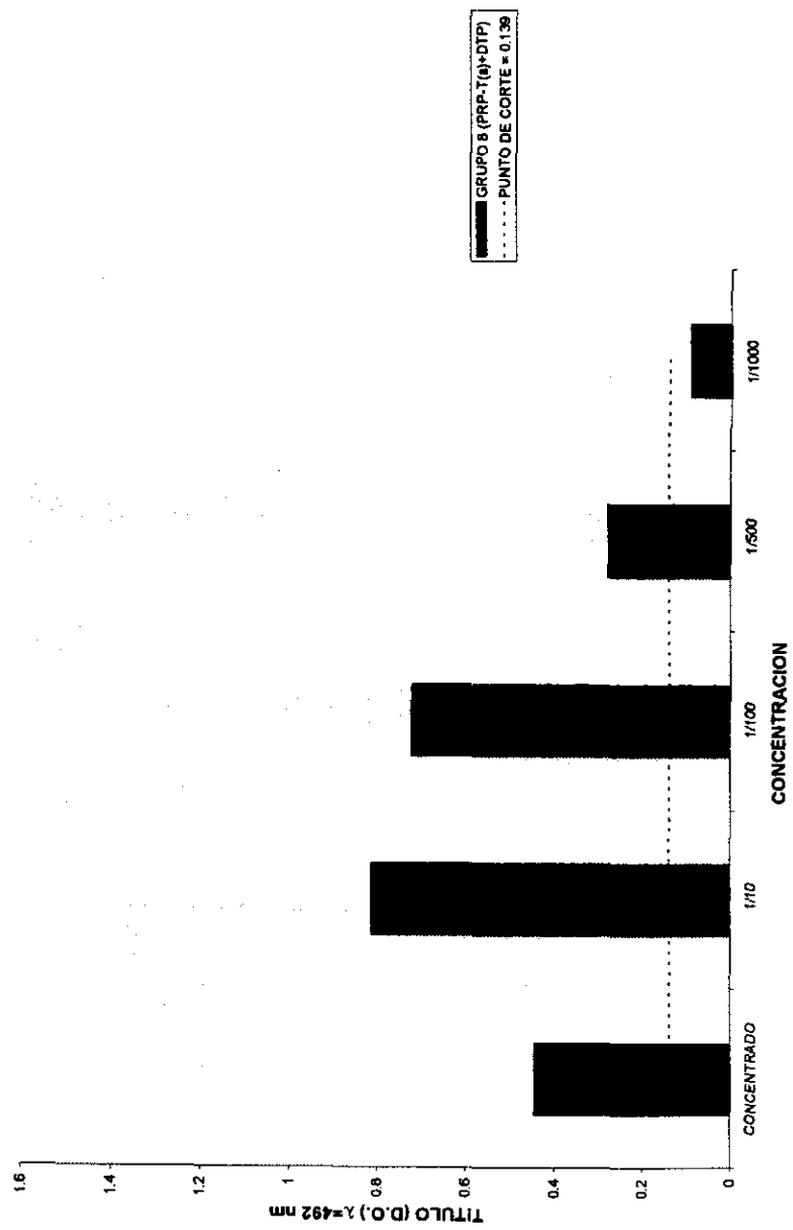
**GRAFICA 15. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-T<sup>(M)</sup> (GRUPO 7) O CON PRP-T<sup>(M)</sup>+DTP (GRUPO 8), 3ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-T<sup>(M)</sup> (grupo 7) o con tres dosis de PRP-T<sup>(M)</sup>+DTP (grupo 8). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

**GRAFICA 16. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-T<sup>(6)</sup>+DTP (GRUPO 8).  
4ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-T<sup>(6)</sup> (grupo 8). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: densidad óptica.

Tabla 22. LECTURAS DE DENSIDAD OPTICA DE LOS SUEROS ANTI-PRP OBTENIDOS DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-T<sup>(b)</sup> (Grupo 9) O CON PRP-T<sup>(b)</sup>+DTP (Grupo 10). (Media geométrica grupal).

CONCENTRACION	MEDIA GEOMETRICA DE LA DENSIDAD OPTICA (1-192 IPTU)											
	SANGRIA 1			SANGRIA 2			SANGRIA 3			SANGRIA 4		
	GRUPO 9	GRUPO 10	GRUPO 9	GRUPO 10	GRUPO 9	GRUPO 10	GRUPO 9	GRUPO 10	GRUPO 9	GRUPO 10	GRUPO 9	GRUPO 10
concentrado	0.480	0.221	0.142	0.183	0.338	0.082	---	---	---	---	---	---
1:10	0.804	0.570	0.338	0.514	0.620	0.406	---	---	---	---	---	---
1:100	0.905	0.805	0.392	0.501	0.509	0.413	---	---	---	---	---	---
1:500	0.756	0.708	0.305	0.406	0.236	0.209	---	---	---	---	---	---
1:1000	0.805	0.571	0.341	0.289	0.165	0.113	---	---	---	---	---	---

Sangría 1: 15 días después de la 3ª inmunización.

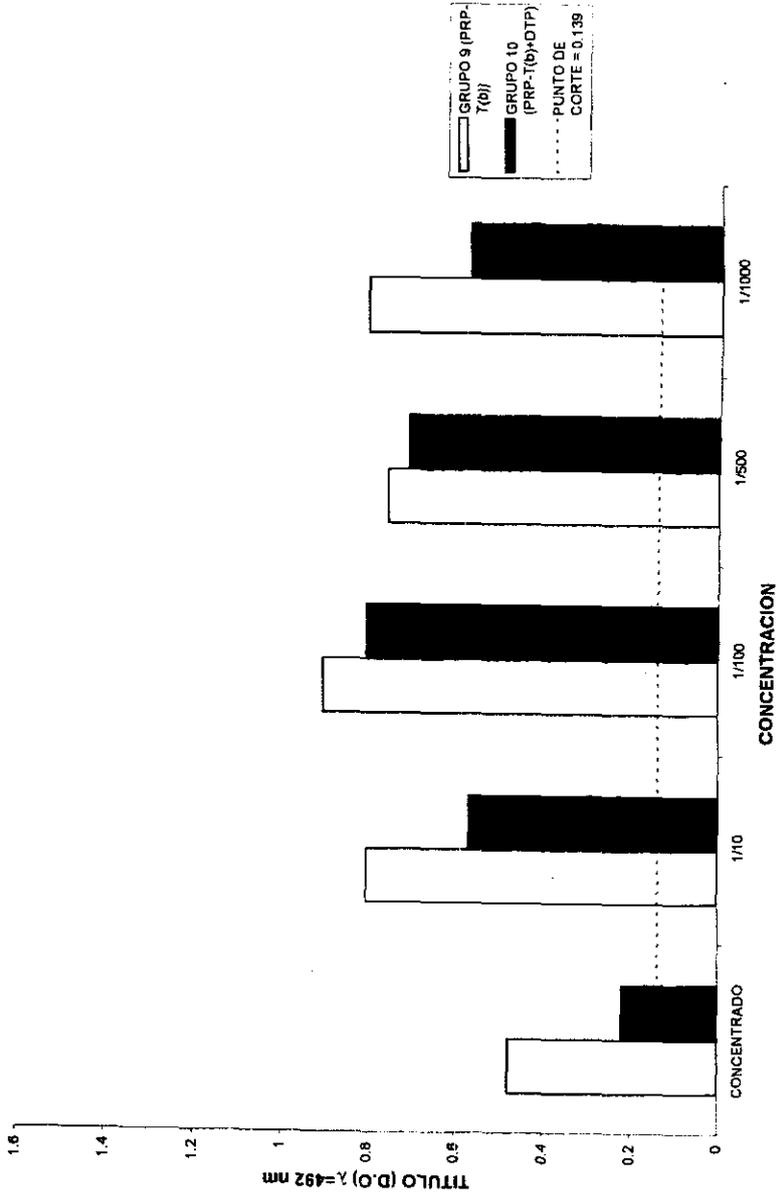
Sangría 2: 30 días después de la 3ª inmunización.

Sangría 3: 45 días después de la 3ª inmunización.

---: No se realizó la 4a. sangría

PRP-T<sup>(b)</sup>: Vacuna del proveedor E.

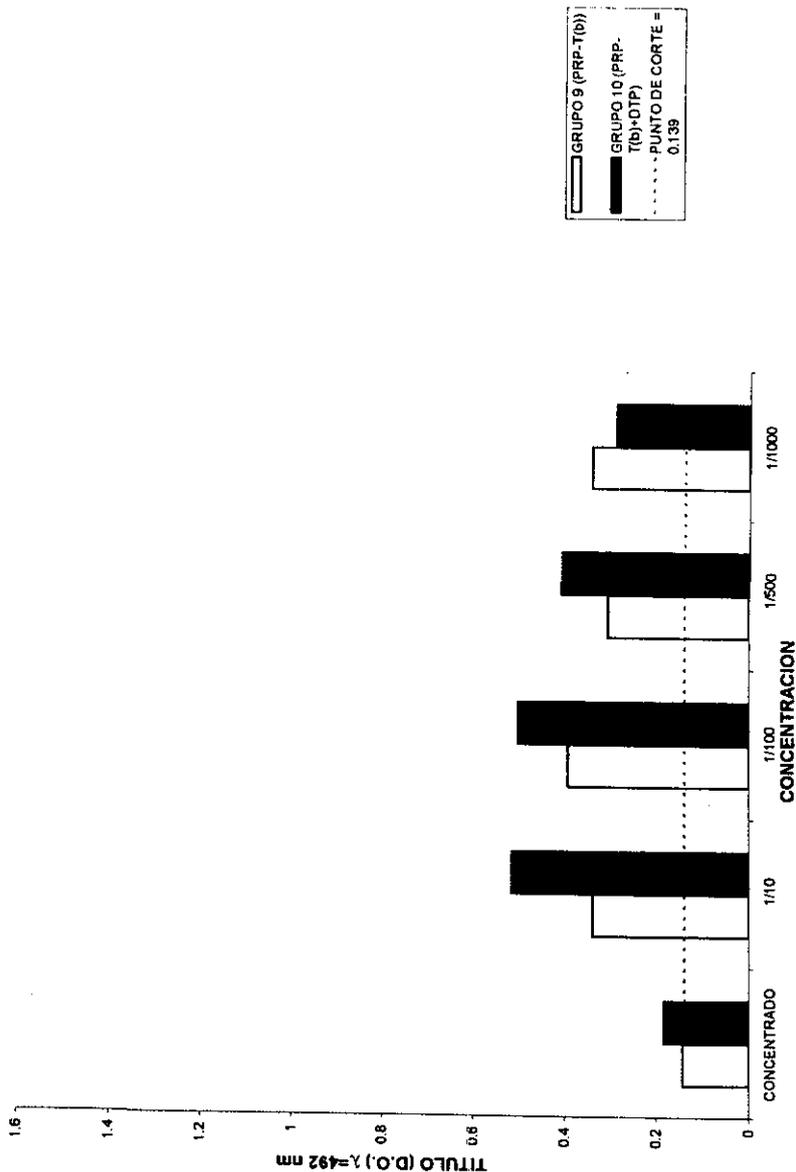
**GRAFICA 17. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-T<sup>(b)</sup> (GRUPO 9) O CON PRP-T<sup>(b)</sup>+DTP (GRUPO 10). 1ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-T<sup>(b)</sup> (grupo 9) o con tres dosis de PRP-T<sup>(b)</sup>+DTP (grupo 10). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

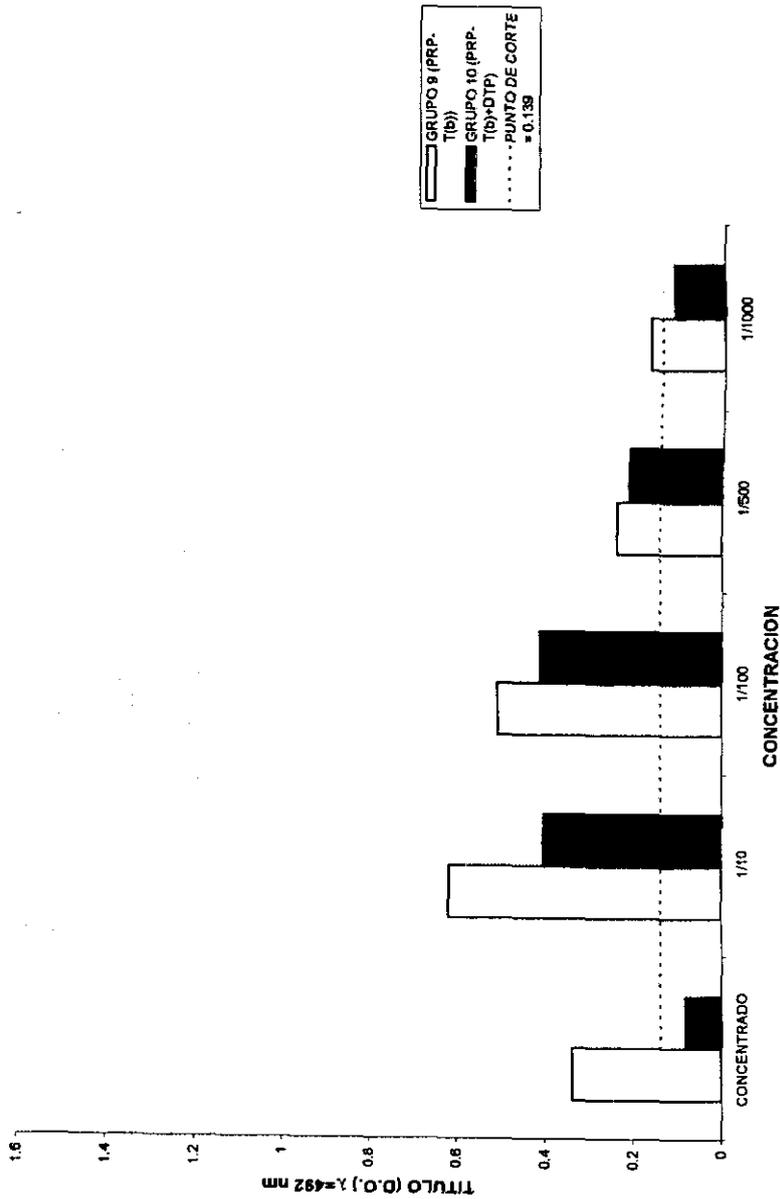
**GRAFICA 18. TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-T<sup>(b)</sup> (GRUPO 9) O CON PRP-T<sup>(b)</sup>+DTP (GRUPO 10). 2ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-T<sup>(b)</sup> (grupo 9) o con tres dosis de PRP-T<sup>(b)</sup>+DTP (grupo 10). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

**GRAFICA 19. TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-PRP EN CONEJOS INMUNIZADOS CON PRP-T<sup>(b)</sup> (GRUPO 9) O CON PRP-T<sup>(b)</sup>+DTP (GRUPO 10). 3ª SANGRIA**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de PRP-T<sup>(b)</sup> (grupo 9) o con tres dosis de PRP-T<sup>(b)</sup>+DTP (grupo 10). Los sueros fueron probados por ELISA para determinar el título de anticuerpos.

D.O.: Densidad óptica.

**TABLA 23. TITULO DE LOS SUEROS DE CONEJO ANTI-PRP PROBADOS POR MEDIO DE LA TECNICA DE ELISA, CONSIDERANDO COMO PUNTO DE CORTE 0.139.**

	TITULO			
	SANGRIA			
	1	2	3	4
1	>1:1000	1:100	1:100	1:500
2	>1:1000	>1:1000	>1:1000	1:500
3	1:100	1:100	1:500	1:10
4	1:500	1:500	>1:1000	1:500
5	>1:1000	>1:1000	>1:1000	1:500
6	>1:1000	>1:1000	>1:1000	1:500
7	>1:1000	>1:1000	>1:1000	—
8	>1:1000	>1:1000	>1:1000	1:500
9	>1:1000	>1:1000	>1:1000	—
10	>1:1000	>1:1000	1:500	—

—: No se realizó la 4ª sangría.

**5.2.2 POTENCIA DE LAS FRACCIONES DIFTERICA, TETANICA Y PERTUSSIS PARA LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LA VACUNA Hib+DTP.**

En la tabla 24 y en la gráfica 20 se muestran los resultados correspondientes a las pruebas de potencia de las fracciones diftérica, tetánica y pertussis de cada una de las vacunas combinadas Hib+DTP probadas. La combinación PRP-OMP+DTP no se sometió al estudio, debido a que no se contó con la cantidad necesaria de la vacuna OMP.

**a) Fracción diftérica.**

Se inmunizaron 6 grupos de cobayos por vía intradérmica (un grupo para el patrón de antitoxina diftérica y los cinco grupos restantes para las combinaciones Hib+DTP y la vacuna DTP sin combinar), formado cada uno por 5 individuos, para conocer la potencia de la fracción diftérica de las 4 vacunas combinadas y del testigo. Al comparar los resultados de potencia de las vacunas combinadas de prueba con los del testigo, se observa que el valor de la potencia se incrementó para las mezclas que incluyeron PRP-HbOC, PRP-D y PRP-T<sup>(a)</sup> y la potencia se mantuvo igual en el caso de la combinación que incluyó la vacuna PRP-T<sup>(b)</sup>. En todos los casos la potencia cumple con la especificación de la Farmacopea Mexicana, 6ª edición, que es de 2.0 ó más UI/ml.

**b) Fracción tetánica.**

Se inmunizaron 6 grupos de ratones por vía subcutánea, formado cada uno por 6 animales (cinco grupos fueron para las combinaciones de prueba y la vacuna DTP sin combinar, y un grupo fue para la serie patrón). La potencia de la fracción tetánica de las combinaciones que incluyeron PRP-D, PRP-T<sup>(a)</sup> y PRP-T<sup>(b)</sup> disminuyó con respecto al testigo y en la combinación que incluyó PRP-HbOC el valor de la potencia no se modificó con respecto al del testigo; sin embargo, en todos los casos los valores de potencia cumplen con la especificación de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6ª edición, que es de no menos de 2.0 ó más UI/ml.

**c) Fracción pertussis.**

La potencia de la fracción pertussis se modificó con respecto al testigo en todas las combinaciones; ésta sólo disminuyó en la combinación PRP-HbOC+DTP y en las combinaciones restantes aumentó. Es importante hacer notar que la prueba de potencia de pertussis demuestra una gran variación, por lo que las diferencias de potencia de las vacunas de prueba con respecto a las del testigo no pueden ser consideradas como significativas. En todos los casos el valor de potencia cumple con la especificación de la Farmacopea Mexicana, 6ª edición, que es de no menos de 5.34 UI/ml.

**Tabla 24. POTENCIA DE LAS FRACCIONES DIFTERICA, TETANICA Y PERTUSSIS PARA LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LA VACUNA Hib+DTP.**

COMBINACION	POTENCIA DE LA FRACCION DIFTERICA (U/ml)	POTENCIA DE LA FRACCION TETANICA (U/ml)	POTENCIA DE LA FRACCION PERTUSSIS (U/ml)
HbOC+DTP	5.0	2.36	5.62
PRP-D+DTP	5.0	2.05	12.05
PRP-T <sup>(a)</sup> +DTP	5.0	2.05	14.65
PRP-T <sup>(b)</sup> +DTP	2.0	2.05	8.96
DTP TESTIGO <sup>(c)</sup>	2.0	2.36	6.89

<sup>(a)</sup> Vacuna del proveedor D.

<sup>(b)</sup> Vacuna del proveedor E.

<sup>(c)</sup> Vacuna DTP usada para la combinación de las cuatro vacunas.

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6ª edición establece las siguientes especificaciones para cada una de las fracciones:

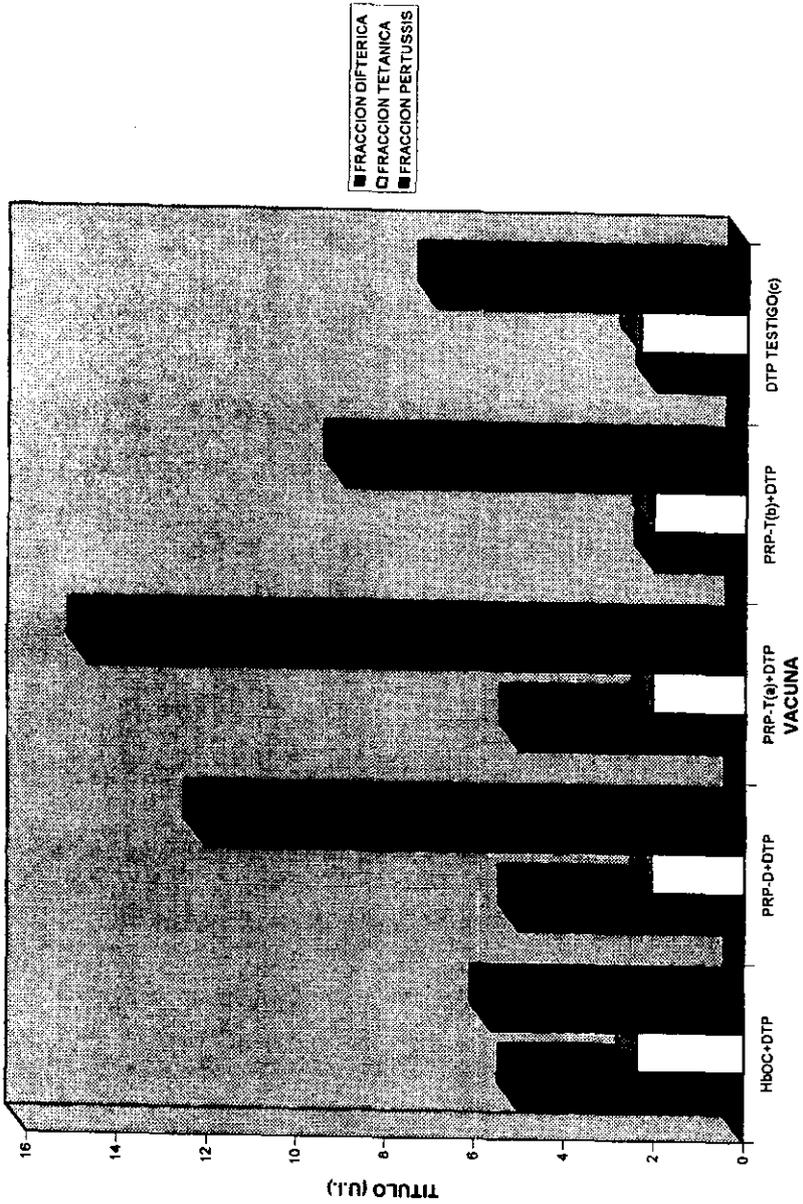
Toxide tetánico - 2.0 ó más U/ml.

Toxide diftérico - 2.0 ó más U/ml.

Vacuna pertussis - No menos de 5.34 U/ml.

\*La combinación OMP+DTP no se sometió al estudio, debido a que no se contaba con la cantidad necesaria de la vacuna OMP.

**GRAFICA 20. POTENCIA DE LAS FRACCIONES DIFTERICA, TETANICA Y PERTUSSIS PARA LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LA VACUNA Hib+DTP**



(a) Vacuna del proveedor D.

(b) Vacuna del proveedor E.

(c) Vacuna DTP del INH utilizada para todas las combinaciones.

U.I.: Unidades internacionales

5.3 TITULACION DE ANTICUERPOS DE LA FRACCION Hib PARA EL ESTUDIO DE DISMINUCION DE LA POTENCIA INMUNOLOGICA DE LA FRACCION Hib DESPUES DE 7 DIAS DE REFRIGERACION (2-8°C) PARA LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE VACUNA Hib+DTP.

En la tabla 25 y en la gráfica 21 se muestran las medias geométricas de las lecturas de densidad óptica ( $\lambda=492$  nm) de los sueros de los conejos inmunizados para el estudio de estabilidad de la fracción Hib de cada una de las combinaciones probadas, después de 7 días de haber mantenido las mezclas en refrigeración. En este estudio intervinieron cuatro grupos de conejos de la cepa NZW de 1.5 a 2.0 Kg de peso, los cuales fueron inmunizados con tres dosis de la combinación correspondiente a intervalos de dos semanas entre una dosis y la siguiente, y fueron sangrados por punción cardíaca dos semanas después de la 3ª inmunización. Los sueros se separaron, se conservaron y se titularon siguiendo la misma metodología que se empleó para determinar la inmunogenicidad de cada una de las combinaciones propuestas y de las vacunas Hib sin combinar. Cabe mencionar que en este estudio no participó la combinación PRP-T<sup>(6)</sup>+DTP, debido a que no se contó con la cantidad suficiente de esta vacuna.

El punto de corte para esta prueba es de 0.192, ya que la media de las lecturas de densidad óptica de los controles negativos fue de 0.151, y la desviación estándar fue de 0.020. Por lo tanto, el título para cada uno de los grupos se determinó como la última dilución en la que se presentó una lectura de densidad óptica superior a 0.192, sin considerar los valores de los sueros concentrados.

En la tabla 26 se reportan los títulos de cada una de las vacunas combinadas de prueba.

Tabla 25. LECTURAS DE DENSIDAD OPTICA DE LOS SUEROS ANTI-PRP OBTENIDOS DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS PARA EL ESTUDIO DE DISMINUCION DE LA POTENCIA INMUNOLOGICA DE LA FRACCION Hib DESPUES DE 7 DIAS DE REFRIGERACION (2-8°C) PARA LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE VACUNA Hib+DTP.

CONCENTRACION	MEDIA GEOMETRICA DE LA DENSIDAD OPTICA ( $\lambda=492\text{ nm}$ )			
	GRUPO 11	GRUPO 12	GRUPO 13	GRUPO 14
Concentrado	0.311	0.446	0.479	0.144
1:10	0.811	0.848	0.788	0.342
1:100	0.767	0.852	0.797	0.482
1:500	0.589	0.616	0.707	0.380
1:1000	0.532	0.376	0.587	0.280

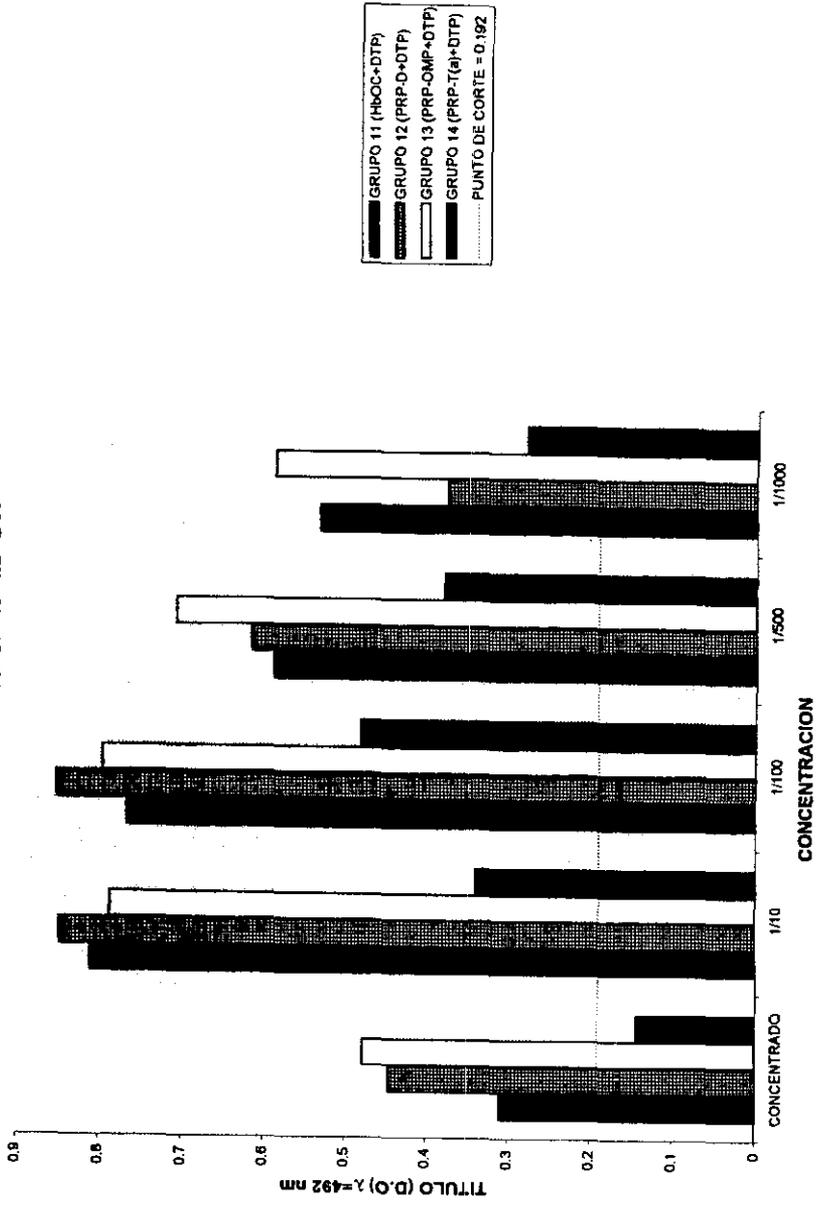
Grupo 11: HbOC+DTP.

Grupo 12: PRP-D+DTP.

Grupo 13: PRP-OMP+DTP.

Grupo 14: PRP-T<sup>(a)</sup>+DTP.

**GRAFICA 21. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PRP PARA EL ESTUDIO DE DISMINUCION DE LA POTENCIA INMUNOLOGICA DESPUES DE 7 DIAS DE REFRIGERACION (2-8°C) PARA LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LAS VACUNAS Hib+DTP**



Conejos de la cepa NZW. Fueron inmunizados con tres dosis de la combinación respectiva después de que ésta se mantuvo en refrigeración (2-8°C) durante 7 días. Los sueros se titularon por ELISA.

D.O.: Densidad óptica

**Tabla 26. TITULO DE LOS SUEROS DE CONEJO ANTI-PRP OBTENIDOS DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS PARA EL ESTUDIO DE DISMINUCION DE LA POTENCIA INMUNOLOGICA DE LA FRACCION Hib DESPUES DE 7 DIAS DE REFRIGERACION (2-8°C) PARA LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE VACUNA Hib+DTP, CONSIDRANDO COMO PUNTO DE CORTE 0.192.**

CONEJO	TITULO
11	>1:1000
12	>1:1000
13	>1:1000
14	>1:1000

## 6. DISCUSION

### 6.1 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA.

Antes de iniciar la evaluación de la potencia de cada una de las vacunas sólo y combinadas propuestas, fue necesario estandarizar las condiciones de la técnica de ELISA, ya que en la actualidad no existen equipos comerciales destinados a la titulación específica de anticuerpos anti-PRP obtenidos en conejos de la cepa NZW, ni de anticuerpos anti-PRP obtenidos en ratones de la cepa NIH y no se cuenta con un método oficial al respecto.

*El esquema de inmunización propuesto para los conejos resultó ser adecuado, tal como lo ha sido en otros laboratorios, bajo las mismas condiciones; sin embargo, ninguno de los dos esquemas probados en ratones funcionó, debido a que la cepa utilizada no es adecuada.*

Las concentraciones seleccionadas para los antígenos y el conjugado demostraron producir la menor cantidad de lecturas con valores inespecíficos (fondo) con respecto a todas las concentraciones probadas, además de resultados altamente reproducibles.

La precisión del sistema, que nos indica el error del método no relacionado con el manejo de las muestras o a la preparación de las mismas, sino con los instrumentos o aparatos utilizados, nos refleja que el sistema es preciso en el 94.67% de las pruebas realizadas bajo el mismo; es decir que existe una variación del 5.32%, lo que resulta satisfactorio, debida a la alta variabilidad que presentan los métodos biológicos en general.

La precisión del método, la cual se evalúa con la finalidad de conocer si éste es adecuado para el rango de los ensayos, resultó ser del 94.83%, lo cual es muy adecuado para pruebas basadas en sistemas biológicos.

El límite de detección (punto de corte/sensibilidad) obtenido fue de 0.084, lo que indica que el método es sensible a valores de densidad óptica iguales o superiores a 0.084.

La exactitud del método no fue calculada, debido a que por el momento no existe un estándar internacional o nacional para sueros anti-PRP obtenidos en conejo, con el que se puedan comparar los resultados obtenidos.

## 6.2 EVALUACION DE LA POTENCIA DE LA FRACCION Hib DE LAS VACUNAS Hib Y DTP SOLAS Y COMBINADAS.

Se llevó a cabo un análisis de varianza multifactorial, de acuerdo al siguiente modelo de efectos fijos:

$$y = \mu + S_i + G_j + C_k + SG_{ij} + SC_{jk} + GC_{jk} + SGC_{ijk} + E_{i(jk)}$$

Donde:

- S<sub>i</sub>: Efecto de las sangrías.
- G<sub>j</sub>: Efecto de los grupos.
- C<sub>k</sub>: Efecto de las concentraciones.
- SG<sub>ij</sub>: Efecto de las sangrías y de los grupos.
- SC<sub>jk</sub>: Efecto de las sangrías y de las concentraciones.
- GC<sub>jk</sub>: Efecto de los grupos y de las concentraciones.
- SGC<sub>ijk</sub>: Efecto de las sangrías, de los grupos y de las concentraciones.
- E<sub>i(jk)</sub>: Error

Este modelo de interacción ofrece la evaluación de los factores por separado (efectos principales), así como de las posibles interacciones en el mismo.

Los valores calculados se presentan en la tabla 27.

Tabla 27. Análisis de varianza de los resultados de la titulación de la fracción Hib de los sueros extraídos de los conejos inmunizados con las vacunas Hib sólo y combinadas con DTP (grupos 1 al 10).

FV	GL	SC	CM	F <sub>calc.</sub>	F <sub>crít.</sub>
S <sub>i</sub>	2	0.934	0.467	0.004	3.00
G <sub>j</sub>	9	5.057	0.561	0.005	1.88
C <sub>k</sub>	4	19.284	4.821	0.071	2.65
SG <sub>ij</sub>	18	1938.309	107.683	1.011	1.62
SC <sub>ik</sub>	8	1162.181	145.272	1.027	2.06
GC <sub>jk</sub>	36	2433.537	67.598	0.634	1.52
SGC <sub>ijk</sub>	72	10180.125	141.390	1.327	1.27
E <sub>t(ijk)</sub>	450	47923.126	106.495		
	599	47763.144	79.738		

FV: Fuente de variación.

GL: Grados de libertad.

SC: Suma de cuadrados.

CM: Cuadrado medio.

F<sub>calc.</sub>: F calculada.

F<sub>crít.</sub>: F crítica (de tablas) ( $\alpha=95\%$  para una F de una sola cola).

S<sub>i</sub>: Efecto de las sangrías.

G<sub>j</sub>: Efecto de los grupos.

C<sub>k</sub>: Efecto de las concentraciones.

SG<sub>ij</sub>: Efecto de las sangrías y de los grupos.

SC<sub>ik</sub>: Efecto de las sangrías y de las concentraciones.

GC<sub>jk</sub>: Efecto de los grupos y de las concentraciones.

SGC<sub>ijk</sub>: Efecto de las sangrías, de los grupos y de las concentraciones.

E<sub>t(ijk)</sub>: Error

De acuerdo con los cálculos efectuados en el análisis de varianza a un nivel de confianza del 95%, no existen diferencias de inmunogenicidad entre las vacunas recibidas por cada uno de los grupos; sin embargo, existe una interacción entre las diferentes sangrías, los 10 grupos y las cinco concentraciones probadas para cada uno de los sueros, lo cual no tiene interpretación válida dado que ningún efecto principal es significativo.

Sin embargo, en base a los resultados expresados en la tabla 23, pueden observarse los siguientes puntos:

a) Grupo 1 (HbOC) vs grupo 2 (HbOC+DTP).

El grupo 2 mantuvo durante las 3 primeras sangrías un título >1:1000 y sólo hasta la 4ª sangría éste decreció a 1:500, a diferencia del grupo 1, el cual sólo obtuvo para la 1ª sangría un título superior a 1:1000, que posteriormente cayó a 1:100 y se recuperó para la 4ª sangría al llegar a

1:500. Lo anterior demuestra que en el caso de la vacuna HbOC la inmunogenicidad de la fracción Hib se ve favorecida al realizar la combinación Hib+DTP, lo que contradice los resultados obtenidos en un estudio realizado por Shinefield y cols.<sup>(24)</sup>, en el que se demostró que los niveles de anticuerpos para PRP fueron significativamente mayores en los niños que recibieron la vacuna combinada.

La vacuna combinada HbOC+DTP tiene mayor capacidad para mantener títulos más estables a lo largo del tiempo que la vacuna sin combinar.

En las gráficas 1, 2, 3 y 4 se observa que en general las lecturas de densidad óptica del grupo 2 en las cuatro sangrías fueron mayores a las del grupo 1 y esta diferencia de valores fue más evidente en las concentraciones intermedias de los sueros, es decir, en 1:10, 1:100 y 1:500.

b) Grupo 3 (PRP-D) vs grupo 4 (PRP-D+DTP).

A lo largo de las 4 sangrías el grupo 4 demostró tener títulos superiores a los del grupo 3, lo cual demuestra que la combinación de las vacunas Hib+DTP favorece la inmunogenicidad de la fracción Hib.

En las gráficas 5, 6, 7 y 8 se observa que las lecturas de densidad óptica del grupo 4 fueron mayores a las del grupo 3, excepto en el caso del suero concentrado de la 1ª sangría (gráfica 5) y que las diferencias de densidad óptica fueron más evidentes en las diluciones 1:10 y 1:100 en todos los casos.

c) Grupo 5 (PRP-OMP) vs grupo 6 (PRP-OMP+DTP).

En este caso ambas vacunas resultaron ser igualmente inmunogénicas, ya que para el caso de cada una de las sangrías se obtuvo el mismo título para la vacuna combinada y sin combinar. Ambas vacunas son capaces de mantener altos títulos a lo largo del tiempo, lo que hace a ambos tipos de vacunas muy recomendables y convenientes para su aplicación rutinaria.

Lo anterior coincide exactamente con lo establecido por Ahonkhai y cols.<sup>(25)</sup>, quien comparó la inmunogenicidad de las vacunas PRP-OMP combinadas y sin combinar con DTP, y concluyó que no existieron variaciones entre los títulos medios geométricos de la fracción PRP de los dos grupos.

Las mayores lecturas de densidad óptica correspondieron al grupo 5 para las primeras dos sangrías, y al grupo 6 para la 3ª y 4ª sangría, según es posible observarlo en las gráficas 9, 10, 11 y 12.

d) Grupo 7 (PRP-T<sup>(a)</sup>) vs grupo 8 (PRP-T<sup>(a)</sup>+DTP).

Al comparar los resultados de las 3 primeras sangrías, puede observarse que al igual que en el caso de los grupos 5 y 6, ambas vacunas son igualmente inmunogénicas y son capaces de mantener buenos títulos a lo largo del tiempo.

En la primera sangría, los mayores valores de densidad óptica corresponden al grupo 7, tal como se observa en la gráfica 13; sin embargo, en las gráficas 14 y 15 se observa que los mayores valores de densidad óptica los presentó el grupo 8 y las diferencias de lectura entre un grupo y otro fueron más notorias en las sangrías 2 y 3. Esto refleja que la vacuna combinada es capaz de mantener un mejor título de anticuerpos a lo largo del tiempo que la vacuna sin

combinar.

e) Grupo 9 (PRP-T<sup>(a)</sup>) vs grupo 10 (PRP-T<sup>(b)</sup>+DTP).

Como se observa en la tabla 23, para el caso de las 2 primeras sangrías, ambas vacunas son igualmente inmunogénicas; sin embargo, para la 3ª sangría, la combinación Hib+DTP parece interferir con la inmunogenicidad de la fracción Hib, ya que el título disminuye y esto no ocurre en el caso de la vacuna sin combinar, es decir, que la vacuna sin combinar tiene una mayor capacidad para mantener los títulos en un nivel deseable. Los resultados obtenidos confirman los resultados arrojados de un estudio realizado en Chile por Ferreccio y cols.<sup>(30)</sup>, en el cual se encontró que al administrar simultáneamente las vacunas PRP-T y DTP por separado o en una misma jeringa, la inmunogenicidad del PRP-T se ve disminuida. En contraste con lo anterior, en estudios realizados en Canadá<sup>(32)</sup> y en Nueva Orleans<sup>(31)</sup> y en el Reino Unido<sup>(33)</sup>, en los que se administraron las vacunas PRP-T y DTP combinadas y por separado, no se observaron diferencias en la potencia del PRP.

En la gráfica 17, referente a la 1ª sangría de los grupos 9 y 10, es posible observar que las lecturas de densidad óptica fueron mayores para los sueros del grupo 9, contrariamente a lo que ocurrió en la 2ª sangría, y en la tercera sangría el comportamiento de las lecturas fue similar al de la 1ª sangría.

Las diferencias encontradas en todos los casos se deben a la influencia del factor tiempo sobre los factores restantes mencionados para el análisis de varianza, lo que indica finalmente que el uso de diferentes inmunógenos y concentraciones de éstos no modifica la respuesta inmune a un tiempo definido.

De acuerdo con lo anterior, es posible concluir que en general resulta muy favorable para la inmunogenicidad de la fracción Hib el combinar ambas vacunas, y que la inmunogenicidad de las vacunas PRP-T<sup>(a)</sup> y PRP-T<sup>(b)</sup> es muy similar.

Al comparar los valores de lectura de la densidad óptica de las vacunas PRP-T, se observa que la vacuna PRP-T<sup>(a)</sup> exhibió en general los valores más altos de densidad óptica, es decir que indujo la formación de las mayores concentraciones de anticuerpos en comparación con las vacunas restantes, bajo las condiciones de prueba de este trabajo (modelo animal, esquema de inmunización y método analítico).

### 6.3 EVALUACION DE LA POTENCIA DE LAS FRACCIONES DIFTERICA, TETANICA Y PERTUSSIS DE LAS VACUNAS Hib Y DTP SOLAS Y COMBINADAS.

Como puede observarse en la tabla 24, ninguna de las combinaciones probadas modifica la inmunogenicidad de la fracción diftérica de una manera desfavorable, ya que en todos los casos el resultado de la potencia cumple con lo especificado en la Farmacopea Nacional vigente; sin embargo, en un estudio previo llevado a cabo por Clemens y cols.<sup>(29)</sup> se demostró que al combinar la vacuna PRP-T con la vacuna triple DTP se exhibieron títulos ligeramente menores para los anticuerpos anti-toxoide diftérico después de la 2ª y 3ª dosis; un estudio realizado por Scheifelle y cols.<sup>(34)</sup> que la administración de las vacunas PRP-D y DTP combinadas produce anticuerpos anti-toxoide diftérico significativamente menores que la administración de estas vacunas por separado. Los estudios de Miller y cols.<sup>(31)</sup>, Scheifelle y cols.<sup>(32)</sup> y Beggy cols.<sup>(33)</sup> demostraron que la administración de las vacunas combinadas PRP-T+DTP, o HbOC+DTP no afecta la potencia de la fracción diftérica.

Con respecto a la potencia de la fracción tetánica, en el caso de las vacunas PRP-D+DTP, PRP-

T<sup>(a)</sup>+DTP y PRP-T<sup>(a)</sup>+DTP se observa que ésta disminuyó ligeramente en relación con la del testigo, a pesar de que en el estudio de Clemens y cols.<sup>(29)</sup> no se detectaron diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos anti-toxide tetánico de grupos que recibieron las vacunas Hib y DTP combinadas y por separado. Según Miller y cols.<sup>(31)</sup> y Scheifelle y cols.<sup>(32)</sup> la administración de las vacunas combinadas PRP-T+DTP, o HbOC+DTP no modifica la potencia de la fracción tetánica y Begg y cols.<sup>(33)</sup> concluyó que los títulos de anticuerpos anti-toxina tetánica se incrementan significativamente al administrar en la misma jeringa las vacunas HbOC o PRP-T con DTP.

En todos los grupos participantes en este trabajo, el valor de la potencia anti-toxide tetánico cumple con la especificación de la Farmacopea Nacional.

La potencia de la fracción pertussis sólo disminuyó en relación con la del testigo, al probar la combinación HbOC+DTP. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Clemens y cols.<sup>(29)</sup>, ya que él demostró que la administración concurrente de la vacuna PRP-T con DTP, ya sea en la misma jeringa, o en diferentes sitios, interfiere con la respuesta anti-pertussis en las series primarias de las inmunizaciones; contrariamente a las conclusiones de Clemens, los estudios Miller y cols.<sup>(31)</sup>, Scheifelle y cols.<sup>(32)</sup> y Begg y cols.<sup>(33)</sup> demostraron que la administración de las vacunas PRP-T y HbOC combinadas con DTP no afectan la inmunogenicidad de pertussis. Por todo lo anterior, es importante considerar que la prueba para la determinación de la potencia anti-pertussis ofrece una amplia variación, y por lo tanto el dato importante es que la potencia cumpla con la especificación mínima establecida en la Farmacopea Nacional.

En la gráfica 20 se exponen los resultados de potencia para todos los componentes de la vacuna DTP con relación a una vacuna testigo, y aquí es posible observar que para las fracciones diftérica y tetánica las combinaciones DTP+HbOC, DTP+PRP-D y DTP+PRP-T<sup>(a)</sup> se comportan de una manera muy semejante entre sí, es decir que favorecen la inmunogenicidad de la fracción diftérica y mantienen a un buen nivel la de la fracción tetánica; la potencia de la fracción pertussis se vio notablemente mejorada en la combinación DTP+PRP-T<sup>(a)</sup> y la combinación que tuvo una menor influencia sobre los resultados de potencia de las fracciones diftérica, tetánica y pertussis fue la PRP-T<sup>(a)</sup>+DTP.

De acuerdo con lo anterior, se establece que las combinaciones más recomendables con respecto a la inmunogenicidad de las fracciones DTP son: PRP-T<sup>(a)</sup>+DTP, PRP-D+DTP y HbOC+DTP, aunque en realidad la combinación PRP-T<sup>(a)</sup> no afecta de manera importante a dichas fracciones.

#### **6.4 EVALUACION DE LA DISMINUCION DE LA POTENCIA INMUNOLOGICA DE LA FRACCION Hib DE LAS VACUNAS Hib+DTP A TEMPERATURA DE REFRIGERACION (2-8°C) DESPUES DE 7 DIAS DE HABER REALIZADO LAS MEZCLAS.**

Se llevó a cabo un análisis de varianza de un criterio de clasificación con un nivel de confianza del 95%, para comparar las lecturas de densidad óptica obtenidas de cada uno de los sueros de los conejos inmunizados con las combinaciones de prueba que se sometieron a la temperatura de refrigeración (2-8°C), con la finalidad de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos de datos.

Los valores calculados se presentan en la tabla 28.

Tabla 28. Análisis de varianza de los resultados del estudio de disminución de la potencia inmunológica de la fracción Hib de las vacunas combinadas y mantenidas en refrigeración (2-8°C) 7 días después de su mezcla (grupos 11, 13 y 14).

FV	GL	SC	CM	F <sub>calc.</sub>	F <sub>crit. (α=95%)</sub>
C	2	2.69001	1.34501	0.089	3.68
G	4	2.12570	0.53143	0.035	3.06
GC	8	208.42645	26.05331	1.741	2.64
GC <sub>ij</sub>	15	-224.3822	-14.95881		
E <sub>(99)</sub>	29	-252.0129	-8.69010		

- FV: Fuente de variación.  
 GL: Grados de libertad.  
 SC: Suma de cuadrados.  
 CM: Cuadrado medio.  
 F<sub>calc.</sub>: F calculada.  
 F<sub>crit.</sub>: F de tablas ( $\alpha=95\%$  para una F de una sola cola).  
 G<sub>i</sub>: Efecto de los grupos.  
 C<sub>j</sub>: Efecto de las concentraciones.  
 GC<sub>ij</sub>: Efecto de de los grupos y de las concentraciones.  
 E<sub>(99)</sub>: Error

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas combinaciones administradas a los grupos participantes, lo cual refleja que la fracción Hib de las 4 vacunas probadas es igualmente potente 7 días después de haber mantenido las mezclas respectivas en refrigeración (2-8°C).

Todas las combinaciones probadas arrojaron títulos altos, que no difieren en general de los obtenidos para los sueros de los grupos 2, 4, 6 y 8, lo que indica que el mezclar las vacunas Hib y DTP y mantenerlas posteriormente en refrigeración durante 7 días no afecta sus propiedades inmunogénicas.

## 7. CONCLUSIONES

- 7.1 Se observó que existe una tendencia referente a un incremento de la inmunogenicidad contra *Haemophilus influenzae* tipo b al combinar las vacunas Hib con la vacuna DTP, con respecto a la vacuna Hib sin combinar.
- 7.2 Después de la aplicación de los esquemas de inmunización completos a modelos animales, las combinaciones más inmunogénicas resultaron ser aquéllas que incluyen el PRP-T, seguidas por las de PRP-OMP.
- 7.3 La potencia de cada uno de los componentes (PRP, difteria, tétanos y pertussis) no se vio afectada de manera significativa después del proceso de combinación.
- 7.4 La inmunogenicidad de la fracción Hib de las mezclas no se vio afectada después de haberlas mantenido durante 7 días a la temperatura de refrigeración (2-8°C), lo que refleja que el PRP es estable en esas condiciones, y esto facilita que las vacunas puedan combinarse y mantenerse en refrigeración hasta por una semana, en caso de que no sea posible administrarlas inmediatamente después de que las vacunas Hib y DTP han sido combinadas.
- 7.5 La administración simultánea de las vacunas Hib y DTP en conejos demostró ser adecuada, ya que los títulos de anticuerpos o potencia de cada uno de los inmunógenos involucrados no se vieron afectados, e incluso en algunos casos se incrementaron y la potencia de la fracción Hib a temperatura de refrigeración (2-8°C) después de 7 días de haber efectuado las combinaciones, demostró ser aceptable.
- 7.6 Los resultados obtenidos constituyen un punto de partida para iniciar la selección de la mejor combinación Hib+DTP; sin embargo, es importante recalcar que el criterio final para la selección de la mejor combinación Hib/DTP depende de los estudios clínicos que se lleven a cabo en la población mexicana, lo cual está fuera del alcance de este trabajo.
- 7.7 La cepa de ratones NIH demostró no ser adecuada para llevar a cabo estudios para la titulación de la fracción Hib de las vacunas Hib+DTP combinadas.

## 8. APENDICE

### 8.1 PREPARACION DE SOLUCIONES.

#### 8.1.1 Regulador de carbonatos pH=9.2±0.1

Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	7.0 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	2.8 g (pH=10.3)
Agua destilada	c.b.p. 1000.0 ml

Disolver todos los ingredientes y mezclarlos hasta obtener una solución homogénea.

NOTA: Esta solución debe prepararse justo en el momento de su uso.

#### 8.1.2 Solución del antígeno

a) Antígeno de PRP-T a una concentración de 10 mg/ml.  
Cada vial de la vacuna PRP-T<sup>(a)</sup> se reconstituyó con 0.5 ml del disolvente para ésta + 0.5 ml del regulador de carbonatos, para obtener una concentración de 100 mg/ml; posteriormente se prepararon con regulador de carbonatos las siguientes diluciones seriadas: 1:2 (50 mg/ml) y 1:5 (10 mg/ml).

b) Antígeno de PRP-CRM<sub>197</sub> a una concentración de 5 mg/ml.  
Cada vial de la vacuna HbOC se reconstituyó con 0.5 ml de solución reguladora de carbonatos (10 mg/ml) y se preparó una dilución 1:2 (5 mg/ml).

NOTA: El antígeno PRP-T<sup>(a)</sup> se utilizó para titular los sueros provenientes de todos los conejos, excepto de aquéllos inmunizados con las vacunas PRP-T<sup>(a)</sup> o PRP-T<sup>(b)</sup> sólo o combinadas; para la titulación de los sueros de los conejos inmunizados con las vacunas PRP-T<sup>(a)</sup> o PRP-T<sup>(b)</sup> sólo o combinadas, se utilizó como antígeno HbOC.

#### 8.1.3 Solución reguladora de fosfatos (PBS 10X) pH=7.4±0.1

Cloruro de sodio (NaCl)	87.0 g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	11.0 g
Fosfato monobásico de sodio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O) pH=5.8	3.5 g
Agua destilada	c.b.p. 1000.0 ml

Disolver todos los ingredientes y mezclarlos hasta obtener una solución homogénea.

#### 8.1.4 Solución reguladora de fosfatos (PBS 1X) pH=7.4±0.1

PBS 10X	100.0 ml
Agua destilada	900.0 ml

Disolver todos los ingredientes y mezclarlos hasta obtener una solución

Disolver todos los ingredientes y mezclarlos hasta obtener una solución homogénea.

8.1.5 Solución reguladora de bloqueo (PBS-leche al 1%)

Solución de PBS 1X	100 ml
Leche descremada	1.0 g

Disolver todos los ingredientes y mezclarlos hasta obtener una solución homogénea.

8.1.6 Solución de lavado (PBS-Tween al 0.05%)

Tween 20	0.5 ml
PBS 1X	1000.0 ml

Mezclar los componentes hasta obtener una solución homogénea.

8.1.7 Solución reguladora de citratos pH=5.6±0.1

Citrato de sodio (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	2.9 g
Acido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0.4 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Disolver todos los ingredientes y mezclarlos hasta obtener una solución homogénea.

8.1.8 Solución del conjugado IgG de cabra α-inmunoglobulinas de conejo acopladas a peroxidasa 1:2000.

Con solución reguladora de carbonatos se prepararon las siguientes diluciones seriadas del conjugado: 1:10, 1:100, 1:100 y 1:2000.

8.1.9 Solución del sustrato de la enzima.

Regulador de citratos	6.0 ml
O-fenilendiamina (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> )	5.0 mg

\*Peróxido de hidrógeno  
al 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 25.0 ml  
\* Se adiciona justo en el momento de utilizar la solución.

7.1.10 Solución de Acido Sulfúrico 8N.

Acido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pureza=96%)	22.21 ml
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

Preparar la solución en un matraz volumétrico de 100 ml.

8.1.11 Solución 0.15M de Cloruro de sodio.

Cloruro de sodio (NaCl)	8.76 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

8.1.12 Regulador de Glenny pH=8±0.1

Borato de sodio (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	3.16 g
Acido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	4.66 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.50 g
Agua destilada c.b.p.	2000.0 ml

8.1.13 Medio de Bordet Gengou

1. Lavar y pelar 190.0 g de papas de buena calidad y cortarlas en tiras.
2. Hervir las papas en 1500.0 ml de agua.
3. Filtrar el fluido a través de una gasa.
4. Preparar la mezcla siguiente:

Filtrado de papa	1000.0 ml
Glicerol	15.0 ml
Cloruro de sodio	9.97 g
Proteosa-peptona	15.0 g
Agar	15.0 g

Ajustar el pH final a 7.0.

Después de esterilizar, agregar sangre de camero o de conejo para tener una concentración final del 15 al 20% v/v.<sup>(39)</sup>

8.1.13 Solución isotónica al 1% de aminoácidos de caseína.

Aminoácidos de caseína	5.0 g
Cloruro de sodio	4.25 g
Agua destilada c.b.p.	500.0 ml
Ajustar el pH final a 7.2 <sup>(39)</sup>	

## BIBLIOGRAFIA:

1. HbOC Vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae* b. Documento técnico-informativo. Instituto Mexicano del Seguro Social. Septiembre, 1993.
2. Development of an improved DTP vaccine and DTP based combination vaccine. SIREVA. OMS/OPS (1994).
3. Recommendations for use of *Haemophilus* b Conjugate vaccines and a Combined Diptheria, Tetanus, Pertussis, and *Haemophilus* b vaccine. MMWR. 42:13. 1-15 (1993).
4. Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R. P. **INFECTIOUS DISEASES**. Churchill Livingstone U.S.A. (1995).
5. Iwarson Sten. World-wide strategies for immunization against invasive *Haemophilus influenzae* Type b disease. Vaccine, 11, Suppl. 1. S28-S29.
6. Arredondo G. José Luis, Espinoza Luz Elena, Zepeda Hector. Infecciones por *Haemophilus influenzae*. Problema actual en pediatría. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 44,12. (Diciembre 1987). 777-785.
7. World Health Organization (WHO) Technical Report Series. No. 814. Annex 1. Requirements for *Haemophilus* type b conjugate vaccines (Requirements for Biological Substances No. 46). 15-37. (1991).
8. Masso F., Páez A., Arista A., Salmon L. and Montano L. Antibody response of mexican infants to *Haemophilus influenzae* type b capsular polyribosylribitol phosphate. Differences between natural and vaccine induced (oligosaccharide-CRM<sub>197</sub> conjugated vaccine) immunization. Archives of Medical Research. 27: 4. 539 - 545. (1996).
9. Tetramune. (DPT/HbOC). Vacuna cuádruple. Difteria, Tos ferina, Tétanos, *Haemophilus influenzae* tipo b. Información científica. Laboratorios Wyeth-Lederte. 1995.
10. Gervais Alain and Suter Susanne. Need for prevention of invasive *Haemophilus influenzae* type b infections in Geneva, Switzerland. Vaccine, 11, Suppl. 1, 534-537. (1993).
11. Santosham Mathuram. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. Vaccine, 11, Suppl. 1 S52-S57. (1993).
12. Granoff D.M., Rathore M.H., Holmes S.I., Granoff P.D., Lucas A.H. Effect of Immunity to the carrier protein on antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b vaccines. Vaccine, 11, Suppl. 1. S46-S51. (1993).
13. Schneerson, R., Barrera, O., Sutton, A. and Robbins. J.B. Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide protein conjugates. J. Exp. Med. 152, 361-376. (1980)
14. Smith, D.H., Madore D.V., Eby R.J., Anderson P.W., Insel R.A., Johnson C.L. *Haemophilus* b Oligosaccharide-CRM<sub>197</sub> and other *Haemophilus* b conjugate vaccines: A status report. Immunobiology of proteins and peptides.

15. Black S.B., Shinefield HR, Lampert D, et al. Safety and Immunogenicity of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in infancy. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 10, 92-6. (1991).
16. Ward J.I., Brennenman G., Lepow M., Lum M., Burkhardt K, Chiv C.Y., *Haemophilus influenzae* type b anticapsular antibody responses to PRP-Pertussis and PRP-D vaccines in Alaska native infants. *J. Infect. Dis.* 158. 719-723. (1988)
17. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: Recommendations for immunization with Recently and Previously Licensed Vaccines. Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics. *Pediatrics.* 92. 3 480-488 (1993)
18. Eskola J, Kayhty H., Takala SK, et al. A randomized, prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infants young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *N. Engl. J. Med.* 323. 1381-1387 (1990).
19. Ward J. Brennenman G., Letson G.M., Heyward W.L. Alaska *Haemophilus influenzae* Vaccine Study Group. Limited efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Alaska Native Infants. *N. Engl. J. Med.* 323: 1393-1400. (1990).
20. Black S.B., Shinefield H.R., Fireman B., et al. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in a United States population of 61, 080 children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 10. 97-104 (1991).
21. Fritzell B., Plotkin S. Efficacy and safety of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine. *J. Pediatr.* 121:355-362. (1992).
22. Booy R., Moxon E.R., Macfarlane J.A. Mayon-White R.T., Slack MPE. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Oxford region. *Lancet.* 340: 847. (1992).
23. Fritzell B., Plotkin S. Efficacy and Safety of a *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine. *J. Pediatr.* 121. 355-362. (1992).
24. Shinefield H., Black S. Conjugate Hib vaccines and their combinations: present success and future possibilities. *Suppl. to JAMA SEA.* 20 - 31. (August 1993).
25. World Health Organization (WHO) Technical Report Series N° 800. Annex 2. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. (Requirements for Biological Substances N° 8 and 10).(1990).
26. Manual "LABORATORIO DE PRODUCCION Y CONTROL DE BIOLÓGICOS". Departamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México (1984).
27. Ellis R.W., Douglas G. Jr. New Vaccine Technologies. Special communication. *JAMA.* March 23/30. 271:12. 929-931. (1994).
28. Glück R. Combined Vaccines-The European Contribution. *Biologicals.* 22. 347-351. (1994)
29. Clemens J. D., Ferreccio C. Levine M., Horwitz I., Rao M., Edwards K. and Fritzell B. Impact of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-Tetanus Protein Conjugate Vaccine on

Responses to Concurrently Administered Diphtheria-Tetanus-Pertussis vaccine. JAMA. 267:5. 673 - 678. (1992).

30. Ferreccio C., Clemens J., Avendano A., Horwitz I., Flores C., Avila L., Cayazzo M., Fritzell B., Cadoz M. and Levine M. The clinical and immunologic response of Chilean infants to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine coadministered in the same syringe with diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine at two, four and six months of age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 10:764 - 761. (1991).
31. Miller M. A., Meschievitz C. K., Ballanco G. A. and Daum R. S. Safety and immunogenicity of PRP-T combined with DTP: Excretion of capsular polysaccharide and antibody response in the immediate post-vaccination period. *Pediatrics.* 95: 4. 522 - 527. (April 1995).
32. Scheifele D. W., Meekison W., Guasparini R., Roberts A., Barteto L., Thippawong J. and Wilstey S. Evaluation of booster doses of *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine in 18-month-old children. *Vaccine.* 13: 1. 104 - 11. (1995).
33. Begg N. T., Miller E., Fairley C. K., Chapel H. M., Griffiths H., Waight P. A. and Ashworth L. A. E. Antibody responses and symptoms after DTP and either tetanus or diphtheria *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines given for primary immunization by separated or mixed injection. *Vaccine.* 13: 16. 1547 - 1550. (1995).
34. Scheifelle D., Bjornson G., Barreto L., Meekison W. and Guasparini R. Controlled trial of *Haemophilus influenzae* type B diphtheria toxoid conjugate combined with diphtheria, tetanus and pertussis vaccines, in 18-month-old children including comparison of arm versus thigh injection. *Vaccine.* 10: 7. 455-460. (1992).
35. Ahonkhai M.EK., Greenwood VI., Jonas AM., Lukacs LC., Mink LJ., Staub CM., Tood JM., Vella J. and Greenwood PP. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type B-Neisseria meningitidis group B outer membrane protein complex conjugate vaccine mixed in the syringe with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in young Gambian infants. *Pediatric infectious diseases journal.* 12: 8. 632-637. (1993).
36. Temynck Th., Avrameas S. *Técnicas inmuno-enzimáticas.* Sociedad Francesa de Inmunología. Grupo Editorial Iberoamérica. México (1989).
37. Little L. E. Validation of Immunological and Biological Assays. *BioPharm.* November 36-42. (1995).
38. Xing Dorothy K.L., Mc Lellan K., Corbel M. J., Sesardic D. Estimation of Antigenic Tetanus Toxoid Extracted from Biodegradable Microspheres. *Biologicals.* 24, 57-66. (1996).
39. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. Sexta edición, México (1994).
40. Czajkowski T, Whatman Inc. Methods validation Guidelines. *CHROMCONNECTION.* 12-13. June (1996).
41. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS: Gerencia General de Biológicos y Reactivos. Secretaría de Salud. México (1995).