

69



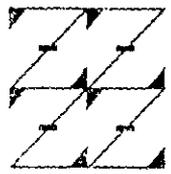
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

VALIDACION DE UN SISTEMA DE ANALISIS *IN VITRO* COMO TECNICA ALTERNATIVA DEL ENSAYO DE POTENCIA BIOLOGICA AL METODO *IN VIVO* PARA LA VACUNA ANTIHEPATITIS B RECOMBINANTE

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
MARIA DEL ROCIO TORREBLANCA BELTRAN
VIRGINIA PATRICIA MENDEZ SOSA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



NO OLVIDES
LA NUESTRA REFLEXION

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

MEXICO, D. F.

2001

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



AGRADECIMIENTOS:

A todos los que contribuyeron con su apoyo para la realización de este proyecto, al proporcionar su asesoría técnica, reactivos, muestras de vacuna y equipos:

**CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA- HABANA CUBA
LABORATORIOS FUSTERY S.A. DE C.V MÉXICO D.F.**

A quienes nos dieron su apoyo y confianza para realizar este proyecto y obtener así nuestro logro profesional:

Dr. CARLOS PÉREZ DE LA MORA

QFB. ARACELI CASTELLANOS VERA

QFB. PATRICIA VAZQUEZ LIMÓN

ING. ANTONIO DELGADO ALAM

En especial a quien nos proporciono sus conocimientos, experiencia y asesoría:

Dr. MARIO GONZÁLEZ PACHECO

A nuestro Asesor de Tesis y Sinodales por su paciencia, confianza y asesoría en el desarrollo y elaboración de este trabajo:

QFB. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ

QFB. YOLANDA FLORES CABRERA

QFB. FRANCISCO TOMÁS DELGADO CRUZ

QFB. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA

Dr. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

MARIA DEL ROCIO TORREBLANCA B.

VIRGINIA PATRICIA MENDEZ SOSA



DEDICACIÓN:

Quiero primeramente agradecer a DIOS por darme la oportunidad de vivir

A MIS PADRES:

Adolfina y Austreberto a quienes dedico este trabajo como un homenaje a todas sus enseñanzas, dedicación, amor y apoyo que siempre me han brindado.

A MIS HERMANOS:

Javier, Leticia y Gabriela a los cuales agradezco su apoyo incondicional.

A Ricardo por su apoyo en los momentos más difíciles y por su inmenso amor.

A LOS NIÑOS:

Eréndida, Abel, Rafael, Luis, Jesús, Karla y Claudia por su ternura, inocencia y cariño.

A todos y cada uno de mis amigos entrañables, por brindarme su amistad

A mis familiares con todo cariño por su estímulo.

EN MEMORIA DE MIS ABUELITOS:

Francisca, Josefina, Rafael.



DEDICACIÓN:

*A mis hijas Berenice, Guissel y mi futuro bebe
para que en lo futuro sea un signo de admiración
y estímulo a sus aspiraciones.*

*A mis padres con profundo agradecimiento por que
a ellos debo los éxitos que hasta hoy he logrado*

*A mi esposo a quien a pesar de las situaciones más
dificiles continua con su dedicación y apoyo hacia mí*

VIRGINIA PATRICIA MÉNDEZ SOSA



ÍNDICE

CONTENIDO	PÁG
INTRODUCCIÓN	1
FUNDAMENTO TEORICO	3
1 RECOMBINACIÓN GENERAL	3
1 1 RECOMBINACION DE SITIO ESPECÍFICO	5
2 CARACTERÍSTICAS DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL HOMBRE	5
I) ACCIDENTES BIOLÓGICOS	6
II) INFECCIONES ESPECÍFICAS DEL HOMBRE	6
III) ZONOSIS	6
IV) LA HEPATITIS	6
3 POSIBILIDADES DE INTERACCIÓN INFECCIÓN-ENFERMEDAD E INMUNIDAD	10
3 1 INFECCIÓN SIN ENFERMEDAD Y SIN INMUNIDAD	10
3 2 INFECCIÓN SIN ENFERMEDAD Y DESARROLLO DE INMUNIDAD	10
3 3 INFECCIÓN ENFERMEDAD E INMUNIDAD INSUFICIENTE	10
I) VARIACIÓN ANTIGÉNICA	11
II) INÓCULO MICROBIANO PATOGENICO PERO NO INMUNOGÉNICO	11
III) MULTIPLICIDAD ANTIGENICA	11
IV) RESPUESTA TARDÍA	11
V) SUERO MICROBIANO	12
VI) PARÁLISIS INMUNOGENICA	12
VII) DEFICIENCIAS NATURALES DE LA INMUNIDAD	12
4 FACTORES DETERMINANTES DE LA INMUNIDAD EN LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS	13
4 1 FACTORES CONSTITUTIVOS	13
4 1 1 POTENCIAL REDOX	14
4 1 2 INMUNIDAD NUTRICIONAL.	14
4 1 3 RECEPTORES DI MICROBIOS	15



4.1.4 ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD E INFECCIONES	15
4.2 FACTORES ADAPTATIVOS	15
4.2.1 ANTICUERPOS	15
4.2.2 INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS	16
4.2.3 REACCION INFLAMATORIA	17
4.2.4 SISTEMA DE COMPLEMENTO	17
5 LA ESTRATEGIA DE LA INMUNIZACIÓN TACTICA EN LAS VACUNACIONES	18
5.1 INMUNIZACION PASIVA	18
5.1.1 INMUNIDAD HUMORAL	19
5.1.2 INMUNIDAD CELULAR	19
6 CONSIDERACIONES TÁCTICAS EN EL DESARROLLO DE VACUNAS	19
6.1.1 INMUNÓGENOS PROTECTORES	19
6.1.2 INMUNOGENOS PUROS	20
6.1.3 EXTRACTOS MICROBIANOS INMUNOGÉNICOS	20
6.1.4 MICROBIOS INACTIVADOS	20
6.1.5 MICROBIOS ATENUADOS	20
7 EFICACIA PROFILACTICA	21
8 CARACTERISTICAS DE LOS VIRUS DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	23
9 HEPATITIS INFECCIOSA B	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
OBJETIVOS	29
HIPÓTESIS	30
DISEÑO DE INVESTIGACION	31
TIPO DE ESTUDIO	31
POBLACIÓN	31
CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION	31
VARIABLES DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES	32
MATERIALES, EQUIPO Y REACTIVOS	34



MÉTODO	35
DISEÑO ESTADÍSTICO	38
DIAGRAMA DE FLUJO MÉTODO IN VIVO	41
DIAGRAMA DE FLUJO MÉTODO IN VITRO	42
RESULTADOS	43
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56
ÍNDICE DE FIGURAS	
INDICE DE TABLAS	
ABREVIATURAS	



INTRODUCCIÓN

La vacuna contra la hepatitis B es un producto biológico de tipo recombinante y una de sus especificaciones más importante a evaluar es su inmunogenicidad, la cual es verificada por un ensayo *in vivo* al determinar la potencia relativa en ratones

En la titulación de sustancias biológicas se establece que se realice un ensayo de líneas paralelas cuando se aplica este tipo de ensayo, la potencia de la sustancia se obtiene comparando las curvas dosis contra respuesta del estándar de referencia y de la muestra en estudio, para que este cálculo se cumpla es indispensable que el estándar de referencia y la muestra en estudio se comporten como si uno fuese dilución del otro. El cumplimiento de esto es evaluado en cada ensayo mediante una prueba de paralelismo

Para aprobar y liberar éste tipo de productos cumpliendo con sus requerimientos de calidad, nos lleva a un tiempo de análisis muy largo lo que reduce el tiempo de disponibilidad en el mercado ya que el tiempo de caducidad de la vacuna comienza desde la fecha de inoculación del lote de vacuna en la fase de proceso para evaluar como método *in vivo* la inducción de anticuerpos en ratones, y que en ocasiones este tiempo oscila entre 4 a 5 meses antes de salir al mercado como producto final envasado

Como las pruebas de potencia *in vivo* son de larga duración y se realiza en ratones, motivo por el cual se requiere de instalaciones especiales y condiciones controladas, por lo que los costos se incrementan y los resultados requieren de mayor tiempo. Por estos motivos se han buscado métodos alternos *in vitro* más rápidos, de menor costo y que, además son de menor variabilidad que los ensayos *in vivo*

En este trabajo se implemento un método *in vitro* en el que se emplea un reactivo de diagnóstico que nos permitió identificar primeramente el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B



(HBsAg) y posteriormente cuantificar las cantidades del mismo en diferentes diluciones de la vacuna contra la hepatitis B recombinante de origen Cubano, en comparación a la vacuna de referencia certificada frente a un estándar primario internacional adoptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Se estableció una curva dosis respuesta de la que se efectuó una transformación lineal hasta obtener un comportamiento paralelo en las respuestas de la muestra en estudio en comparación con la vacuna de referencia

Se establecieron los parámetros a determinar para validar el método de análisis y las condiciones del mismo, se realizaron estudios de comparación de la potencia relativa de la vacuna tanto por el método *in vivo* contra el método *in vitro*

Todo lo anterior con la finalidad de determinar que el método *in vitro* adoptado nos beneficia directamente en reducir el tiempo de liberación de la vacuna permitiendo la disponibilidad en el mercado para su uso cumpliendo estrictamente con sus especificaciones



FUNDAMENTO TEÓRICO

1 RECOMBINACION GENERAL ¹

La recombinación de genes mutantes para producir nuevas asociaciones de genes en la progenie de las moléculas del DNA es un factor extremadamente importante en la evolución. Los mecanismos que aseguran que ocurra la recombinación han sido de gran valor selectivo y específicos. Estos mecanismos se pueden dividir en dos categorías: Recombinación general u homóloga y recombinación en un lugar específico.

La recombinación general, ocurre entre las moléculas homólogas de DNA o cromátidas homólogas en la meiosis, tiene gran precisión lo que indica que entre los homólogos debe ocurrir un apareamiento preciso. Sólo rara vez surgen mutaciones debidas a un apareamiento erróneo anterior al suceso de recombinación. La precisión del apareamiento entre las moléculas de DNA progenitoras homólogas está medida por el apareamiento de las bases entre secuencias de pares nucleótidos complementarios de las dos moléculas progenitoras durante el proceso de recombinación. La formación de moléculas de DNA recombinante a partir de dos moléculas progenitoras de DNA se esquematiza en la figura No 1, primero se tiene lugar a un intercambio de filamentos sencillos entre moléculas de DNA progenitor, que da como resultado una estructura de puente cruzado que implica las regiones del DNA heterodúplex de cada molécula de doble filamento. Las regiones de DNA heterodúplex mostradas son responsables del alineamiento preciso, entre las moléculas homólogas de DNA progenitor tipos para restablecer dos moléculas de DNA lineales que son recombinantes para marcadores genéticos progenitores situados a cada lado de la región del DNA heterodúplex. El otro tipo de corte produce moléculas lineales que no son recombinantes para marcadores genéticos progenitores que flanquean la posición del puente cruzado pero que contienen una región de DNA heterodúplex.

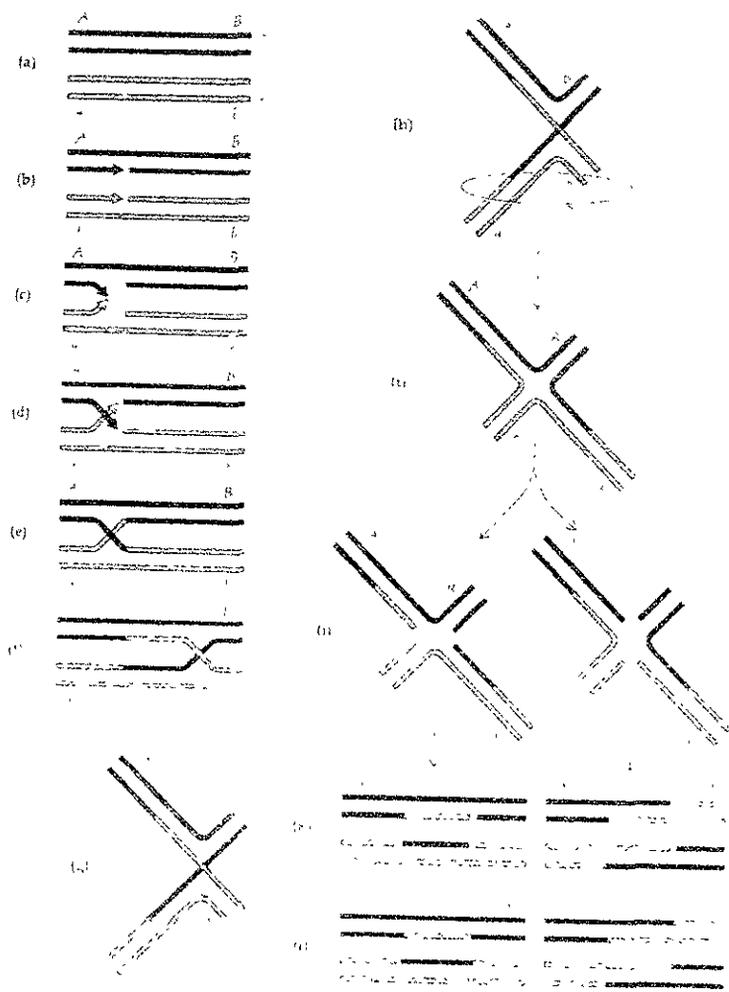


Fig. No. 1 Modelo de Holliday ¹ apareamiento entre dos moléculas progenitoras de DNA (a), (b) para la recombinación (h), el puente cruzado puede romperse en dos formas una origina la recombinación de marcadores que flanquean la región de DNA heteroduplex y la otra no (f)



1.1 RECOMBINACIÓN DE SITIO ESPECÍFICO.

Como lo indica su nombre, la segunda categoría de los sucesos de recombinación comprende a los que acontecen sólo en sitios o puntos específicos de una molécula de DNA. Esto contrasta con los sucesos de recombinación general, en los que se forma DNA heterodúplex y el sitio del entrecruzamiento puede presentarse en el empalme entre dos pares cualquiera de nucleótidos adyacentes. En mutantes *recA*, *recB* y *recC* de *E. coli* que tienen defectuosa la recombinación general, la recombinación de punto o de sitio específico no se ve afectada, demostrando así que las dos categorías de sucesos de recombinación son funcionalmente diferentes.

La integración de fago lambda en el cromosoma de *E. coli* es el caso de recombinación de sitio específico estudiado con más intensidad. Lambda se inserta en el cromosoma bacteriano por recombinación entre un sitio *attB*, del cromosoma huésped y un sitio *attP*, del cromosoma fago. Cada uno de los dos cromosomas contiene un solo sitio *attP*. Lambda es un miembro de fagos atenuados llamados fagos lamboides. La recombinación entre los sitios *attP* y *attB* requiere una proteína codificada por el gen *int* (integrasa). La especificidad del sitio de reconocimiento reside en la capacidad de la proteína *int* para reconocer su propio sitio de acción tanto en el cromosoma del fago como en el de la bacteria. Cada especie de fago lambda posee su propia enzima de integración.

2 CARACTERÍSTICAS DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL HOMBRE ¹

Las infecciones del hombre pueden dividirse en tres grandes grupos atendiendo al origen de los microorganismos causales, a la severidad de las manifestaciones clínicas y al significado biológico de la interacción huésped-microorganismo.



I) Accidentes biológicos en infecciones como el tétanos, la gangrena gaseosa, el botulismo, el ántrax y las infecciones oportunistas, se trata de accidentes ocasionales sin ningún sentido biológico de supervivencia, nunca se asocian con carácter epidémico

II) Infecciones específicas del hombre

Enfermedades como la fiebre tifoidea, la tosferina, la lepra, el sarampión, la varicela, rubéola y la parotiditis, son producidas por microorganismos adaptados muy selectivamente a la especie humana, según factores ambientales y condiciones de vida, se tiene un estado de endemicidad o el de endemia epidemia. No hay reservorios animales.

III) Zoonosis

La flora microbiana de los animales que tienen relación cercana con el hombre, los animales domesticados los que sirven como fuente de alimento y aquellos con relación ocasional (cacería, encuentro fortuito, o parasitosis) son el origen de infecciones comunes a esas especies animales y al hombre cazador - recolector primero y agricultor - pastor después.

La salmonelosis, brucelosis, tuberculosis, peste, toxoplasmosis, influenza, rabia, fiebre amarilla, son enfermedades del hombre debido a la cercanía con los animales (huéspedes naturales), condición creada por el proceso civilizador del hombre. En algunos casos, el hombre ha introducido una relación permanente al fungir como huésped intermediario o reservorio, en la mayoría de los casos el animal es el huésped intermediario y el hombre resulta el hospedero definitivo. La zoonosis tiene carácter endémico con brotes epidémicos cuando el consumo de alimentos y animales está contaminado. El ciclo de transmisión puede interrumpirse por el saneamiento ambiental, la inmunización, la cuarentena o la muerte de los animales como fuente de contagio.

IV) La Hepatitis

Son cuatro virus los que causan la hepatitis, todos difieren en cuanto a su estructura, modo de replicación, curso de la enfermedad y vía de transmisión. Los virus de la hepatitis A y B son los



más conocidos, pero recientemente se ha descrito la existencia de un virus no-A y no-B (o C), así como un virus de la hepatitis D o agente delta.

Los síntomas de la hepatitis causada por todos estos agentes guarda cierta semejanza y todos se distinguen bastante bien desde el punto de vista clínico.

La hepatitis A está provocada por un picornavirus portador de ácido ribonucleico (ARN) y recibe el nombre de "hepatitis infecciosa" su vía de transmisión es la fecal, oral y su período de incubación es de aproximadamente 1 mes, puede presentarse de forma fulminante y seguir su curso mortal y no se perpetúa en forma de enfermedad hepática crónica.

La hepatitis B, conocida en el pasado como hepatitis sérica producida por un virus portador ácido desoxirribonucleico (ADN), se disemina por vía parenteral, mediante la sangre o agujas contaminadas, por la vía sexual o por vía transplacentana, el virus suele adquirirse por inoculación directa al torrente circulatorio. El virus debe alcanzar el hígado para que se produzca la infección. Más adelante, el virus se replica y se liberan a la sangre grandes cantidades de antígeno junto a los viriones. La replicación viral puede iniciarse tres días después del contagio, pero los síntomas no se observan a veces hasta 45 días después, o incluso más dependiendo de la dosis inoculada, la vía de infección y los rasgos diferenciales de cada individuo.

Se estima que en los Estados Unidos se producen unos 300,000 infectados por el virus y en los países subdesarrollados se infectan hasta un 15 % de la población durante el nacimiento o la niñez. Es probable que el número anual de afectados por hepatitis A sea muy semejante, pero los casos mortales son raros.

En el caso de la hepatitis B, como en el caso de las demás hepatitis, no se conocen reservorios en animales inferiores los seres humanos constituyen el reservorio y el vector. El virus se disemina directamente de persona a persona, sobretodo a través de los portadores crónicos. Se definen como portadores crónicos aquellos individuos en los que se detecta el antígeno en dos determinaciones distintas separadas por un período de 6 meses.



Aproximadamente el 6 % de los varones homosexuales y un porcentaje mayor de drogadictos son portadores crónicos¹, la situación del portador puede prolongarse toda la vida, las rutas de diseminación son percutánea (jeringas contaminadas, acupuntura, tatuajes, perforación de lóbulos de las orejas) o el contacto personal íntimo con intercambio de secreciones (parto o sexual.)

Los síndromes clínicos que presentan son, la infección aguda aparece en el 25 % de los infectados por el virus, se caracteriza por un periodo de incubación y un comienzo insidioso. Entre los síntomas del periodo se encuentran la fiebre, el malestar y la anorexia, seguidos de náuseas, vómitos, malestar abdominal y escalofríos. A continuación se presentan los síntomas clásicos que indican daño hepático (ictericia, coluria y acolia.) La infección crónica se observa en el 5-10 % de las infecciones por el virus ésta se detecta por la presencia de niveles elevados de enzimas hepáticas en análisis de sangre rutinario, pero evoluciona hacia cirrosis e insuficiencia hepática hasta un 10 % de los casos.

Carcinoma hepatocelular primario (La Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de todos los casos de éste carcinoma podrían atribuirse a infecciones por el virus de la hepatitis B)

El carcinoma es habitualmente mortal y constituye una de las principales tres causas de muerte por cáncer en todo el mundo, el periodo de latencia entre la infección por el virus de hepatitis B y el Carcinoma hepatocelular puede oscilar entre 9 y 35 años

El diagnóstico de laboratorio inicial de hepatitis se realiza por los síntomas clínicos y la presencia de enzimas hepáticos en sangre. No obstante, para la identificación del virus se requiere de la determinación del antígeno y la evaluación de la respuesta humoral.

La profilaxis que se tiene hasta hoy existen dos vacunas contra el virus, una derivada de plasma humano y otra obtenida por ingeniería genética. La primera es una suspensión de partículas del antígeno de superficie de 22 nm, absorbidas en gel de hidróxido de aluminio, la vacuna recombinante se fabrica insertando un *cerevisiae* plásmido que contienen el gen que codifica el antígeno en una levadura, *Saccharomyces*



El antígeno se recoge luego, lisando las células de la levadura y utilizando cromatografía. El antígeno purificado se esteriliza por filtración, se coloca en formalina, se adsorbe en hidróxido de aluminio y se preserva en tiomersal.

Las hepatitis no-A y no-B se parecen a las hepatitis B en cuanto a que sus vías de transmisión coinciden, aunque se estime que pueden llegar a crónificarse en un 10-50 % de los casos, estas hepatitis tienen un periodo de incubación más corto.

La hepatitis delta, muestra como particularidad que solo se observa en pacientes con infección activa por el virus B, el virus de la hepatitis D se replica únicamente en presencia del virus B activo, el agente delta provoca hepatitis agudas y crónicas.

En el cuadro siguiente se indican los casos acumulados por entidad federativa proporcionados por la Dirección General de Epidemiología en lo que va de la última semana del mes de mayo del año 2000.

Entidad	Casos		Entidad	Casos		Entidad	Casos	
	1999	2000		1999	2000		1999	2000
Ags	1	2	Mich	8	3	Hlx.	1	1
B C	7	9	Mora	1	-	Ver.	23	11
B C S	1	-	Nay	3	2	Yuc	20	12
Camp	1	2	N L	13	13	Zac	6	2
Coah	-	6	Oax	14	1			
Col	-	-	Puc	7	20			
Chis	5	7	Qro	5	2			
Chih.	7	4	Q Roo	3	0			
D F	31	10	S L.P	7	2			
Dgo	-	1	Sin	14	13			
Hgo	3	3	Son	28	11			
Jal	27	5	Tab	1	1			
Méx	36	25	Tamps	5	16			
Total		298 Casos en 1999 y 198 Casos en 2000						

Tabla No. 1 Casos acumulados por entidad federativa durante la semana 19 del año 2000



3 POSIBILIDADES DE INTERACCIÓN INFECCIÓN - ENFERMEDAD E INMUNIDAD ²

Los microorganismos pueden adoptar situaciones que van desde la contaminación transitoria a la infección agresiva, la expresión clínica puede ir desde la infección inaparente hasta la muerte y las condiciones inmunológicas pueden ir desde la susceptibilidad hasta el estado refractario pasando por la inmunidad parcial, los síntomas precursores de la enfermedad (inmunidad con persistencia del microorganismo) o la inmunidad no vigente por variación antigénica del microorganismo agresor.

3 1 Infección sin enfermedad y sin inmunidad

Algunos dermatofitos y estafilococos *Staphylococcus epidermidis* colonizan la piel y la rinofaringe sin causar enfermedad y sin desarrollo de anticuerpos o indicios de inmunidad mediada por células.

3 2 Infección sin enfermedad y desarrollo de inmunidad

En muchas infecciones la agresión microbiana no alcanza el umbral clínico y sólo a través de exámenes de laboratorio es posible demostrar anomalías, por ejemplo aumento en las transaminasas séricas durante una hepatitis anictérica, la proteína C reactiva en una estreptococcica o el aumento en la velocidad de sedimentación globular consecutiva a una infección tuberculosa

La serología puede revelar el origen y seguir la evolución de esa experiencia inmunogénica a través de la aparición de anticuerpos en la fracción de IgM que señala el origen de la infección, algunos ejemplos son la mononucleosis infecciosa, las infecciones por virus de inclusión citomegálica, la hepatitis infecciosa tipo A y el herpes

3 3 Infección enfermedad e inmunidad insuficiente

En estas infecciones encontramos diferentes situaciones tales como



I) Variación antigénica

Donde la respuesta inmunitaria controla la agresión microbiana al tiempo que induce la aparición de nuevos antígenos que toman inoperante la inmunidad conferida por los primeros anticuerpos y precisa de iniciar nuevamente otra respuesta inmunológica ante los nuevos determinantes antigénicos, producto de la variación antigénica; por ejemplo en la fiebre recurrente (*Borrelia sp*) y en las tripanosomiasis africanas (*Trypanosoma gambiense* y *rhodesiense*)

II) Inoculo microbiano patogénico pero no inmunogénico

Como en el tétanos, la dosis letal es menor que la dosis inmunizante, por tanto si un enfermo de tétanos logra recuperarse, no queda inmune y esta expuesto a sufrir un nuevo episodio de tétanos.

Un recién nacido que sobrevive el cuadro de tétanos neonatorum debe ser inmunizado como cualquier niño normal

III) Multiplicidad antigénica

En los estreptococos existen más de 50 serotipos de proteína M, circunstancias que permiten la multiplicidad de ataques ya que los anticuerpos generadores ante una infección precedente no son garantía de inmunidad para las agresiones de las otras variedades antigénicas, y a la práctica de las inmunizaciones precisa de mezclas con los serotipos de mayor prevalencia en ese medio ambiente. Entre los virus, rinovirus con más de 100 variedades, los virus de la poliomielitis (tres), la hepatitis infecciosa (virus A y B), los adenovirus, los virus ECHO y los Cocksacke son ejemplos de multiplicidad sin Inmunogenicidad cruzada completa que condicionan la repetición de ataques con cuadro clínico muy semejante o idéntico.

IV) Respuesta tardía

Como el caso de la rabia hay respuesta de anticuerpos a títulos muy elevados tanto en sangre como en el líquido cefalorraquídeo, sin embargo tal actividad aparece cuando la encefalitis está establecida y las lesiones son mortales irreversiblemente. Sikes y colaboradores² consideran



que parte del cuadro patológico terminal pueda estar mediado por la acción citopatogénica de los anticuerpos (choque por anticuerpos)

V) Secuestro microbiano

La presencia de virus del sarampión en la parencefalitis subaguda esclerosante, en presencia de títulos muy elevados de anticuerpos contra el sarampión tanto en suero como en líquido cefaloraquídeo y la demostración *in situ* de anticuerpos específicos de sarampión en el sistema nervioso, se trata de explicar mediante una deficiencia en los sistemas de inmunidad mediados por células (tal vez linfocitos reguladores) que no regulan adecuadamente la producción de anticuerpos y el exceso trae como consecuencia efectos citopatogénicos en el sistema nervioso central.

VI) Parálisis inmunológica

Como en las neumonías lobulares agudas, se considera que el riesgo mayor que tienen los convalecientes de volver a padecer un segundo ataque de neumonía obedece al estado de parálisis inmunológica desarrollado por la gran cantidad de antígenos capsulares de neumococos que no son metabolizados activamente y condicionan un estado específico de falta de respuesta de anticuerpos ante ese antígeno

VII) Deficiencias naturales de la inmunidad

Las infecciones que producen patología por lesión de mucosas, infecciones de la vía urinaria, la gonorrea, caries dental, tienen su origen en la imposibilidad de impedir la adherencia de las bacterias patógenas en las estructuras blanco Hay una respuesta insuficiente e inmunidad secretoria (IgA's) que no basta para interferir con la operación inicial de la que depende la patogenicidad o bien, como *N. gonorrhoeae* se tienen enzimas que degradan la molécula de (IgA's) y la inactivan



4 FACTORES DETERMINANTES DE LA INMUNIDAD EN LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La competencia inmunológica en las infecciones es conjunto de acciones capaces de inmovilización por parte del individuo infectado para controlar esa agresión y a través de la interacción con los microbios alcanzar un estado refractario más o menos permanente ante nuevas exposiciones. Las acciones abarcan una serie muy diversa de factores, clásicamente se habla de constitutivos y adaptativos.

4.1 Factores constitutivos

Comprende a todo lo relacionado con inmunidad específica o inespecífica que es natural a esa especie animal sin que para su operación se requiera de ningún estímulo y cuyo nivel de acción no se modifica por la presencia de microorganismos.

La integridad de la piel es un factor inmunitario constitutivo suficiente para impedir que el virus de la rabia, depositado sobre una piel íntegra no produzca daño.

Cuando hay desvitalización en la piel, destrucción o manchamientos, circulación deficiente o quemaduras, se tienen las condiciones ideales para la infección por gérmenes oportunistas.

La actividad metabólica de la flora residente en la piel y en la vagina resulta en un pH ácido, alrededor de 5.0 producto de ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta y metabolitos ácidos, incompatible con el desarrollo de bacterias como estreptococos y estafilococos.

En el tubo digestivo, la presencia de ácido clorhídrico a concentraciones que dan un $\text{pH}=2-3^2$ resulta suficiente para inactivar la mayoría de los microbios bacterianos de los alimentos.

El movimiento peristáltico del sistema biliar extrahepático y de la vía genitourinaria y la actividad ciliar del árbol respiratorio, producen arrastre mecánico del contenido y eliminan



grandes cantidades de bacterias patógenas y no patógenas de cuya eficiencia depende la ausencia de infección y/o enfermedad en muchos casos

La temperatura corporal es un factor inmunitario constitutivo que impide la invasión a la sangre de bacterias como *Mycobacterium balnei* y *Mycobacterium ulcerans* cuya temperatura de crecimiento óptimo es a 33°C y no resisten a la temperatura corporal de 36.8°C. La reducción de la temperatura corporal se asocia con menos producción de interferón y títulos menores de anticuerpos y la acción de células fagocíticas con resultados negativos en la competencia inmunológica.

4.1.1 Potencial redox

La PO_2 de la sangre y de los tejidos es incompatible con la reproducción de bacterias anaerobias, sólo en el intestino se dan las condiciones favorables para el crecimiento bacteriano anaerobio y en ese hábitat la proporción de flora anaerobia/aerobia es de 100 - 1000/1. Cuando ocurren trastornos circulatorios que llevan a la hipoxia o se producen abscesos que necrosan el parénquima y erigen barreras de permeabilidad, se tienen condiciones adecuadas para el crecimiento de bacterias anaerobias.

4.1.2 Inmunidad nutricional ²

La necesidad universal de oligoelementos, en especial Fe^{++} es un factor constitutivo que facilita o impide el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas, el humano dispone de mecanismos de transporte del hierro desde el sitio de absorción y depósito a los de utilización, mediante una proteína (la transferrina), con gran afinidad por el catión. La capacidad de transporte y de unión o enlace es limitada.

En los casos de hemólisis, necrosis de células ricas en citocromos o deficiencia en el manejo del hierro, se propician condiciones por salmonelas y otras bacterias gramnegativas que no hubieran ocurrido en situaciones normales de metabolismo de hierro.



La disminución en la absorción del hierro consecutiva a la fiebre y la disminución en la transferrina durante el periodo neonatal lustran fenómenos de adaptación o inmadurez al nivel de mecanismos inespecíficos de la inmunidad constitutiva

4.1.3 Receptores de microorganismos

En la membrana de las células existen receptores específicos para los virus citopatógenicos, la presencia o ausencia de ellos es determinante para decidir la inocuidad o patogenicidad de un virus. su naturaleza está en estudio pero se conoce que su presencia está determinada genéticamente.

4.1.4 Antígenos de histocompatibilidad e infecciones

La posible relación entre los antígenos de histocompatibilidad presentes en los linfocitos (HLA) y las enfermedades (entre otras infecciones) es motivo de encuestas en todo el mundo, en el caso de las infecciones por *Haemophilus influenzae* llama la atención que en unos casos la agresión se limite a la epiglotis y en otros pueda llegarse a la localización meníngea. La presencia de los HLA en las membranas de las células se presta para invocar relaciones de facilitación o impedimento en las infecciones por virus, así los anticuerpos contra HLA - A2 y HLA - A7 pueden bloquear la fijación de algunos mixovirus pero no la de poliovirus

4.2 FACTORES ADAPTATIVOS ²

4.2.1 Anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son vectores de reconocimiento específico para moléculas, partículas o células (bacterias, virus, hongos, protozoarios y metozoarios) asociados con agresiones invasoras de esos microorganismos o parásitos. Se han reconocido hasta ahora cinco clases: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.



Algunos de los efectos, asociados con las interacciones huésped parásito son

- a) Neutralización de toxinas y virus
- b) Aglutinación de bacterias y células
- c) Oponización de microorganismos
- d) Citólisis mediante interacción con el sistema del complemento
- e) Citopatogenicidad asociación con linfocitos K
- f) Impedimento en la adhesividad de las bacterias, a través de IgA's

La asociación de los anticuerpos es variable según se trate de una respuesta primaria o secundaria, según la edad del individuo, la naturaleza y la dosis del estímulo antigénico, según la vía de administración, así como según la clase de Ig involucrada o generada. Los anticuerpos se encuentran en la superficie de las mucosas (IgA e IgE), en el líquido intersticial (IgG) o en el espacio intravascular (las cinco clases) su vida varía desde 2 - 3 días (IgE), hasta tres semanas (IgG.)

No hay límite para el número de estímulos antigénicos eficientes secuenciales o simultáneos y salvo las seis primeras semanas de vida y la declinación gradual después de los 45 - 50 años, la capacidad de producir anticuerpos es una propiedad permanente de todos los humanos

4.2.2 Inmunidad mediada por células (alergia microbiana)³

Un grupo de linfocitos denominados "CD" 8 derivados del timo son responsables de reacciones inmunitarias tales como alergia microbiana, reacciones de autoinmunidad, regulación de la formación de anticuerpos

Los efectos de los linfocitos T son mediados por factores solubles linfocinas secretados o liberados al medio cuyas acciones tienen relación con la reacción inflamatoria, la inactivación de los virus (interferón) o a través de efectos citotóxicos directos o mediados por anticuerpos dirigidos contra la célula blanco para cuyo fragmento Fc existen receptores en el linfocito K



4.2.3 Reacción inflamatoria ²

Las células con propiedades fagocíticas pueden localizarse en los tejidos (fijos o móviles) o en los fluidos circulantes (sangre, linfa y líquido intersticial) y sus acciones combinadas con aumento del gasto circulatorio, el incremento en la permeabilidad capilar, la salida de proteínas plasmáticas del espacio vascular y los movimientos de las células fagocíticas en respuesta a estímulos quimiotácticos constituyen la llamada reacción inflamatoria, o sea que primero es la localización de microbios agresores y después la inactivación de organismos agresores. Las linfocinas de los linfocitos T favorecen la permanencia de los macrófagos.

4.2.4 Sistema del complemento

Un conjunto de 24 componentes que incluyen inactivadores y otros 5 componentes del sistema alterno constituyen el sistema del complemento cuyos efectos comprenden, la lesión irreversible de las membranas de células procariotes y eucariotes, la amplificación de la reacción inflamatoria, la inactivación de virus y una relación muy cercana con los sistemas de coagulación, la respuesta inflamatoria y la fibrinólisis

Existen otros factores tales como las betalinas que inactivan a bacilos grampositivos, el factor desintoxicante de las endotoxinas, factores antivirales (no anticuerpos), los interferones, el factor de transferencia y otros cuya participación en los mecanismos defensivos es indudable, pero la magnitud de su adaptación no ha sido establecida satisfactoriamente

Los anticuerpos naturales son producto de experiencias antigénicas con determinantes comunes al microorganismo cuya especificidad se estudia y otros no relacionados taxonómicamente pero que comparten ciertos determinantes antigénicos casi siempre inmunodominantes.

El conocimiento de sustancias coadyuvantes inmunológicas nos han permitido manipular la respuesta adaptativa específica mediante compuestos o microorganismos inespecíficos que producen respuestas de anticuerpos o mediadas por linfocitos T más intensas, más prolongadas y más rápidas que cuando se utilizan solos



5. LA ESTRATEGIA DE LA INMUNIZACIÓN, LA TÁCTICA EN LAS VACUNACIONES.³

La inmunización conlleva el propósito de proveer de inmunidad eficiente a un individuo carente y necesitado de tal protección ante una o múltiples agresiones microbianas.

En las enfermedades infecciosas, el estado de inmunidad es la condición resultante de factores específicos e inespecíficos relacionados con la interferencia, neutralización, inactivación o destrucción de bacterias, virus protozoarios y hongos presuntamente patógenos, invasores o comensales.

La inmunización comprende todas las operaciones que aportan elementos defensivos o coadyuvantes en el proceso de establecer un estado refractario a la implantación, colonización, replicación, invasión, o lesión orgánica por parte de cualquier microorganismo

5.1 Inmunización Pasiva

La condición de inmunidad activa (endógena) implica un tiempo mínimo que en muchos casos no se dispone y los efectos patogénicos del microorganismo deben ser neutralizados a la brevedad posible o se trata de un individuo inmunodeficiente primario o secundario que no tiene competencia inmunológica para responder a las estimulaciones inmunogénicas eficientes en una persona con excelente estado inmunológico

En tales condiciones se recurre a la inmunización pasiva homóloga y heteróloga que puede consistir en factores humorales celulares o ambos. Los trasplantes de médula ósea, de timo o de hígado fetales son una variante de inmunidad pasiva que resuelve de manera permanente la limitación de la duración transitoria de las otras clases de inmunización pasiva



5.2 Inmunidad humoral

Los factores inmunitarios presentes en el plasma pueden ser inmunoglobulinas (anticuerpos), complemento (componentes e inhibidores), hormonas tóxicas: transferrina, interferón, betalinas, inmunoglobulinas, factores desintoxicantes de endotoxinas, factores antivirales (no interferón), lisozima entre los más importantes y mejor caracterizados

Con mucho la inmunización pasiva más frecuentemente empleada es la de las inmunoglobulinas, las posibilidades son: gamma globulina ordinaria obtenida de suero o de placentas, consiste en más de 95% (mínimo) de IgG, con menos del 1% de otras proteínas como albúmina, transferrina, IgM o IgA.

Las globulinas gamma hiperinmunes de origen humano disponibles en la clínica son. antitetánica, antiparotiditis, antirrábica, antirubéola, antipoliavirus, antisarampión, antihepatitis B y anti - pseudomona aeruginosa

5.3 Inmunidad celular

Los progresos en la tecnología de separación de células de la sangre han permitido obtener neutrófilos en cantidades suficientes para aliviar las neutropenias severas que se registran en leucemias y aplasias de médula ósea

6. CONSIDERACIONES TÁCTICAS EN EL DESARROLLO DE LAS VACUNAS ²

6.1 Inmunógenos protectores

La tarea de conocer y aislar los antígenos inmunogénicos responsables de la patología asociada con una enfermedad infecciosa es la primera y más importante tarea en la secuencia que conduce a la producción de una vacuna

El desideratum consiste en aislar un compuesto puro, inmunogénico, no tóxico susceptible de desintoxicación y que intervenga como factor clave en el desarrollo de la enfermedad



6 1 2 Inmunógenos puros

Dentro de esta categoría se cuenta a los toxoides de *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y de *Micrococcus pyogenes* variante *Staphylococcus aureus* los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, de *Neisseria meningitidis* y de *Haemophilus influenzae*.

6 1.3 Extractos microbianos inmunogénicos

El desconocimiento del inmunógeno protector o la participación de varios, son causa que en algunas vacunas se utilicen extractos microbianos que contienen muchos antígenos dentro de los cuales se encuentra el importante para conferir protección, v. gr: *Bordetella pertussis*, ejemplo de extracto bacteriano que han sido sujetos a procesos químicos o fisicoquímicos con objeto de purificar el material original, al tiempo que conservan las propiedades inmunogénicas útiles con la menor cantidad posible de sustancias no importantes en la inmunización.

6 1 4 Microorganismos inactivados ²

Las primeras vacunas y todavía muchas de las actuales, consisten en el microorganismo entero o inactivado de diversa manera (calor, fenol, formol, beta-propiolactona, luz ultravioleta, alcohol acetona, etc) Se decide por emplear el microorganismo entero, pero en el caso de algunos virus, tales como el virus de la rabia o bacterias como *Vibrio cholerae* no podrían utilizarse en estado activo Entre los virus se encuentran a los de la rabia, de la influenza A y B, de la hepatitis B, de la poliomeilitis (vacuna Salk), de la encefalitis equina por virus de Venezuela y de la parotiditis.

6 1 5 Microorganismos Atenuados ²

El modelo pasteuriano de la rabia fue imitado en el caso de *Mycobacterium bovis* y se obtuvo el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), sin embargo, las posibilidades de atenuación estaban sobre una base poco predecible y fue hasta el advenimiento de la genética microbiana que se amplió y diversificó la tecnología que manipula las recomendaciones microbianas que se conocen como



I) Conjugación. apareamiento sexual de dos bacterias que resulta de la modificación del genoma bacteriano de la bacteria receptora o hembra mediante introducción de un trozo de DNA de la bacteria donadora o macho, en forma de cromosoma bacteriano o de un plásmido

II) Transducción infección de una bacteria por un fago (bacteriófago) que introduce al cromosoma bacteriano información con el resultado de una neoexpresión antigénica o de la capacidad de producir productos nuevos, es el resultado de la infección lisogénica (no - lítica) de un bacteriofago, específico para ciertas clases de bacterias que expresan una nueva información ya sea suprimiendo genéticamente o por la incorporación del DNA fágico

III) Transformación consiste en la adición del DNA de una bacteria que es capaz de introducir nuevas propiedades en la bacteria receptora, inclusive el cambio de serotipo

IV) Mutación consiste en la alteración ya sea cambio o desaparición de una base púrica o pirimídica en la doble hélice del DNA, se trata de un evento al azar, casi siempre nocivo para la célula y que por selección de las mutantes es la base de la evolución

Entre los virus atenuados se cuenta con la mayoría de las vacunas virales que han resuelto numerosos problemas de salud pública, tales como. la poliomielitis, el sarampión, la fiebre amarilla, la parotiditis, probablemente la rubéola, la varicela y es de esperarse que las bronquitis por el virus sincicial respiratorio, y las hepatitis tengan su solución en virus atenuados

7 EFICACIA PROFILÁCTICA DE UNA VACUNA⁴

La vacuna debe ofrecer ventajas con relación a la enfermedad que trata de modificar o de evitar, se distinguen los siguientes niveles de protección

1 Evitar la infección y la enfermedad

Tal es el caso de condiciones como la rabia, la rubéola en las embarazadas y la tosferina en los lactantes

2 Impedir la enfermedad clínica sin evitar la infección



En la hepatitis infecciosa por virus A, en la poliomielitis, en la influenza y en la rubéola de los niños, es aceptable que pueda ocurrir la infección sin las manifestaciones del cuadro clínico ordinario

3 Disminuir la gravedad del cuadro clínico

Hay vacunas que no logran evitar la infección y en ocasiones tampoco la enfermedad. Tal es el caso de la difteria donde la vacunación cuando no llega a impedir la enfermedad, ésta es menos grave, las miocarditis y parálisis de nervios craneanos son menos frecuentes y la mortalidad es más reducida que en los no vacunados

Se tienen situaciones similares en el tétanos, la tosferina y la influenza en cuyos casos la inmunización no vigente o incompleta aporta elementos de producción contra cursos severos o letales.

4 Abatir la frecuencia de complicaciones graves

En el caso de la tuberculosis, la vacuna BCG no sólo disminuye la tasa de ataque de la enfermedad, si no que evita la aparición de meningitis y de formas similares lo que implica una disminución de la tuberculosis pulmonar. En el sarampión la frecuencia de encefalitis es de 1 en 1000 casos en tanto que los vacunados con virus atenuados en la infección - enfermedad producida por la vacuna hay un caso por cada 1,000,000 de dosis aplicadas

5 Aminorar las oportunidades de contagio a los contactos

Un objetivo importante es la menor oportunidad de contagio para los contactos, caso para prevenir la rubéola, el objetivo primordial es disminuir la circulación del virus de la rubéola entre la población de 1-12 años con objeto de que las mujeres en edad fértil tengan menos posibilidades de contagio

En el caso de la influenza la reducción en la cantidad de virus eliminado por las secreciones nasofaríngeas es la clave para reducir las oportunidades de contagio²



8 CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ⁵

Los virus son entidades cuyo genoma es ácido nucleico, ADN o ARN que se produce dentro de las células vivientes y que utilizan la maquinaria de síntesis celular para dirigir partículas especializadas.

Los aspectos distintivos de los virus con respecto a otros organismos, radican fundamentalmente en su organización, composición y en mecanismos de replicación incluyendo a Las partículas víricas o viriones los cuales contienen solamente un tipo de ácido nucleico que puede ser ADN o ARN.

Las proteínas específicas de los virus se sintetizan utilizando los ribosomas del huésped, los virus se multiplican por síntesis independiente de sus partes constituyentes (proteínas, ácidos nucleicos, etc) que son posteriormente reunidos para dar lugar a la formación de nuevas partículas víricas. Los virus están constituidos esencialmente por ácido nucleico (el genoma viral) rodeado por una envoltura proteica llamada cápside, cuya función es proteger al ácido nucleico del medio ambiente extracelular, facilitar su entrada en células huésped y en muchos virus animales juega un papel importante en la primera etapa de infección. La cápside puede estar formada de moléculas de proteínas similares llamadas unidades estructurales o cápsómeros (agregados de unidades estructurales) la estructura completa (ácido nucleico cubierto por la cápside) constituye la nucleocápside.

El virus de la hepatitis B es un virus de DNA, el cual produce la enfermedad conocida como hepatitis sérica no se ha cultivado y transmitido en animales, aunque se puede ver en suero o plasma de los pacientes con hepatitis que presenta incubación larga (así como para otros tipos para los que no hay indicios sobre su periodo de incubación) y en otros individuos que los portan sin presentar síntomas. Se reconocen tres tipos de partículas esféricas de 42 nm con doble



envoltura, esfera de 2 nm y filamentos de 22 nm de diámetro. La presencia de cualquiera de los tres tipos se relaciona con la HBsAg detectable, la detección de HBsAg, utilizando RIA, ELISA o alguna forma de hemaglutinación pasiva, es más fácil de efectuar que la microscopia electrónica como medio para verificar muestras clínicas en busca de la presencia del virus, los antígenos o anticuerpos que portan enzimas marcadas se pueden localizar, añadiendo un sustrato que sufre un cambio visible ante la enzima (la enzima más usada con frecuencia para el marcado es la Peroxidasa de Rábano Picante y el sustrato de Peroxido de Hidrógeno con el cromógeno de Orto - fenilendiamina) Aprovechando la propiedad que tienen las proteínas de adsorberse a pH 9 - 10 a tubos, esferas, discos o concavidades en placas de plástico (poliestireno y polipropileno), se han desarrollado métodos de ELISA (Ensayo de enlace inmunoenzimático) que permiten la cuantificación de pequeñas cantidades de antígenos

El método puede desarrollarse fijando al plástico cantidades limitantes de anticuerpo, el cual se hace interaccionar con diferentes concentraciones del antígeno que se ha de valorar y la cantidad adecuada del mismo antígeno marcado. Existiendo una fase sólida que retiene al antígeno combinado, la discriminación entre éste y el antígeno libre, será fácil, y se obtendrán datos fundamentales para la graficación y cuantificación.

El ensayo de ELISA puede hacerse también con anticuerpo al que se le ha fijado la enzima o antigammaglobulina marcada. En el primer caso, a cantidades variables de antígeno fijadas al plástico se le añaden concentraciones constantes de anticuerpo enzimas marcado. Con lavado se elimina el anticuerpo que no se fijó, y el anticuerpo fijado se confirma añadiendo el sustrato correspondiente, que desarrollará color en forma proporcional a la del anticuerpo presente. Como en la inmunofluorescencia indirecta, la prueba de ELISA puede desarrollarse usando una antigammaglobulina contra la especie animal a la que pertenece el anticuerpo usada en la primera etapa, hecho que la hace más general y evita el uso del antisuero específico marcado para



cada una de las oportunidades. En este caso se fijan al plástico diferentes concentraciones de antígeno que se hacen reaccionar con un anticuerpo específico sin marca.

Después de lavar se añade la correspondiente antigammaglobulina marcada con la enzima, y transcurrido el tiempo conveniente y luego de lavar se adiciona el sustrato adecuado para el desarrollo de color y lectura de los resultados

9 HEPATITIS INFECCIOSA "B"

Krugman, Giles y Hammond en 1971 demostraron que la inyección de 0.1 ml de un suero infectante por el virus diluido 1:10 en agua destilada y calentando un minuto a 98°C, confería protección a niños sin experiencia previa con hepatitis infecciosa B, cuando a los 4 - 8 meses después eran inoculados con suero infectante no calentado. Una dosis de la vacuna protegió por completo a 4 de 10 niños y en el resto de la enfermedad se atenuó considerablemente al grado de tener que diagnosticarla a través de elevación en los niveles séricos de aminotransferasas y por la aparición del antígeno asociado con la hepatitis B en la sangre

La administración de dos dosis, aplicadas con intervalo de 4 o 5 meses pudo inmunizar totalmente a 4 niños que fueron inoculados 4 meses después con una dosis de suero infectante que produjo elevación de aminotransferasas en 24 de 25 inoculados sin previa inmunización y en presencia de antígeno circulante en los 25 casos

Soulier y cols, en 1972 informaron de un ensayo de inmunización en 7 personas con suero de un donador "sano" del virus de la hepatitis B, el suero calentado a 60°C durante 10 horas fue inyectado por vía intramuscular en dosis de 2.0 mL con intervalo de 10 días. En uno de los receptores hubo elevación de las aminotransferasas sin ictericia o hiperbilirrubinemia, en los 7 casos hubo aparición de anticuerpos antiviral B y en 6 de 7 se encontró el virus circulante en la sangre



El tratamiento térmico, no resultó suficiente para inactivar la infectividad del virus y persistió la inmunogenicidad. La comparación del contenido del virus en las preparaciones empleadas por Krugman y Soulier señala que probablemente los receptores del suero calentado a 60°C recibieron una dosis 640 veces mayor que la administrada en el ensayo de Krugman.

Los sueros infectantes calentados no son aceptables para uso general, independientemente de la infección subclínica, quedaría por probar la ausencia de infectividad para otros microorganismos, así como carencia de efectos indeseables a largo plazo para otras condiciones asociadas con la hepatitis B como el carcinoma hepático.

Objetivos de la vacuna

- 1) Conferir protección contra la infección por el virus B de la hepatitis infecciosa sin las condiciones acompañantes de la enfermedad crónica o del estado portador.
- 2) Inmunizar a los grupos en mayor riesgo de contraer la infección: enfermos y personal de hemodiálisis, cirujanos, dentistas, enfermeras, médicos que manejan enfermos de hepatitis, técnicos de laboratorio, Químico Farmacéutico Biólogo, recién nacidos de madres que contrajeron la enfermedad durante el embarazo, internos en instituciones de salud mental, drogadictos y probablemente militares.

Se recomienda especialmente para grupos poblaciones de alto riesgo como trabajadores de nosocomios, servicios funerales y forenses, personal que trabaja con sangre y hemoderivados, contactos domésticos con casos positivos, minusválidos bajo atención social, personas que viven en casas comunes u hogares de ancianos y trabajadores de estos centros, pacientes con cirugía lectiva con tiempo suficiente para la seroconversión, receptores de órganos de transplante, prisioneros y empleados de prisiones, personas con riesgo de contagio sexual, promiscuos homosexuales masculinos, sexoservidoras, pacientes con enfermedades venéreas y adictos a drogas.



3) Generar anticuerpos específicos contra el AgsHB sin el desarrollo de AgcHB o la aparición de

DNA polimerasa

Naturaleza y Características de la vacuna ⁶

La situación actual de no tener cultivado el virus de la hepatitis infecciosa B ha obligado a recurrir al plasma de portadores del virus B en su sangre, a la purificación de elementos no relacionados o útiles para la inmunización y a la inactivación del material con formol, este tratamiento es una medida de seguridad muy justificada en razón del peligro de una infección

La vacuna antihepatitis B recombinante Herbiobac HB de origen cubano, contiene una preparación de la proteína antigénica de superficie (HBsAg) del virus de la hepatitis B, obtenida a partir del cultivo de una levadura transformada por la inserción en su genoma del gen que codifica para el antígeno de superficie viral, mediante procedimientos de recombinación del ADN. El producto de este gen es extraído y purificado por una combinación de métodos fisicoquímicos y bioquímicos.

El antígeno de superficie purificado y obtenido agregado en forma de partículas de unos 22 nm, es absorbido finalmente en un gel de hidróxido de aluminio (0.5 mg de aluminio/dosis de 20 µg de antígeno) y se añade tumerosal (0.5 mg/dosis de 20 µg de antígeno) como preservativo.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la prueba de inmunogenicidad en ratón para determinar la potencia biológica requiere de un tiempo de análisis muy largo, además de requerir instalaciones adecuadas para mantener a los animales en condiciones controladas. Estos ensayos tienen un alto costo y no permiten obtener los resultados rápidamente por lo que se buscó un método alternativo *in vitro* con la conveniencia de obtener resultados más rápidos, con menor variabilidad y costo correlacionándolo con el método *in vivo* método del que está establecida la actividad biológica de la vacuna mediante la cantidad de respuesta inmune en función de la cantidad de antígeno del virus de la hepatitis B y el método *in vitro* con el que se identifica y cuantifica al antígeno estimando los parámetros estadísticos para ensayos biológicos mediante una transformación de tipo respuesta cuantitativa para obtener la potencia relativa de la vacuna en comparación con un patrón estándar de referencia calificado con el estándar que adopta la Organización Mundial de la Salud para la determinación de este tipo de análisis

Este método alternativo puede ser adoptado como método internacional por los diferentes productores de vacuna empleando sus propios estándares de referencia obteniendo resultados más rápidos para la liberación de los lotes de producción y aprovechar al máximo el producto en cuanto a su fecha de caducidad ya que el tiempo en que se fabrica la vacuna y se distribuye en el mercado considerando el método de inmunogenicidad se lleva alrededor de 4 meses mínimo afectando de algún modo al mercado privado y al sector salud en cuanto a sus programas de vacunación



OBJETIVOS

- 1 Identificar y cuantificar la presencia del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B en la vacuna antihepatitis B de tipo recombinante mediante un ensayo de ELISA, comparado con el patrón estándar de referencia de vacuna antihepatitis B
- 2 Seleccionar y aplicar un método de análisis estadístico en ensayos biológicos para determinar la potencia biológica de la vacuna antihepatitis B recombinante de origen Cubano.
- 3 Demostrar que el método de análisis *in vitro* cumple con la validación para ensayos de tipo Biológico.



HIPÓTESIS

Mediante un análisis inmunoenzimático *in vitro* para la identificación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B éste puede cuantificarse en una muestra de vacuna contra la hepatitis B comparado con un patrón estándar de referencia.

Sí esto ocurre al emplear un método de análisis estadístico en productos biológicos de tipo respuesta cuantitativa, se determina la potencia biológica y los parámetros de calidad para cumplir con la validación de ensayos biológicos y correlacionar ambos métodos demostrando que pueden emplearse ambos indistintamente



DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

♦ Tipo de estudio

De acuerdo con la investigación que se realizó el tipo de estudio fue prospecto de manera comparativo transversal y experimental, refiriéndose este a que se cuenta con información del estudio *in vivo* que se comparó con los ensayos prospectos *in vitro*, y es de tipo transversal experimental ya que la respuesta o las variables a medirse se determinaron una sola vez

Método *in vivo* (Inmunogenicidad en ratón)

♦ Población

360 ratones cepa NIH

Equipo de diagnóstico Heparostika anti-HBs Organon Teknika.

♦ Criterios de Inclusión

Ratones hembras con 5 semanas de nacidas

Peso 13 - 17 gr

Equipo de diagnóstico vigente con fecha mínima para usarse de 2 meses antes de su caducidad

♦ Criterios de Exclusión

Ratones empleados con anterioridad en algún otro experimento

Ratones que murieron en el tiempo de inmunización

Sueros de ratón que presentaron Lipoides ya que dan lugar a resultados falsos negativos y

Coágulos con células sanguíneas, provocan un aumento de resultados falsos positivos

Reactivo con fecha menor a 2 meses de caducar

Reactivo en mal estado físico o deteriorados



♦ **VARIABLES DEPENDIENTES**

La población de ratones ya que dependiendo de su respuesta obtuvimos la seroconversión medida por la cantidad de anticuerpos

El factor de Dilución de la vacuna para obtener una curva dosis-respuesta de tipo lineal

♦ **VARIABLES INDEPENDIENTES**

Origen de la Vacuna antihepatitis B recombinante

Marca comercial del Kit de diagnóstico para el análisis inmunoenzimático.

Método in vitro (Antigenicidad)

♦ **POBLACIÓN**

Equipo de diagnóstico para análisis inmunoenzimático para la detección de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en suero o plasma humano AUSZYME MONOCLONAL ABBOTT LABORATORIES

♦ **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

El Kit de diagnóstico que contiene anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie de la hepatitis B y sus controles de tipo humano atenuado

El Kit de diagnóstico con fecha de caducidad mínimo dos meses antes de su caducidad

♦ **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Reactivo con fecha menor a dos meses de caducar

Reactivo en mal estado físico o deteriorados



◆ **Variables Dependientes**

Muestras de vacuna tomadas en condiciones adecuadas de almacenamiento (2 a 8 °C)

El factor de Dilución de la vacuna

◆ **Variables Independientes**

Vacuna antihepatitis B patrón de referencia Lote 04-0296.

Vacuna antihepatitis B recombinante lotes de producción 807321, 910102, 010103, 810175 y
807316

Marca comercial del Kit de diagnóstico para análisis inmunoenzimático



Materiales, Equipo y Reactivos

- Micropipetas transferpett de 25 a 1000 μ L
- Puntas para micropipeta transferpett de 25 a 1000 μ L
- Tinas en forma de V desechables de 50 mL
- Estufa incubadora Comander a 37 °C
- Diluyente Seroalbumina bovina al 1 % en solución amortiguadora de fosfato salino pH = 7.2 a 7.3 (reactivo J.T. Baker y Merck)
- Sistema de lavado Automático ABBOTT LABORATORIES QUIK WASH
- Espectrofotómetro de placas ELISA START TXD ORGANON TEKNIKA
- Espectrofotómetro QUANTUM II ABBOTT LABORATORIES
- Tubos Eppendorf capacidad 1.5 a 2.0 mL
- Cloruro de sodio J T Baker Q.P
- Cloruro de potasio J T Baker Q P
- Fosfato de sodio J T Baker Q P
- Fosfato dibásico de potasio J.T Baker Q P
- Agua desmineralizada
- Balanza analítica Sauter capacidad 2100g
- Equipo para ELISA (AUSZYME MONOCLONAL) ABBOTT LABORATORIES Catálogo 1980
- Gel de hidróxido de Aluminio Origen Cubano
- Equipo para ELISA Hepanostika anti - Hbs de ORGANON TEKNIKA Catalogo 82145
- Centrifuga HETTICH UNIVERSAL 16 R capacidad 15000 r p m
- Jeringas desechables de 1.0 mL



MÉTODO ⁷⁻⁹

En la realización del diseño de validación como en la técnica alternativa para la prueba de potencia in vitro de la vacuna antihepatitis B recombinante se evaluaron los siguientes parámetros

Exactitud

Linealidad

Precisión (Reproducibilidad y Repetibilidad)

Para evaluar la precisión se tomaron en cuenta los parámetros de Reproducibilidad (precisión inter - ensayo) y Repetibilidad (precisión intra - ensayo), fueron evaluadas tres diluciones de una curva de concentraciones conocidas (alta /media /baja) por triplicado cada una en dos diferentes ensayos por dos analistas diferentes días, preparaciones independientes por analista.

Se preparó tres diluciones de concentración final de vacuna antihepatitis B recombinante a 2.5 ng/mL, 7.5 ng/mL y 12.5 ng/mL. De la manera siguiente

De la suspensión homogénea de vacuna se tomó 50 µL y se adicionaron 950 µL de diluyente seroalbumina bovina al 1% en solución amortiguadora de fosfato salino pH=7.2 en un tubo Eppendorf se homogeneizó manualmente, se tomó de este un volumen de 100 µL y se colocó en un tubo Eppendorf, posteriormente se adicionó 900 µL de diluyente de seroalbumina bovina al 1% en solución amortiguadora de fosfato salino a pH=7.2

A partir de esta Dilución se preparó las siguientes concentraciones

Volumen	+	Diluyente	Concentración final
25µL		975µL	2.5 ng/mL
75µL		925µL	7.5 ng/mL
125µL		875µL	12.5 ng/mL



Se utilizó el Kit de ensayo Auszyme Monoclonal para efectuar el ensayo de ELISA conforme a las especificaciones del proveedor, se emplearon controles positivos y negativos del Kit, aplicando primeramente en la placa tres muestras de control negativo, dos del control positivo y seguidamente cada una de las diluciones anteriores por triplicado.

Al final del ensayo se determinaron las absorbancias de cada una de las muestras a una longitud de onda de 492 nm

La exactitud es un parámetro que no es posible medir en algunos bioensayos^{7, 8} a causa de la actividad de la muestra y la gran variabilidad del mismo, por lo que se evaluó la especificidad y para evaluar la exactitud se empleo como referencia el material estándar cuya potencia biológica es conocida y referida a un patrón primario adoptado por la Organización Mundial de la Salud, se evaluaron tres diluciones a diferentes concentraciones del estándar en un mismo ensayo evaluando 10 veces cada concentración

Las diluciones fueron 2.5 ng/mL, 7.5 ng/mL y 12.5 ng/mL preparadas de la siguiente manera:

Del frasco de estándar de vacuna antihpatitis B de referencia se homogeneizó manualmente y se tomó una alícuota de 50µL, se pasó a un tubo Eppendorf y se adicionó 950µL de diluyente de seroalbúmina bovina al 1% en solución amortiguadora de fosfato salino a pH=7.2, se homogeneizó manualmente y se tomaron 100 µL de este para pasar a otro tubo Eppendorf al que se adicionó 900 µL de diluyente de seroalbumina bovina al 1% en solución amortiguadora de fosfato salino a pH=7.2. A partir de esta solución se prepararon las siguientes:

Volumen	+	Diluyente	=	Concentracion final
25µL		975µL		2.5 ng/mL
75µL		925µL		7.5 ng/mL
125µL		875µL		12.5 ng/mL



Se empleó el Kit de ensayo Auszyme Monoclonal para correr el ensayo de ELISA conforme a las indicaciones del instructivo, se considero los controles positivos y negativos del mismo Kit, se aplicó primeramente en la placa tres muestras de control negativo, dos del control positivo, seguidamente por cada una de las diluciones anteriores por triplicado

Al final del ensayo se determinaron las absorbancias de cada una de las muestras a una longitud de onda de 492 nm.

Tratándose de un análisis de bioensayo, se requiere de una transformación bien definida y el parámetro evaluado deberá estar dentro de un intervalo determinado.¹⁰

Se establecieron las condiciones del ensayo y se estimó la potencia biológica de la preparación estándar de referencia en un mismo ensayo tres preparaciones independientes, estas preparaciones consistieron en realizar una curva de cinco diluciones a diferentes concentraciones

De la muestra de vacuna se tomaron 50µL y se depositaron a un tubo Eppendorf, se adicionó 950µL de diluyente seroalbumina bovina al 1% en solución amortiguadora de fosfato salino a PH=7.2, se homogeneizó manualmente, se tomó 100µL y se pasó a otro tubo Eppendorf, se adicionó 900µL de diluyente seroalbumina bovina al 1% en solución amortiguadora de fosfato salino a pH=7.2 y a partir de esta solución se prepararon las siguientes.

Volumen	+	Diluyente	=	Concentración final
25µL		975µL		2.5 ng/mL
50µL		950µL		5.0 ng/mL
75µL		925µL		7.5 ng/mL
100µL		900µL		10.0 ng/mL
125µL		875µL		12.5 ng/mL



Se empleó el Kit de ensayo Auszyme Monoclonal para correr el ensayo de ELISA conforme a las indicaciones del instructivo, se consideró los controles positivos y negativos del mismo Kit,

Aplicando prumeramente en la placa tres muestras de control negativo, dos del control positivo y seguidamente por cada una de las diluciones anteriores por triplicado

Al final del ensayo se determino las absorbancias de cada muestra y corrida a una longitud de onda de 492 nm

DISEÑO ESTADÍSTICO⁹⁻¹¹

La titulación de sustancias biológicas debe realizarse mediante un ensayo de líneas paralelas. Cuando se aplica este tipo de ensayo, el título de la muestra se obtiene comparando las curvas dosis-respuesta del patrón y de la muestra.

Para ello es necesario ensayar varias diluciones tanto del patrón que se emplea como de la sustancia que se está titulando, y se aplican al sujeto en examen (animales, células, etc.) La respuesta obtenida en los sujetos se linealiza en función del logaritmo de las dosis y los puntos obtenidos se ajustan a dos líneas paralelas. La actividad biológica relativa se calcula, entonces, como el antilogaritmo de la distancia horizontal entre las dos rectas. Los ensayos de líneas paralelas pueden dar funciones dosis contra respuesta de distinta forma que hay que linealizar, el programa ParLin¹² tiene cuatro opciones de linealización que son, ninguna, logaritmo natural, logit y probit. El método empleado es general y no presenta limitaciones respecto al uso de diferente número de dosis en el patrón y la muestra o distinto número de replicas en cada una de las dosis. Una premisa indispensable para este tipo de cálculos es que el patrón y la muestra se comporten como si uno fuese una dilución del otro, es decir, que la función dosis vs respuesta de uno pueda ser considerada como una magnificación del otro. Si esto no ocurre, la titulación pierde sentido, pues el título dependería de la dilución evaluada y sería uno distinto para cada dilución lo que no puede ser ya que la evaluación de la muestra es relativa a la muestra de referencia.



El cumplimiento de esta premisa se evalúa en cada ensayo mediante una prueba de paralelismo.

El cálculo consiste en ajustar las funciones de logaritmo base 10 de dosis vs transformación de la respuesta a dos rectas paralelas, donde la transformación de la respuesta se realiza para linealizar la función dosis vs respuesta

El algoritmo ¹³ empleado para los cálculos es el siguiente:

- 1 Calcular el logaritmo de las dosis involucradas en el análisis
- 2 Calcular el promedio y la varianza de las respuestas de la réplica de cada dosis
- 3 Efectuar la transformación seleccionada para linealizar la función dosis contra respuesta a los promedios de cada una de las dosis.
- 4 Realizar una regresión lineal de los valores transformados en función de los logaritmos de las dosis, ajustando los valores a dos rectas de igual pendiente.
- 5 Calcular los valores esperados de la transformación empleada para cada una de las dosis del patrón y de la muestra, a partir de las rectas de regresión.
- 6 Para cada uno de los valores esperados obtenidos en el punto anterior, calcular el coeficiente de peso de la transformación (w)
- 7 Calcular los valores de trabajo de la transformación
Realizar una regresión sopesada de los valores de trabajo de la transformación en función de los logaritmos de las dosis. Como coeficiente peso se emplea (n número de réplicas)
- 8 Realizar un ANADEVIA para conocer la significación de los siguientes parámetros
 - Diferencia entre preparaciones.
 - Linealidad
 - Paralelismo
 - Regresión



• Diferencia de respuesta entre dosis

9 El cálculo de la potencia se realiza según la fórmula. $Pot = \text{Exp}(M)$

10 Se calculan los límites de intervalo de confianza empleando el teorema de Fieller

Límite superior = $\text{Exp}(M_s)$ y Límite Inferior = $\text{Exp}(M_i)$

$$MrMs = X_p - X_m + \left[(M - X_p - X_m) + 1/b \left\{ (1-g) \frac{1}{\sum(NW)_p} + \frac{1}{\sum(NW)_m} + \frac{(M - X_p + X_m)^2}{\sum(X_p - X_p)^2 + \sum(X_m - X_m)^2} \right\} \right] /$$

$(1-g)$

$$g = \frac{t^2}{b \left[\sum(X_p - X_p)^2 + \sum(X_m - X_m)^2 \right]}$$

Donde.

t = es el valor de la desviación de Student para el nivel de significación escogido

g = Grado de libertad

w = Coeficiente de peso

n = Número de replicas

M = Logaritmo de la Potencia relativa

X_p = Logaritmo dosis del estándar

X_m = Logaritmo dosis de la muestra

m = Muestra

p = Problema

M_i, M_s = Límites del intervalo de confianza

b = Pendiente de la recta



Fig. No. 2 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS IN VIVO¹⁴⁻¹⁶

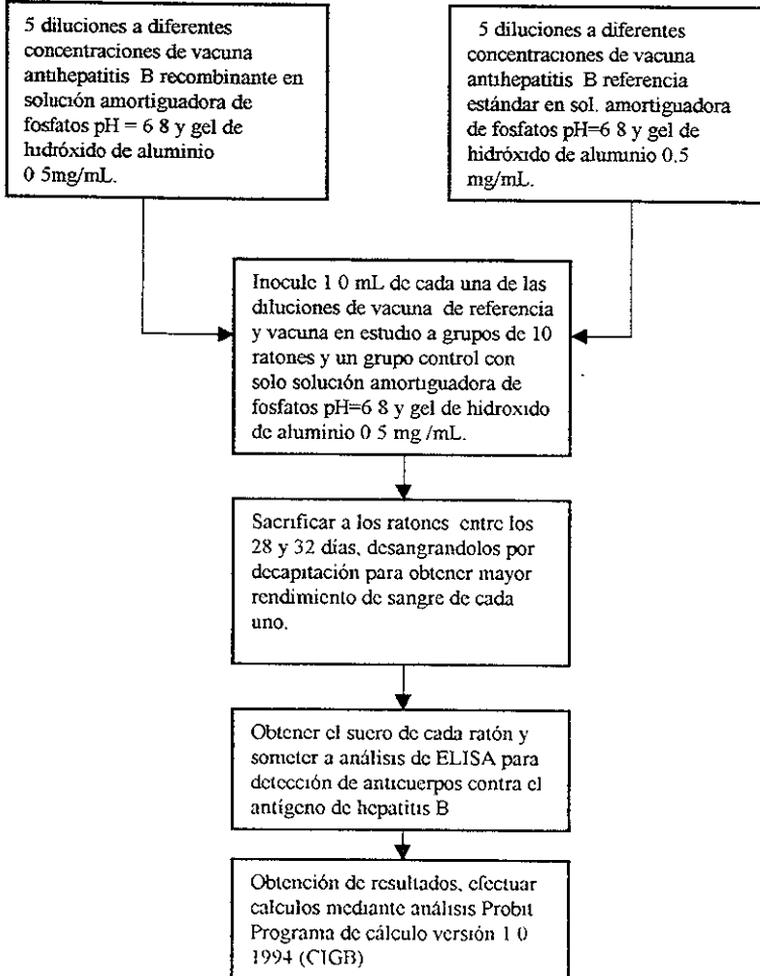
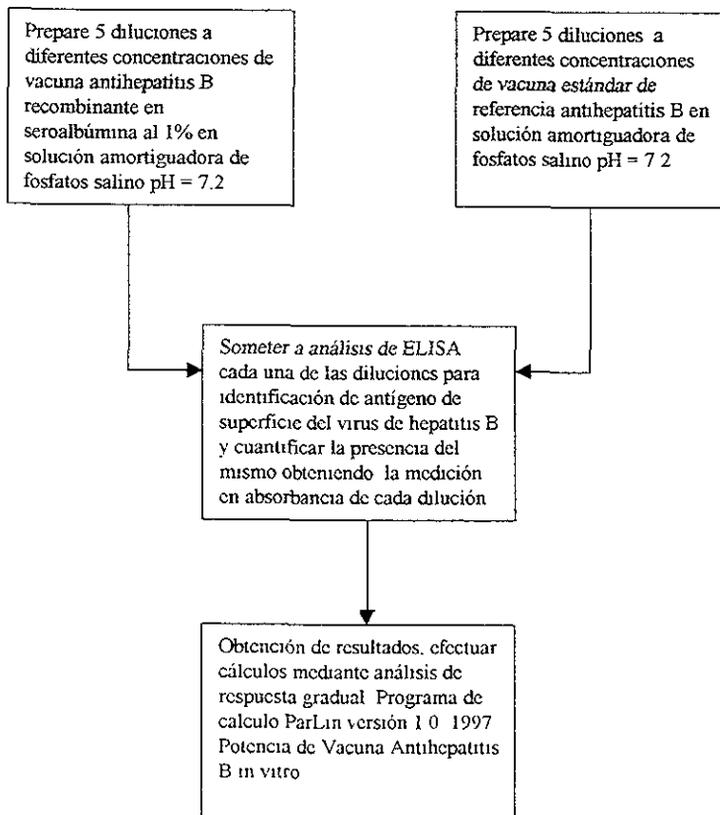




Fig . No. 3 **DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS IN VITRO** ¹⁷⁻²⁰





RESULTADOS

PRECISIÓN DEL SISTEMA (Reproducibilidad y Repetibilidad)

Concentración 2.5 ng/mL lote 807321

Corrida	Analista 1	Analista 2
1	0.382	0.486
	0.483	0.404
	0.498	0.386
2	0.362	0.366
	0.450	0.485
	0.457	0.482

Tabla No.2 Resultados en absorbancia de las mediciones sucesivas por cada analista en diferentes corridas, observando la dispersión de los resultados a una concentración determinada de vacuna para evaluar la variabilidad conforme a un análisis de varianza

Concentración 7.5 ng/mL lote 807321

Corrida	Analista 1	Analista 2
1	0.730	0.765
	0.773	0.793
	0.798	0.786
2	0.666	0.787
	0.694	0.798
	0.694	0.810

Tabla No.3 Resultados en absorbancia de las mediciones sucesivas por cada analista en diferentes corridas,

Observando la dispersión de los resultados a una concentración determinada de vacuna para evaluar la variabilidad conforme a un análisis de varianza



Concentracion 12.5 ng/mL lote 807321

Corrida	Analista 1	Analista 2
1	0.992	0.938
	0.975	0.941
	0.978	0.986
2	0.935	0.941
	0.982	0.993
	0.978	1.212

Tabla No. 4 Resultados en absorvancias de las mediciones por cada analista en diferentes corridas, observando la dispersion de los resultados a una concentración determinada de vacuna para evaluar la variabilidad conforme a un analisis de varianza

Para estimar la variabilidad se utilizó un análisis de varianza, el modelo que representa la relación entre la variable de respuesta y los factores es

$$Y_{ijk} = U + A_j + C_j(i) + E_k(ij)$$

Donde Y_{ijk} = variable de respuesta

U = Media poblacional de la variable de respuesta

A_j = Efecto del analista en la variable de respuesta

$C_j(i)$ = Efecto de la corrida en la variable de respuesta

$E_k(ij)$ = Error del método



ANADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcalc.	Ftabs
Ai	gla=a-1	SCa= $\sum Y_i^2/cr - Y^2/acr$	MCA=SCa/gla	Fa=MCA/MCc	Fgla.glc
Cj(i)	glc=a(o-1)	SCc= $\sum Y_{ij}^2/r - Y^2/cr$	MCc=SCc/glc	Fc=MCc/MCe	Fglc.gle
	EK(ij)	SCe= $\sum \sum Y_{ijk}^2/r - \sum \sum Y_{ij}^2/cr$	MCe=SCe/gle		

Tabla No. 5 Modelo estadístico del análisis de varianza

Criterio de decisión

Si Fcalc analista < Ftabs el método es reproducible por los analistas, Fcalc corrida < Ftabs el método es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Sustituyendo los resultados en absorvancias de cada una de las concentraciones de vacuna de acuerdo al modelo antes mencionado tenemos.

Fuente de variación	Fcalc	Ftabs	Fcalc	Ftabs	Fcalc	Ftabs
	2.5 ng/mL	2.5 ng/mL	7.5 ng/mL	7.5 ng/mL	12.5 ng/mL	12.5 ng/mL
Ai Efecto del analista	2.50	38.51	3.5	38.51	0.90	38.51
Cj(i) Efecto de la corrida	0.06	6.06	5.0	6.06	0.64	6.06

Tabla No. 6 Se observa que en cada una de las diferentes concentraciones de vacuna F calculada es siempre menor a la F de tablas tanto en el efecto del analista como en diferente corrida por lo que el método es reproducible por los analistas y por un mismo analista en diferente corrida



REGRESIÓN Y CORRELACIÓN LINEAL

Se determino la potencia del patrón estándar de referencia efectuando tres ensayos diferentes en replicas de tres cada dilución, estimando el valor de la potencia y los límites de confianza de acuerdo al programa ParLin ⁷

Tipo de transformación: Log Nat

Nivel de significación. 0.05

Pendiente Común 0.275

Lote estándar de vacuna	Ensayo	Potencia relativa	Límite Superior De Confianza al 95%	Límite Inferior De Confianza al 95%
04-0296	I	0.866	2.163	0.319
04-0296	II	0.883	2.201	0.330
04-0296	III	0.893	2.270	0.329

Tabla No. 7 Los resultados de potencia y Límite superior de confianza se encuentran dentro del intervalo determinado conforme a especificaciones y además se muestra la especificidad del bioensayo ya que en los tres ensayos los resultados no muestran una variación significativa empleando una transformación Par-lin bien definida



EXACTITUD

Estándar de vacuna 2.5 ng/mL	Absorbancia	Estándar de vacuna 7.5 ng/mL	Absorbancia	Estándar de vacuna 12.5 ng/mL	Absorbancia
1	0.599	1	0.707	1	0.913
2	0.590	2	0.705	2	0.908
3	0.547	3	0.706	3	0.908
4	0.594	4	0.706	4	0.910
5	0.593	5	0.706	5	0.914
6	0.598	6	0.706	6	0.914
7	0.582	7	0.705	7	0.906
8	0.590	8	0.705	8	0.915
9	0.598	9	0.706	9	0.914
10	0.593	10	0.710	10	0.913

Tabla No. 8 Resultados en absorbancia de tres diferentes concentraciones de vacuna estándar en réplica de 10 cada una observando la dispersión entre ellas para establecer la desviación estándar y el coeficiente de variación, el cual no es mayor a 3.0 y la desviación es menor a 1.0

n = 10 réplica

$\sigma = 0.0153$

c v = 2.6

n = 10

$\sigma = 0.0052$

c v = 0.736

n = 10

$\sigma = 0.0032$

c v = 0.351



ESPECIFICIDAD

Se determinó la absorbancia del diluyente y el placebo (Formulación de la vacuna sin Antígeno) y controles del ensayo

Control	Absorbancia
Control -	0 014
Control -	0 007
Control -	0 007
Control +	1 825
Control +	1.600
Valor de corte	0.035
Diluyente 1	0 010
Diluyente 2	0 010
Diluyente 3	0 017
Diluyente 4	0 012
Placebo 1	0 012
Placebo 2	0 013
Placebo 3	0 018
Placebo 4	0 028
Placebo 5	0 014
	Promedio de las absorbancias del diluyente \bar{X} 0 012
	Promedio de las absorbancias del placebo \bar{X} 0 017

Tabla No 9 No existe respuesta en el ensayo tanto por el diluyente como por el placebo ya que las absorbancias para ambos casos son menores al valor de corte del sistema ELISA (Reaccion de respuesta positiva generada por los controles del equipo de diagnostico)



COMPARACION DE LOS DOS MÉTODOS VALIDADOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

*VARIANZA COMBINADA DE LAS DOS DETERMINACIONES.*²¹

LOTES DE	MÉTODO <i>IN VITRO</i>		MÉTODO <i>IN VIVO</i>		GRADOS DE LIBERTAD	t^2	t^2	VARIANZA COMBINADA	
	LÍMITES DE CONFIANZA		LÍMITES DE CONFIANZA						
	LS	La LS	LS	La LS					
901102	3.36	1.211	1.387	0.327	4	7.709	0.781	0.025	
90103	2.864	1.052	1.668	0.511	4	7.709	0.292	0.009	
810175	1.795	0.585	1.083	0.079	4	7.709	0.256	0.007	
807316	2.161	0.770	1.675	0.515	4	7.709	0.065	0.002	
807321	2.782	1.023	2.770	1.018	4	7.709	0.000	0.000	
								VARIANZA COMBINADA	0.0086
								DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.0927
								COEF. DE VARIACIÓN GEOMETRICA	9.2 %

Tabla No. 10 Resultados de la varianza combinada de los métodos *in vivo* e *in vitro* en 5 lotes de vacuna evaluados

en el que el coeficiente de variación geométrica se encuentra por debajo de 20% demostrándose que no existe una diferencia significativa en los valores de acuerdo a la prueba de consistencia mutua descrita en la USP 23^{7,20-21} para este tipo de ensayos independientes

DIFERENCIACIÓN DEL ENSAYO BIOLÓGICO DEL MÉTODO *IN VIVO* E *IN VITRO*

ASPECTO	<i>IN VIVO</i>	<i>IN VITRO</i>
RESPUESTA	INMUNOGENICIDAD	ANTIGENICIDAD
VARIABILIDAD	MAYOR DE 50%	MENOS VARIACIÓN
COSTO	INSTALACIÓN, RECURSOS Y PERSONAL	POCO PERSONAL, NO NECESITA INSTALACIONES, MENOS COSTO
TIEMPO	SEMANAS O MESES	HORAS O DÍAS

Tabla No.11 Cuadro comparativo aspectos relevantes entre el método *in vivo* e *in vitro*



Especificaciones ^{10, 16, 20}

in vitro

Límite superior de confianza al 95 % debe ser igual o mayor a 1 0

Intervalo de confianza en un 95 % (80 a 125 %)

Potencia relativa (0.890 a 2.38)

in vivo

Límite superior de confianza al 95 % debe ser igual o mayor a 1 0

Intervalo de confianza en un 95 % (30 a 300 %)

Potencia relativa en el límite superior debe ser igual o mayor a 1 0



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Uno de los principales objetivos de la vacuna es la actividad biológica para inducir específicamente anticuerpos protectores en el humano por lo que debe cumplir con los requerimientos de Inmunogenicidad y seguridad ¹⁴

Al saberse en la actualidad existen dos tipos de vacunas contra la Hepatitis B ²² una es derivada de plasma humano de portadores y consiste de una suspensión de partículas HBsAg inactivas y adsorbidas a hidróxido de aluminio. El otro tipo está constituido por HBsAg obtenido en levadura que se ha recombinado con el gene correspondiente

Ya que tanto la vacuna recombinante como la elaborada con plasma humano tienen algunas diferencias bioquímicas, fue importante comparar la propiedad de estas vacunas para inducir la producción de anticuerpos. Ambas vacunas inducen anticuerpos que tienen una cinética similar, su isotopo es semejante, se combinan con el antígeno vacunal (derivado del plasma o el obtenido en levaduras), existen estudios de protección en humanos y chimpancés contra el desafío con el virus de la hepatitis B. Por todos estos criterios, se concluye que las dos vacunas son inmunológicamente comparables.

Así mismo solo es necesario la determinación de un método para evaluar su potencia biológica

Al evaluarse su Inmunogenicidad por un ensayo *in vivo* fue determinante, sin embargo, se estableció un método alternativo *in vitro* con el que fue posible identificar y cuantificar el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en muestra de vacuna antihepatitis B recombinante al conocer de antemano la protección en el humano, solo fue necesario validar y correlacionarlo al método de Inmunogenicidad para asegurar que la cantidad de dosis detectada en la muestra de vacuna evocará una respuesta inmune dando la protección al humano

El análisis de la validación nos llevo a emplear análisis estadístico de resultados para ensayos de tipo biológico



El diseño de la validación fue evaluar primeramente la titulación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B mediante un ensayo de líneas paralelas ya que para hacer aparente el efecto de Dilución fue necesario transformar la relación dosis-efecto a una relación lineal, y seguidamente los parámetros de exactitud, linealidad, especificidad y precisión.

Los resultados obtenidos en el análisis de regresión y correlación lineal al estimar la potencia de tres ensayos de la vacuna empleando el programa Par-Lin observamos las curvas dosis respuesta en donde la dosis y la respuesta son representadas por una línea recta, en el intervalo de dosis ensayadas y que la línea recta es paralela a la del estándar ya que se cumple en los ensayos con el paralelismo, por tanto, la asociación es de tipo lineal, y para evaluar si el ensayo satisface las condiciones del modelo estadístico se efectuó el análisis de varianza y los criterios resultantes indican que no hay desviaciones del efecto lineal del log de la dosis sobre la respuesta, así como el efecto en las preparaciones no existe una diferencia y que el método es reproducible por los analistas en diferente día por un mismo analista

Al evaluar la exactitud del ensayo como es un parámetro que no es posible medirse en algunos bioensayos a causa de la actividad de la muestra y por la gran variabilidad del mismo el parámetro en este caso fue la precisión evaluando la repetibilidad, se evaluó tres diluciones del estándar de referencia a diferentes concentraciones en un mismo ensayo con replica de 10 veces cada una con la finalidad de medir de forma paralela en el mismo ensayo la muestra estándar de referencia, con lo que podemos observar que en el mismo ensayo a diferentes concentraciones la desviación estándar es menor a uno y los coeficientes de variación están por debajo de 30 por lo que la exactitud de medición de una muestra por este método es factible para determinar la cantidad adicionada o recuperada



En la tabla No. 9 de especificidad del ensayo se presentan los valores obtenidos de absorbancias, considerando como criterio de no interferencia que los valores de absorbancia se encuentren por debajo de los valores obtenidos en los controles negativos y positivos del Kit de diagnóstico considerados como valor de corte observando que en todas las muestras de diluyente y placebo las respuestas se encuentran por debajo del valor de corte, lo que muestra que el ensayo es específico por no tener la interferencia de la muestra en análisis con los reactivos del sistema de análisis

Una vez evaluados los parámetros antes indicados determinamos que es posible estimar la potencia relativa de la vacuna por los dos métodos, el sistema *in vivo* se mide en función de la cantidad de respuesta de antígeno comparado con un estándar de referencia el cual debe cumplir dentro de un intervalo de concentración para asegurar que la misma induce una respuesta inmune, se comparo evaluando la variabilidad intraensayo en 5 lotes por los dos métodos en ensayos independientes, al analizar la correspondencia de los valores obtenidos mediante la aplicación del estudio de consistencia mutua se estimó la varianza y el coeficiente de variación geométrico de los que podemos establecer que no hay discrepancia entre los valores de potencia obtenido por el método *in vivo* con el de *in vitro* con una variabilidad por debajo de la establecida ^{7, 20-21} para este tipo de análisis inmunoenzimáticos (variabilidad de hasta un 20 %)

El diseño del análisis ²³ y los resultados nos establece resultados validos que dan el soporte de aceptación al método *in vitro* como técnica alternativa a la prueba de potencia de la vacuna antihepatitis B recombinante mediante determinación de la cantidad de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en una muestra de vacuna contra la hepatitis B



CONCLUSIONES

La validez en ambos métodos para la determinación de la potencia biológica de la vacuna antihepatitis B se cumple, al emplear el método *in vitro* se identifica y cuantifica al antígeno en comparación a una estándar de referencia corriendo bajo el mismo ensayo cumpliéndose la linealidad y el paralelismo, determinando la potencia de la vacuna al emplear el método estadístico Par-lin obteniendo los límites del intervalo de confianza con una variabilidad comprendida entre el 80 a 125 %.

En el ensayo de precisión del sistema bajo las condiciones establecidas el método es reproducible por los analistas en diferentes corridas por un mismo analista, así como la repetibilidad del ensayo tiene un coeficiente de variación menor del 3 %.

Los componentes químicos y biológicos que pueden estar en la muestra no interfieren con el sistema de análisis, ya que las densidades ópticas son mucho menores al valor de corte del sistema de análisis de ELISA no alterando la respuesta por los componentes permitiendo cuantificar al antígeno.

Se cumple con los parámetros de validación para este tipo de métodos biológicos, por lo que el empleo del método *in vitro* es confiable y reproducible en comparación con el ensayo de Inmunogenicidad en ratones en los cuales esta determinada una concentración de antígeno capaz de producir los anticuerpos necesarios para dar protección al humano contra el virus de la hepatitis B y el método de antigenicidad nos permite conocer dicha concentración de antígeno en una muestra clínica o en la vacuna contra la hepatitis obteniendo resultados rápidamente con beneficio en un diagnóstico clínico, como a los productores de vacuna con la finalidad de liberar la vacuna para suministro al sector privado como al sector salud



RECOMENDACIONES

1. Una de las recomendaciones es que al evaluar la potencia de la vacuna sea mediante el uso de vacuna estándar de referencia conforme a las características de la muestra en estudio y que la misma haya sido evaluada con el estándar internacional adoptado por la Organización Mundial de la Salud²⁴
2. El empleo de los sistemas de diagnóstico debe ser específico para la muestra y el ensayo mismo, sin alternar diferentes marcas ya que se tiene diferente variabilidad y será necesario evaluar la especificidad del mismo
3. Es conveniente conocer el tipo de células empleado en la producción de la vacuna para determinar la compatibilidad con el Kit de diagnóstico.¹⁷
4. Debe conocerse el nombre y cantidad del adyuvante para determinar en el estudio que no exista interferencia e inhibición
5. Al analizarse la vacuna debe proceder con las condiciones de almacenamiento que establezca el productor²⁵
6. Puede establecerse otra curva de concentración de estándar y muestra siempre que se cumpla con la linealidad y el paralelismo en el ensayo así como con las especificaciones de la vacuna.



BIBLIOGRAFIA

1. Ayala F, Kiger J. *Genética moderna*. Fondo educativo interamericano, 1984 308-319
2. Kumate J. *Inmunidad inmunización vacuna*. 2ª ed Edición Médica del Hospital Infantil de México, 1979, México. 1-50.
3. Milch D. T-and B-cell recognition of hepatitis B viral antigens *Immunology today* 1988, Vol 9 380-386
4. Drew W, Murray P, Kobayashi G. *Microbiología médica*. Mosby-year book, 1992, España 481-490, 547-565.
5. Brostoff J, Male D, Roit I. *Immunology*. 3ª ed. Mosby-year book, 1993. 15.1-15 22.
6. Quintana M. Heberbiovac HB. Heberfarma 1992, La Habana cuba 22-24.
7. *United States Pharmacopoeia*. Desing and analysis of biological assays USP 23, National Formulary 18 1705-1715
8. Anik E, Gillian L, Roger A y col. *A Who guide to good manufacturing practice (GMP) requirements validation part 2; 1997; (suppl. Vaccine and Quality): World Health Organization, Geneva. 65-69*
9. Finney D, *Statistical methods in biological assay* 3ª ed London, 1978
10. *Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos* 6ª ed, 1994 1523-1530, 1575-1580
11. *Farmacopoeia European Biological Assays-Statistical Analysis of Result of Biological Assay and Test* 300-325
12. García G. *Manual del usuario del programa par-1in* La Habana cuba Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 1994 1-9
13. García G. *Manual del usuario del programa de potencia* La Habana cuba Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 1986 1-5



- 14 Chamberlain P, Ferguson M. Assuring the quality of biological medicines NIBSC : Bélgica
Report Annual for year 1 April 1994 to 31 March 1995, rep 1 vol. 5. 1-3
- 15 Hepanostika anti-HBs. Diagnóstico in vitro para detección de anticuerpos de antígeno de superficie de la hepatitis B (Anti-HBs) en suero o plasma humano. Microelisa System;
Organon Teknika, vol. 1 30-38.
- 16 World Health Organisation. Requirements for hepatitis B vaccines made by recombinant
DNA techniques in yeast Biologicals. 1995; 1056: 1-6
- 17 Auszyme Monoclonal. Enzyme immunoassays for the detección of hepatitis B surface antigen
(HbsAg) in human serum or plasma Microelisa system; november 1995 1-20.
18. Ramírez V, Prueba rápida de antigenicidad in vitro realizada a la vacuna cubana
recombinante contra la hepatitis B. Biotecnología aplicada 1993. Vol. 10: 94.
- 19 González G, Ramírez V, Salgado A y col. Cuantificación del antígeno de superficie del virus
de la hepatitis B en muestras biológicas con fines asistenciales y preparativos Biotecnología
Aplicada 1993; vol 10 104-105
- 20 Ferguson M, Heath A, Minor P. Report of a collaborative study for assessing the potency of
hepatitis B vaccines Biologicals 1990, 18. 345-350
- 21 Izquierdo M Estudio de precisión intraensayo La Habana cuba, CIGB 1999 1-4
- 22 Escobar A, Sepúlveda J, Valdespino J. Vacunas ciencia y salud Secretaria de Salud 1992:
México 273-283
- 23 Steel R, Torrie J Bioestadística principios y procedimientos. Editorial Mc. Graw-hill, 1988,
México 11-40, 111-187
- 24 Izquierdo M, Vega M Estudio del material de referencia para vacunas antihepatitis B La
Habana cuba CIGB, 1999 1-5



25 Izquierdo M, Vega M Estabilidad de producto final vacuna antihepatitis B heberbiovac HB.

La Habana cuba CIGB, 1998 2-24



ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
FIGURA No 1 MODELO DE HOLLIDAY PARA LA RECOMBINACIÓN GENÉTICA	4
FIGURA No 2 DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS IN VIVO	41
FIGURA No 3 DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS IN VITRO	42



ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁG
TABLA No 1 CASOS ACUMULADOS DE HEPATITIS B POR ENTIDAD FEDERATIVA	9
TABLA No 2 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PRECISIÓN DEL SISTEMA EN DOS ANALISTAS A UNA CONCENTRACIÓN BAJA DE VACUNA	43
TABLA No 3 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PRECISIÓN DEL SISTEMA EN DOS ANALISTAS A UNA CONCENTRACIÓN MEDIA DE VACUNA	43
TABLA No 4 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PRECISIÓN DEL SISTEMA EN DOS ANALISTAS A UNA CONCENTRACIÓN ALTA DE VACUNA	44
TABLA No 5 MODELO ESTADÍSTICO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA	45
TABLA No 6 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA EN DOS ANALISTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VACUNA	45
TABLA No 7 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE REGRESIÓN Y CORRELACIÓN LINEAL	46
TABLA No 8 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EXACTITUD	48
TABLA No 9 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD	49
TABLA No 10 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VARIANZA COMBINADA DEL MÉTODO IN VIVO E IN VITRO	49
TABLA No 11 ASPECTOS RELEVANTES DEL MÉTODO IN VIVO E IN VITRO	49



ABREVIATURAS

ANADEVA = *Análisis de varianza*

A(j) = Efecto del analista en la variable de respuesta

att = Sitio de unión

ARN = Ácido ribonucleico

BCG = Bacto Calmette-Guerin (para inmunización tuberculosa)

b = Pendiente de la recta

CIGB = Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

C_{j(i)} = Efecto de la corrida en la variable de respuesta

DE₅₀ = Dosis efectiva que produce un 50 % de respuesta en las unidades de prueba

DNA = Ácido desoxirribonucleico

Ek(jj) = Error del método

ELISA = Ensayo inmunosorbente vinculado con enzimas

Fcal = Media de cuadrados calculada para cada fuente de variación

Ftab = Media de cuadrados de tablas para cada fuente de variación

g = Grados de libertad

H₂O₂ = Peróxido de Hidrógeno

HbsAg = Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

HLA = Linfocitos

IgM, IgAs = Inmunoglobulina M, Inmunoglobulinas

K, %K = Dosis efectiva de respuesta, porcentaje de respuesta

M = Logaritmo de la potencia relativa

MPA = Materia prima activa

m = Muestra

Ms, Mi = Límites del intervalo de confianza superior e inferior

NIH = Cepa de origen de los ratones (Instituto Nacional de Salud)

n = Número de replicas

OMS = Organización Mundial de la Salud

OPD = *Ortofenilendiamina*

P = Problema

PO₂ = Potencial redox

RNA = Ácido ribonucleico

RIA = Análisis de radioinmunoensayo

t = Valor de la desviación de Student

U = Media poblacional

w = Coeficiente de peso

Xp = Logaritmo dosis del estándar

Xm = Logaritmo dosis de la muestra