



Facultad de Estudios Superiores

IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Escalamiento y Formulación de lotes piloto de Vacuna
Antipoliomielítica Oral Bivalente (bOPV) en la plataforma
de fabricación de la Vacuna Antipoliomielítica Oral
Trivalente (tOPV) del Instituto Nacional de Virología”**

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

Gabriel Agustín Yáñez Martínez

DIRECTOR DE TESINA

Dr. Hugo Virgilio Perales Vela

COMITÉ TUTOR

Dra. Ligia Rivera De la Parra

Biol. Erick José López Arredondo

Biol. Karen Damahesi Cruz Pavon

Biol. Haide Saldaña Esquivel



Los reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Edo. De México, MÉXICO. 2024.



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.

Para mi sólo recorrer los caminos que tienen corazón, cualquier camino que tenga corazón y la única prueba que vale es atravesar todo su largo.

Juan Matus.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Hugo Alberto Virgilio Perales Vela, que representa excelentemente los valores de la UNAM, sin su valiosa guía y ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias al Biol. Erick José López Arredondo por la ayuda durante todo el proceso.

Gracias a Juan Carlos Tovar Gómez porque en este reencuentro tu apoyo incondicional me trajo hasta aquí.

A Guillermo, Juan Carlos, Juan, Miguel, Gustavo Rosalinda, Roberto, Rocío, Alma, gracias por todas las experiencias, las enseñanzas de vida, el apoyo y la compañía a lo largo de este camino.

Gracias al INV, mi segundo hogar, a Rocío por abrirme las puertas, a mis maestras Gloria y Marisela y a todos mis compañeros de los que aprendí y sigo aprendiendo hasta la fecha.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi Madre por inculcarme lo bueno que hay en mí, por su ejemplo comprensión y cariño, a mi Padre por todo su apoyo y consejos.

Para ti Clarita, mi segunda madre

A ti Marisela, mi gran compañera de vida, mi gran amiga, mi gran amor.

A mis hijos Melián y Eru, el gran regalo de esta vida.

A mis hermanas Sandra y Georgina, por todo su apoyo a lo largo de mi vida. A mis sobrinos Nacho e Itza y a mis cuñados, Abraham e Ignacio.

A mis tíos y tías de la familia Martínez por su gran ejemplo.

INDICE

ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCION.....	9
PATOGENESIS	10
MODOS DE TRANSMISION.....	12
DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	12
CULTIVOS CELULARES.....	13
SEROLOGIA.....	14
MÉTODOS MOLECULARES	14
ANTECEDENTES	14
HISTORIA.....	15
MANEJO DE CASOS.....	17
LA POLIOMIELITIS EN MÉXICO	18
IPV	21
OPV	23
ERRADICACION	26
INSTITUTO NACIONAL DE VIROLOGIA-INV.....	27
JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVOS	29
Objetivo General	29
Objetivos Específicos.....	29
METODOLOGIA.....	30
SEMILLAS VIRALES	30
GRANELES MONOVALENTES DE POLIOVIRUS TIPO 1 Y 3	31

BANCOS CELULARES.....	32
DESARROLLO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL....	32
DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LA FORMULACIÓN DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL	32
FASE PILOTO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL....	33
FASE DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA.....	34
DIAGRAMA DE FLUJO DE LA FABRICACIÓN DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA	35
DIAGRAMA DE FLUJO DE LA FORMULACIÓN, MEZCLA, LLENADO Y ACONDICIONAMIENTO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL.	36
RESULTADOS	38
FASE EXPERIMENTAL DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL.....	38
TABLA 1.	39
FIGURA 1.	40
FASE PILOTO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL....	41
TABLA 2.	42
TABLA 3.	42
FASE DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA.....	43
TABLA 4.	44
CONCLUSIONES.....	45
APENDICE	46
REFERENCIAS	58

ABREVIATURAS

bOPV- Vacuna Antipoliomielítica Oral bivalente.

tOPV- Vacuna Antipoliomielítica Oral trivalente.

OMS- Organización Mundial de la Salud.

ARN- Ácido Ribonucleico.

IPV- Vacuna Inactivada de Poliovirus.

OPV- Vacuna Oral de Poliovirus.

VAPP- Vaccine-associated paralytic poliomyelitis.

VDPV- Vaccine-derived polioviruses.

WPV- Wild poliovirus.

GPEI- Global Polio Eradication Initiative.

AACPE- Comité Asesor para la Erradicación de la Polio.

mOPV- Vacunas Antipoliomielíticas orales Monovalentes

mOPV1- Vacunas Antipoliomielíticas orales Monovalentes tipo 1.

mOPV2- Vacunas Antipoliomielíticas orales Monovalentes tipo 2.

mOPV3- Vacunas Antipoliomielíticas orales Monovalentes tipo 3.

INV- Instituto Nacional de Virología.

COFEPRIS- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

BPF- Buenas Prácticas de Fabricación.

NOM-059- Norma Oficial Mexicana 059.

BCT- Banco Celular de Trabajo.

SV- Semilla viral.

SVT- Semilla Viral de Trabajo.

SVM- Semillas Virales Maestras.

SNC- Sistema Nervioso Central.

RT-PCR- Reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

ELISA- Enzyme linked immunosorbent assay.

INTRODUCCION

La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe a la poliomielitis como una enfermedad altamente infecciosa, causada por un grupo de virus llamados “enterovirus humanos” caracterizada por la afectación principal de las neuronas de la médula espinal, que se manifiesta con parálisis flácida asimétrica y puede llegar a causar una parálisis flácida total en cuestión de horas, dejando secuelas de por vida. El poliovirus es un virus, de la familia Picornaviridae y del género *Enterovirus*, del cual se conocen tres serotipos: tipo 1 (Brunilda), que se aísla con mayor frecuencia en los casos paralíticos; tipo 2 (Lansing) y tipo 3 (León). Los tres serotipos tienen diferentes proteínas de cápside y comparten la mayoría de las propiedades bioquímicas y biofísicas con otros enterovirus. Son estables a pH ácido (3.0– 5.0) durante 1 a 3 horas y resistentes a la inactivación, por la mayoría de los detergentes y desinfectantes comunes, incluyendo jabones, detergentes no iónicos y solventes de lípidos como el etanol, éter y cloroformo. Los poliovirus se inactivan rápidamente por tratamiento con 0.3% de formaldehído o 0.5% ppm de cloro residual libre, por desecación, baja humedad, o por la exposición a la luz ultravioleta. La infectividad viral es estable por meses a +4°C y por días a +30°C. Los poliovirus se inactivan a 55°C, sin embargo el cloruro de magnesio estabiliza su infectividad (Plotkin, 2011).

El genoma viral, es una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, de aproximadamente 7500 nucleótidos de largo. El poliovirus tiene un diámetro de 25 a 30 nm, tiene una cubierta externa o cápside compuesta por 60 protómeros cada uno formado de 4 proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP4 organizadas en simetría icosaédrica. Las cuatro proteínas virales están formadas por 8 cadenas de proteína dispuestos en hojas β formando un barril β . Debido al re-arreglo de diversas proteínas,

se forman bucles o “loops”, los cuales funcionan como sitios antigénicos (Racaniello, 2006) (Plotkin, 2011).

La inmunidad para un serotipo no produce inmunidad para los otros dos (Mosquera *et al.*, 2014).

PATOGENESIS

La poliomielitis es una enfermedad que, en la mayoría de los casos, 95%, cursa de manera asintomática, siendo llamada en este modo poliomielitis abortiva, pero que en el 1% de los casos causa parálisis flácida aguda, en este caso nos encontraríamos frente a una poliomielitis paralítica. El resto de pacientes, 4%, cursaría con una poliomielitis no paralítica cuyos síntomas más notorios son la fiebre los mareos y las náuseas. Una vez que se supera la enfermedad, muchos de los pacientes desarrollan muchos años después el llamado síndrome post-polio, una forma de la enfermedad no tan conocida y que actualmente están sufriendo muchos pacientes. Los humanos son los únicos huéspedes naturales conocidos de poliovirus. Algunas especies pueden infectarse de forma experimental tales como chimpancés y monos del viejo mundo como *Rhesus*, *Cynomolgus* y monos verde africanos. Los resultados de experimentos con ratones sugieren que la resistencia de otras especies a la infección por poliovirus se debe a la ausencia de un receptor celular (Holland *et al.*, 1959). La síntesis de CD155 en células L de ratón o en ratones transgénicos confieren susceptibilidad a la infección (Koike *et al.*, 1991).

Los poliovirus se adhieren y entran a las células mediante un receptor específico (PVR, poliovirus receptor). El receptor celular para los tres serotipos de poliovirus es la

glicoproteína CD155, la cual forma parte de la superfamilia de proteínas de la inmunoglobulina CD155, (Mendelsohn *et al.*, 1989) está compuesta de tres dominios extracelulares: un dominio de tipo V, al cual se une poliovirus y dos dominios de tipo C2. La interacción de poliovirus con el dominio de tipo V de CD155 conlleva a un cambio conformacional de la partícula viral y la liberación del RNA genómico hacia el citoplasma, en donde el RNA viral se traduce y da inicio la producción de nuevos viriones infecciosos (Mueller *et al.*, 2005), (Racaniello, V.R., 2006).

Las células epiteliales humanas producen niveles altos de glicoproteína CD155, lo que sugiere que dichas células podrían ser los primeros sitios de replicación de poliovirus (Racaniello, V.L., 2006). En los humanos, la glicoproteína CD155 se detectó en el epitelio intestinal, células M de las placas de Preyer y en los centros germinales de las placas de Preyer (Iwasaki *et al.*, 2002).

El poliovirus entra a la orofaringe y se multiplica en las amígdalas, nódulos linfáticos del cuello y subsecuentemente en las placas de Preyer y mucosa intestinal. El periodo de incubación se establece desde 2 días hasta 35. Posteriormente de 3 a 5 días, el virus es excretado en heces durante varias semanas (4 a 6 semanas en personas inmunocompetentes y menos de 3 años en personas inmunodeficientes) y en saliva por 1 a 2 semanas; este periodo puede presentarse asintomático o con síntomas de viremia leve o benigna. Pueden presentarse episodios de gastroenteritis autolimitante, infecciones del tracto respiratorio o malestar general. La viremia puede desaparecer debido a la aparición de anticuerpos o propagarse al sistema nervioso central (SNC) a través del torrente sanguíneo.

Inicialmente el virus causa destrucción debido a su naturaleza citopática. Se presenta un daño extenso en las células del asta anterior de la médula espinal lo que causa la parálisis de las extremidades. El virus puede propagarse a las células del asta posterior,

neuronas motoras del tálamo e hipotálamo. La poliomiелitis bulbar afecta al tronco cerebral lo cual es fatal. También puede ocurrir la muerte cuando se presenta la parálisis respiratoria. La atrofia muscular generalizada da lugar a la parálisis flácida. El síndrome post-polio se presenta por el deterioro progresivo de los músculos debido a que se atrofian las neuronas motoras (Plotkin, 2011).

MODOS DE TRANSMISION

La poliomiелitis se transmite de un paciente o portador asintomático a través de la vía oral-fecal. La replicación del virus ocurre y se limita al tracto alimenticio u orofaringe. Su periodo de incubación es de 7 a 14 días, (intervalo de 4-35 días) y el periodo de contagio es de 7 a 10 días antes del inicio de los síntomas, excretándose por vía fecal hasta 8 semanas después de la aparición de síntomas.

La propagación se da de manera muy rápida en áreas con falta de saneamiento, especialmente entre la población no inmune, sobre todo en los meses de verano de las regiones cálidas y tropicales.

No existe un tratamiento específico, pero es prevenible a través de la vacunación (Mosquera, et al., 2014).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El método de diagnóstico actual es la detección de poliovirus por reacción en cadena de la polimerasa PCR (polymerase chain reaction), el virus se aísla de muestras de heces, exudado faríngeo y líquido cefalorraquídeo. Idealmente, se deben coleccionar 2 muestras de heces en un intervalo de 24 horas, dentro de las 2 primeras semanas, para incrementar la probabilidad de aislar el virus. La presencia del virus en la orofaringe

usualmente se da en la fase temprana de la infección; el virus rara vez se puede aislar del líquido cefalorraquídeo en los casos de meningitis aséptica (World Health Organization, 2004).

CULTIVOS CELULARES

Inicialmente el virus se cultivó en líneas celulares de monos *Rhesus* y *Cyanomolgus*. En la actualidad, se utilizan diversas líneas celulares como las líneas celulares humanas de amnios y de embrión. La OMS recomienda utilizar dos líneas celulares para el aislamiento de poliovirus a partir de muestras de heces: la línea celular RD, la cual proviene de un rhabdomyosarcoma humano y la línea celular L20B, derivada de una línea celular L de ratón manipulada genéticamente para expresar el receptor humano de poliovirus. Las células RD son altamente sensibles a la infección por poliovirus y favorecen la producción de títulos altos de poliovirus en cultivo. Las células RD permiten la replicación de otros enterovirus humanos excepto virus Coxsackie B. Las células L20B permiten la replicación de poliovirus, pero al igual que sus progenitoras, las células L de ratón, son resistentes a la infección por la mayoría de los enterovirus que no son polio; por lo que las células L20B se utilizan para el cultivo selectivo de poliovirus (World Health Organization, 2004).

La replicación del virus se determina por el efecto citopático que éste produce en las líneas celulares, lo cual ocurre dentro de los 7 días post-inoculación.

El poliovirus aislado se identifica mediante un ensayo de neutralización, utilizando antisueros específicos de cada serotipo. Los poliovirus también pueden identificarse por RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) utilizando iniciadores específicos para grupo, serotipo y cepa.

La diferenciación intratípica de los poliovirus aislados se realiza para verificar si el virus aislado es una cepa silvestre o derivada de la vacuna, y se realiza utilizando un método antigénico y un método molecular. Las técnicas se basan en el fundamento de un ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA, enzyme linked immunosorbent assay) y en técnicas de hibridación (World Health Organization, 2004).

SEROLOGIA

Para la confirmación de una infección se debe observar un incremento de cuatro veces el título de anticuerpos. Los anticuerpos neutralizantes aparecen casi desde el inicio de la enfermedad y persisten para toda la vida (World Health Organization, 2004).

MÉTODOS MOLECULARES

La secuenciación genética de los virus es esencial para determinar su origen y su modo de transmisión en caso de un brote, o bien para conocer si se trata de una cepa re circulante o importada y detener su transmisión (World Health Organization, 2004).

ANTECEDENTES

Historiadores han encontrado vestigios, que demuestran la existencia de la poliomielitis desde tiempos antiguos. Existen evidencias de que se trata de una enfermedad muy antigua, fue conocida por los egipcios. En una estela de la XVIII dinastía (1580-1350 a C.) se observa un posible caso de poliomielitis (Carlsberg Glyptotek, de Copenhague), ya que se muestra a un joven sacerdote egipcio, cuya pierna derecha es más corta y delgada que la izquierda y cuyo pie apunta hacia abajo,

en la forma característica de la Polio (pie equino). 1600 años a C., en unos bajos relieves descubiertos en la pirámide de Zakkar se destacan, esculpidos claramente en piedra, jóvenes con secuelas de la enfermedad. Sipta, el séptimo faraón De la XIX Dinastía (1194-1118 a C.), tuvo dificultades para suceder a Setthy II por dos razones: porque era un niño y porque tenía una pierna inutilizada a causa de la poliomielitis (Borrego & Bosch, 2017).

En el renacimiento, las parálisis resultantes de la poliomielitis se encuentran representadas en la procesión de los lisiados de la pintura de Hyeronimus Bosch (González-Rubio, 2018).

Desde el punto de vista epidemiológico, la historia de la poliomielitis se divide en tres fases: 1) endémica, desde la Antigüedad hasta el siglo XIX, con actividad clínica esporádica; 2) epidémica, desde mediados del siglo XIX hasta los años cincuenta del siglo pasado, con brotes de creciente magnitud y extensión geográfica y 3) fase de control epidemiológico con los programas de inmunización masiva (Mosquera et al., 2014).

HISTORIA

En 1789 en la segunda edición de *A Treatise on diseases of Children* Michael Underwood describió la enfermedad como “debilidad de las extremidades inferiores en niños”. El no hizo referencia alguna, a los brotes infecciosos de esta enfermedad. Badham describió la parálisis aguda de poliomielitis en cuatro niños en 1835. En 1840 Heine, publicó una monografía, en donde la Poliomielitis se reconocía y definía como parálisis espinal infantil. Duchenne en 1855 y Charcot en 1870, localizaron la atrofia en los cuernos anteriores de la materia o médula gris espinal. Este descubrimiento dio origen al término; “Poliomielitis” que proviene del griego “*polios*” que significa “gris” y

“*myelos*” que significa “médula”. En 1875 Erb acuñó el término “Poliomielitis anterior aguda”. Medin fue el primero en reportar una epidemia de la enfermedad en 1890, después de una epidemia de 44 casos en Estocolmo en el verano de 1887. Varios investigadores registraron casos de polio utilizando métodos epidemiológicos básicos: Putnam en 1893, Caverly en 1894 en Los Estados Unidos y Wickman en 1905 en Suecia. En estudios epidemiológicos realizados entre 1910 y 1912 en Estados Unidos, Frost registró una amplia exposición a la poliomielitis, pero una baja incidencia de la enfermedad clínica. Durante la epidemia de 1916 en Estados Unidos, el papel preponderante de las personas asintomáticas en la distribución de la enfermedad, fue registrado por el Servicio Público de Salud (Public Health Service). Esta epidemia causó mucho pánico; más de 27000 personas fueron reportadas con parálisis y alrededor de 6000 perdieron la vida.

Los brotes de Polio gradualmente fueron más severos, más frecuentes y más ampliamente distribuidos en Europa y en Estados Unidos a principios del siglo XX.

En 1905, Wickman reconoció que la poliomielitis era una enfermedad infecciosa.

Landsteiner y Popper demostraron en 1909 que el agente etiológico de la poliomielitis era un virus filtrable, y lograron transmitir la enfermedad a un mono *Cynocephalus*, por inoculación intraperitoneal de tejido neuronal de humano.

Howe y Bodian, en 1930, consideraron la posibilidad, de que la vía de infección de la polio fuera de tipo oral (vía alimentaria).

La existencia de más de un tipo de poliovirus, la establecieron Burnet y Macnamara en 1931 y fue confirmada por Paul y Trask, mediante sus experimentos en monos. Los tres tipos de virus se denominaron cepas prototipo, Brunhilde y Mahoney (tipo 1), Lansing (tipo 2) y Leon y Saukett (tipo 3).

El concepto de Poliomielitis como una enfermedad entérica, se acuñó en 1932, cuando Paul y Trask encontraron el virus en heces, después de un periodo de semanas, tanto en pacientes como en personas saludables que estuvieron en contacto con ellos.

En 1936, Sabin y Olitsky, cultivaron poliovirus exitosamente *in vitro* mediante el uso de tejido neuronal de embrión humano.

Enders, Weller y Robbins, en 1949, tuvieron éxito al cultivar la cepa Lansing en cultivos de tejido no neuronal, descubriendo la capacidad de producir el virus de forma segura y en cantidad suficiente, lo que abrió el camino para la producción de vacunas virales. (Baicus, 2012).

MANEJO DE CASOS

Durante las primeras epidemias de polio, había una absoluta falta de desconocimiento para el manejo de esta enfermedad paralizante. Los casos agudos requerían de un pronto alivio al dolor, y los casos crónicos requerían de un proceso de rehabilitación. Uno de los primeros trabajos realizados en el manejo de los pacientes con polio fue el trabajo de la Hermana religiosa Elizabeth Kenny (enfermera australiana) al utilizar compresas calientes para aliviar los espasmos musculares, presentes en la etapa temprana de la enfermedad y desalentado la práctica en las extremidades afectadas con inmovilización prolongada. El primer centro dedicado a la rehabilitación de los pacientes con polio, se estableció en 1926, por el Presidente de los Estados Unidos, Franklin Theodore Roosevelt.

La máquina llamada pulmón de acero “Iron Lung”, fue uno de los inventos que se utilizaba en los pacientes con parálisis respiratoria para brindarles respiración asistida y prolongarles la vida.

La medicina moderna ha contribuido enormemente en el tratamiento de los pacientes con polio. Se han diseñado dispositivos ortopédicos para prevenir deformidades causadas por el desequilibrio muscular, sesiones de fisioterapia, cirugías como la de trasplante de tendón, para aliviar la contractura o el remplazo de la articulación. (Baicus, 2012).

LA POLIOMIELITIS EN MÉXICO

El caso de poliomiелitis más antiguo del que se tiene noticia en México, es el de un hombre que padeció el ataque en los primeros años de su infancia en el año de 1912, ya siendo adulto se le encontró una invalidez del sistema locomotor con características de parálisis segmentaria y cuyos antecedentes correspondían a un caso de poliomiелitis. La epidemia era ya conocida desde el año 1930, cuando se presentaron tres casos de poliomiелitis en San Luis Potosí. Para el año 1931, los casos aumentaron a seis, mismo número que en el año 1932, hubo intermitencia en el número de casos de 1933 a 1938, pero siempre presentes.

En mayo de 1944 se notificó a la Secretaría de Salubridad y Asistencia la existencia de un caso de poliomiелitis en la guardería infantil *Pensión Churubusco*, por lo que se llevó a cabo un estudio epidemiológico que permitió identificar dos casos de poliomiелitis, que se habían iniciado algunos días después del ingreso en la guardería de un niño recién llegado de Nueva York, donde se estaba desarrollando la más grande epidemia de polio observada hasta entonces (el 27 de junio de 1916 se registraron más de 9000 casos, de los cuales 2000 murieron) y en cuya ciudad el niño acababa de ser amigdalectomizado.

En el año de 1946 se detectó un incremento de la presencia de la enfermedad en el país, al registrarse 247 casos (122 en el Distrito Federal y 125 en el resto del territorio nacional). Por primera vez se conocieron las primeras manifestaciones epidémicas de la

parálisis, gracias a que se estudió el primer brote de la enfermedad en Orizaba, Veracruz, el 3 de mayo de 1946, que duró 10 años y aceleró grandes cambios en las políticas sanitarias implementadas y que implicó el control de esta enfermedad y más tarde su erradicación.

En 1949 se registró un brote epidémico, el cuál abarcó los estados de Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León, Chihuahua, Nayarit, Aguascalientes, y el Distrito Federal. En ese año se logró establecer el Comité Nacional para la Investigación, Control y Tratamiento de la poliomielitis, y se desarrolló un intenso control epidemiológico de detección, aislamiento y atención de los casos, invirtiendo especial esmero en la rehabilitación y la minimización de las secuelas (Gómez-De Lara & Rodríguez-Paz, 2021).

Antes del surgimiento de la vacuna, las medidas por parte de la Secretaría de Salubridad y Asistencia para enfrentar la poliomielitis de tipo paralizante fueron preventivas e higiénicas, como el aislar a los enfermos, no llevar a los niños menores de cinco años a aglomeraciones como; mercados, iglesias, cines, etc., y de inmediato se organizó una campaña para obtener donadores de sangre con el fin de elaborar gammaglobulina (proteína del suero sanguíneo que es portadora de anticuerpos). Se contó con 25 mil donadores y se obtuvieron 100 mil dosis, mismas que fueron aplicadas a niños considerados con alto riesgo en el Distrito Federal, Guadalajara, Puebla, Monterrey, Torreón, Toluca, Guanajuato, Cuernavaca, León, Pachuca y Chilpancingo. La campaña fue exitosa, pues únicamente se registraron 320 casos, casi la mitad de los 604 que hubo en 1951. Sin embargo la protección por la gammaglobulina fue temporal y los brotes de la poliomielitis se extendieron por toda la República.

La primera vacuna contra poliovirus que se utilizó en México fue la de poliovirus inactivada (IPV) de Salk en 1956 (desarrollada por Jonas Salk en 1952), que se aplicó hasta 1961. Las actividades de vacunación contra la poliomielitis iniciaron en el año

1956, aplicando la vacuna inyectable a las localidades urbanas que habían presentado la mayor incidencia de parálisis infantil: Coahuila, Chihuahua, Torreón, Ciudad Juárez, Durango, Matamoros, Aguascalientes, San Luis Potosí, Querétaro, Monterrey, Distrito Federal y Puebla. En total se aplicó vacuna Salk a 120 mil niños en las ciudades mencionadas, y otros 130 mil niños más fueron vacunados en poblaciones fronterizas y puertos, como Veracruz, Manzanillo, Campeche, Tijuana, Piedras Negras y Mérida. En total, se inmunizaron 250 mil niños, con lo que se empezó a lograr una disminución importante de la enfermedad (Gómez-De Lara & Rodríguez-Paz, 2021).

La vacuna trivalente de Sabin (tOPV) también se aplicó en México por primera vez en 1959, en un estudio realizado en Toluca: la vacuna se administró a 26 033 niños (86 % de todos los niños menores de 11 años) (Sabin *et al.*, 1960).

A partir de 1957, los estudios de inmunización con vacuna oral de poliovirus (OPV) en México, junto con la información de estudios en otros países, lograron demostrar la inocuidad de la vacuna en individuos inmunizados y sus contactos. Fue en 1963 que se promulgó el decreto presidencial para administrar tres dosis de OPV al nacimiento, a los 4 y a los 8 meses. Una vez que se demostró que los niños de 6 a 8 semanas de edad, mostraban una respuesta inmunológica adecuada a la OPV, independientemente de la presencia de un nivel moderado de anticuerpos maternos, la vacunación se recomendó a los 2, 4 y 6 meses (Esteve-Jaramillo & Richardson-López, 2012).

Con la creación del Programa Nacional de Inmunizaciones en 1973, se inició la aplicación masiva de la vacuna, donde se logró inmunizar a más de 70% de los niños menores de 5 años, con un subsecuente descenso de la tasa de morbilidad por polio. Las acciones permanentes fueron reforzadas en 1980 con las Semanas Nacionales de Vacunación contra la Poliomiелitis. Seis años después de iniciaron las acciones de erradicación de poliomiелitis, mediante la implementación de los Días Nacionales de

Vacunación (DNV) con el fin de interrumpir la circulación del virus salvaje, mediante la vacunación indiscriminada de los menores de 5 años (Esteve-Jaramillo & Richardson-López, 2012).

Entre los años 1986-1987, el poliovirus silvestre, serotipos I y II, dejó de circular en México, y al siguiente año, se generó la iniciativa de erradicación a nivel mundial. Mientras que en 1988 solamente se pudo aislar el serotipo III en los estados de Sonora, Sinaloa y Jalisco (González-Rubio, 2018).

En México, la poliomielitis paralítica se ha eliminado como resultado de la aplicación de múltiples dosis de la vacuna atenuada. Existen evidencias de la recepción masiva de 15 dosis de la vacuna trivalente en niños mexicanos a través de las acciones intensivas, como las semanas nacionales de salud y las habituales de vacunación. No se han informado casos de parálisis por cepas silvestres desde octubre de 1990 (Ruiz-Gómez *et al.*, 2007).

IPV

La IPV se producía mediante el cultivo del virus en células de riñón de mono e inactivación con formalina. En 1954 se realizó un ensayo clínico controlado utilizando IPV y un placebo en el que participaron 1.6 millones de niños de Canadá, Finlandia y los Estados Unidos. En abril de 1955, la IPV fue la vacuna de elección en los Estados Unidos, en donde se redujo la incidencia de poliomielitis paralítica de 13.9 casos por 100 000 en 1954 a 0.8 casos por 100 000 en 1961.

Las cepas utilizadas para la fabricación de la IPV son Mahoney (tipo 1), MEF-I (tipo 2) y Saukett (tipo 3), aunque en Suiza la cepa de elección para tipo 1 es la Brunenders. Poco tiempo después de la obtención de la licencia de IPV, se presentaron 260 casos

de poliomielitis causados por poliovirus de tipo 1 y 10 muertes, debido a una falla en el proceso de inactivación del virus en los Laboratorios Cutter, Berkeley; por lo que se realizaron cambios en el proceso de fabricación de la vacuna e introdujeron una segunda etapa de filtración, con el objetivo de eliminar los agregados de virus que se hubieran formado durante la inactivación, asimismo mejoraron las pruebas de control de calidad; posteriormente se incluyeron las etapas de concentración y purificación del virus, y gracias a la tecnología desarrollada por Van Wezel, quien cultivó células en suspensión mediante el uso de microacarreadores y utilizando grandes tanques de acero inoxidable se produjo la IPV potenciada eIPV, (enhanced IPV), la cual contiene 40, 8 y 32 unidades de antígeno D. La IPV obtuvo su licencia en Estados Unidos en 1987 (Baicus, 2012).

En base a las especificaciones de los productores, IPV se puede administrar por inyección subcutánea o intramuscular. Cuando se combina con otra vacuna con adyuvante, la inyección debe ser por vía intramuscular.

IPV es considerada una vacuna muy segura, ya sea que se administre sola o en combinación con otras. La IPV ha mostrado ser altamente efectiva tanto en países desarrollados como subdesarrollados, en estimular la respuesta de anticuerpos circulantes para poliovirus. La inmunogenicidad de IPV depende de la edad de la administración y del número de dosis, debido a la interferencia con los anticuerpos maternos. La IPV es menos efectiva que la OPV en inducir inmunidad en la mucosa intestinal en individuos que no han sido vacunados. Los niños vacunados con IPV que reciben dosis de refuerzo de OPV se infectan y excretan OPV en las heces. Sin embargo, con la IPV se reduce la cantidad y duración de la excreción viral en las heces, lo que podría contribuir a la reducción de la transmisión.

OPV

El desarrollo de la atenuación de poliovirus inició con pases sucesivos en ratas y ratones, y posteriormente en cultivo celular. La reducción de la virulencia de las cepas de poliovirus fue reportada en 1946 por Theiler quien realizó más de 50 pases de la cepa Lansing en ratas y ratones, y por Enders, Weller y Robins, quienes realizaron pases a la misma cepa pero en cultivos celulares.

Diversas cepas atenuadas se desarrollaron, de forma independiente, en los Estados Unidos por Koprowski (Wistar Institute, Filadelfia), Cox (Lederle Laboratories) y Sabin (The Children's Hospital Research Foundation).

En 1950, Koprowski inició sus experimentos con las cepas de poliovirus tipo 2, adaptada a roedores (TNtype II rodent-adapted strain) la cual fue administrada oralmente, a niños de diversas instituciones de los Estados Unidos; posteriormente Dane y colaboradores realizaron un pequeño ensayo clínico en Irlanda del Norte utilizando las cepas TN de poliovirus tipo 2 y la de poliovirus tipo 1 (SM type I) (Dane, et al., 1957) (Koprowsky, 1960).

Hacia 1959-1960, Koprowski y colaboradores administraron su vacuna atenuada de tipo 3 (W-Fox) y de tipo 1 (CHAT) a ocho millones de niños polacos y croatas, observando que no había un incremento de poliomiелitis en los niños vacunados, calculando un índice de seroconversión mayor al 90% y la eficacia epidemiológica fue de aproximadamente el 90% (Dane, et al., 1957) (Plotkin, 1962); Asimismo estas cepas se administraron en América central y del sur (Uruguay, Costa Rica, Colombia, Cuba, Haití, Nicaragua); las cepas de Koprowski-Cox también se le conocen como cepas Lederle, debido a que su fabricación se llevó a cabo en los laboratorios del mismo nombre (Cabasso, et al., 1960); en México, se aplicó esta vacuna atenuada a recién nacidos

como una preparación trivalente, la cual resultó ser efectiva como medida de inmunización contra la poliomielitis. Sin embargo, la muerte del padre de un niño vacunado y el aislamiento de poliovirus con características de las cepas Lederle, del tejido cerebral, fue la causa principal del retiro de las cepas. (Campillo-Sainz, 1962).

Por su parte, Sabin también desarrolló sus propias cepas atenuadas de administración oral, las cuales obtuvo mediante pases secuenciales *in vitro* e *in vivo* de las cepas silvestres. Las cepas virulentas P1/Mahoney/41, P2/P712/56 y P3/Leon/37 fueron la fuente de la obtención de las cepas atenuadas de Sabin: P1/Lsc,2ab, P2/P712,Ch,2ab y P3/Leon,12 a1b (Sabin, 1957) (Slonim, et al., 1962). De 1954 a 1957, Sabin trabajó con humanos voluntarios del Reformatorio Federal de Chillicothe, OH. Hacia 1956, la estrecha colaboración de Sabin con Chumakov tuvo como resultado la preparación de la vacuna atenuada con cepas Sabin en Moscú, y su aplicación a 15 200 000 personas en 1959 y a más de 77 478 800 personas en 1960 de la Unión Soviética, en presentación monovalente y trivalente; asimismo se estima que la vacuna producida en Moscú se administró a 13 153 500 personas de otros países como Hungría, Vietnam, Bulgaria, Checoslovaquia, República Democrática Alemana, República Democrática de Korea, Albania, República China y Japón (Chumakov, et al., 1961).

Sabin donó sus cepas vacunales a la OMS en 1972, lo que incrementó la disponibilidad de la vacuna en los países en desarrollo, demostrando que la erradicación de la polio podría ser factible a escala mundial. De 1977 a 1995, el porcentaje de niños del mundo que recibieron las tres dosis de OPV requerida en sus primeros años de vida incrementó de 5% a 80%, previniendo 400 000 casos de polio al año (Smith & Leggat, 2005).

La OPV es una vacuna relativamente barata y fácil de administrar (2 gotas (0.1 mL) por vía oral). OPV es altamente sensible al calor y debe mantenerse congelada durante su almacenamiento por largos periodos y posterior a su descongelación, debe mantenerse a temperaturas entre +2°C a +8°C por un periodo máximo de 6 meses. OPV induce inmunidad intestinal, lo que genera resistencia a la infección por poliovirus silvestre y bloquea de manera efectiva la transmisión, cuando se utiliza durante las campañas de vacunación masivas. OPV genera protección de larga duración contra la poliomielitis mediante la inmunidad humoral. Los virus vacunales de la OPV se diseminan e inmunizan a los contactos no vacunados, lo que incrementa el impacto de esta vacuna más allá de sus receptores. A pesar de las muchas ventajas que presenta, el uso de OPV presenta ciertos inconvenientes. El primero es la ocurrencia de casos (extremadamente raros) de poliomielitis paralítica asociada a la vacuna (VAPP, vaccine-associated paralytic poliomielitis), entre los vacunados con OPV y sus contactos. El segundo, es el surgimiento de poliovirus genéticamente divergentes, derivados de la vacuna (VDPV, vaccine-derived polioviruses), ya sea por la infección prolongada en personas con desórdenes de inmunodeficiencia primaria o por brotes en lugares con baja cobertura de vacunación (Burns *et al.*, 2014). Los virus atenuados de la vacuna de Sabin pueden, a través de una replicación prolongada en un individuo o en una comunidad, recuperar sus características de neurovirulencia y por ende su habilidad para causar parálisis, y la transmisibilidad de un poliovirus silvestre (WPV, wild poliovirus) y convertirse en VDPVs causantes de casos o brotes, de poliomielitis paralítica (Polio vaccines, 2014).

ERRADICACION

En 1988, cuando el número de casos de poliomielitis paralítica era mayor a 350,000 al año y con una transmisión de poliovirus silvestre reportada por más de 125 países, la OMS propuso la erradicación de la poliomielitis del mundo a todos los estados miembros, así que la Asamblea Mundial de Salud (World Health Assembly) estableció la resolución para la erradicación de la poliomielitis para el año 2000, creándose la Iniciativa para la erradicación global de la polio (GPEI, Global Polio Eradication Initiative), organismo que elaboró un Plan estratégico que estableció las actividades requeridas para la erradicación de la polio, la certificación por regiones, la fase de eliminación de OPV y la fase de post-erradicación (World Health Organization, Sep 2015).

Para incrementar el impacto de las actividades suplementarias de vacunación y disminuir la posibilidad de reversión de cepas de poliovirus vacunales capaces de causar brotes de poliomielitis, el Comité Asesor para la Erradicación de la Polio (AACPE) recomendó a la OMS en 2004, acelerar el proceso regulatorio de las Vacunas Antipoliomielíticas orales Monovalentes (mOPV): tipo 1 (mOPV1), tipo 2 (mOPV2) y tipo 3 (mOPV3), y una Vacuna Antipoliomielítica oral Bivalente (bOPV) que contenga los poliovirus tipos 1 y 3. (World Health Organization, 2009). (World Health Organization, 2010).

El reto logístico del retiro coordinado de la tOPV del mundo y su reemplazo con la vacuna bivalente (bOPV, bivalent Oral Polio Vaccine) la cual, únicamente contiene los tipos de poliovirus 1 y 3 planeado para 2016 y el cese de la aplicación de poliovirus vacunal de tipo 2, disminuiría el riesgo de reversión del virus vacunal y permitiría la eliminación completa de la transmisión de poliovirus vacunal causantes de brotes (World Health Organization, 2015) (World Health Organization, 2014).

INSTITUTO NACIONAL DE VIROLOGIA-INV

En 1972 se inició en México, en el Instituto Nacional de Virología (INV), la producción de Vacuna Antipoliomielítica Trivalente Oral (tOPV) con las cepas Sabin (virus atenuados) serotipos 1, 2 y 3, utilizando cultivos celulares de riñón de mono, los cuales fueron sustituidos por cultivos de células Vero en el año 2001. Desde entonces, los 67 lotes de tOPV producidos fueron aprobados satisfactoriamente por la Autoridad Regulatoria Nacional (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, COFEPRIS), y los aproximadamente 335 millones de dosis de vacuna se aplicaron de forma segura y efectiva en nuestro país.

El Instituto Nacional de Virología posee una gran experiencia técnica en la producción, el control y aseguramiento de la calidad de la tOPV. Con su producción, la demanda Nacional de este biológico ha sido cubierta satisfactoriamente, gracias a lo cual se contribuyó a la eliminación de la poliomielitis de México desde 1990, y de la región de las Américas desde 1994 (World Health Organization, 2014).

JUSTIFICACIÓN

Tomando como base, la iniciativa para la erradicación global de la polio (GPEI Global Polio Eradication Initiative) (World Health Organization, 2015); se establece la implementación de la bOPV (Vacuna antipoliomielítica oral bivalente) en sustitución de la tOPV (Vacuna antipoliomielítica oral trivalente) como parte de esta estrategia, y será el antecedente para el cese definitivo del uso de cualquier OPV (Vacuna antipoliomielítica oral) de inmunización rutinaria.

Posterior a la erradicación de la polio en el mundo, la OMS estableció que se requerirá de una reserva de vacuna para combatir los potenciales brotes de poliomielitis causados por 1).- liberación accidental o intencional (p. ej. Bioterrorismo) de poliovirus, 2).- circulación continua y reversión a la neurovirulencia de cepas de poliovirus derivadas de la vacuna, o 3).- replicación prolongada de poliovirus en personas con inmunodeficiencia.

El Instituto Nacional de Virología (INV) único productor de tOPV en México, se planteó el objetivo de producir bOPV segura y efectiva, para tenerla disponible y poder utilizarla en México en el momento determinado por la autoridad sanitaria del país.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer las condiciones para la fabricación de bOPV, en base a la plataforma industrial que se tiene para la fabricación de tOPV, para que, de acuerdo a las recomendaciones de la OMS, una vez que se suspenda el uso de la tOPV, sea utilizada tanto en los esquemas de inmunización rutinaria como en las actividades de inmunización suplementaria durante la Etapa Final de la Erradicación de la Polio en México.

Objetivos Específicos

- Formular un lote experimental de bOPV producido con cumplimiento de Buenas Prácticas de Fabricación BPF, para evaluar sus parámetros de calidad, así como su estabilidad a diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento.
- Formular y envasar lotes piloto de bOPV con cumplimiento de Buenas Prácticas de Fabricación BPF, los cuales serán evaluados en cuanto a parámetros de calidad tanto por la Unidad de Calidad del INV como por la COFEPRIS.
- Formular y envasar un lote de transferencia de vacuna bOPV en las instalaciones de la planta de producción del INV con la finalidad de evaluar parámetros críticos y atributos de calidad con BPF.

METODOLOGIA

Cabe mencionar que el Instituto Nacional de Virología fabricó sus vacunas en áreas dedicadas y clasificadas que cumplen con la *NOM-059 “Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos”*, normas Internacionales como la *ISO 1464* y series de Reporte Técnico de OMS No. 957 (Technical Report Series No. 957, 2010 “*Good Manufacturing Practices for sterile pharmaceutical product*”) y bajo las cuales se realizó el diseño y la construcción.

SEMILLAS VIRALES

La producción de la vacuna antipoliomielítica se basa en un sistema de Lote Semilla; la Semilla Viral de Trabajo (SVT) de poliovirus tipo 1 ó 3, empleadas para la producción de los graneles monovalentes que se utilizaron en la formulación de la Vacuna Antipoliomielítica Bivalente oral (bOPV), se prepararon a partir de un solo pase de las Semillas Virales Maestras (SVM) de cada tipo, mismas que fueron proporcionadas por la OMS.

El Instituto Nacional de Virología cuenta con Semillas Virales autorizadas para la producción de vacunas, las cuales fueron proporcionadas por OMS:

- Poliovirus serotipo 1
- Poliovirus serotipo 3

Para la fabricación de la bOPV se emplearon graneles monovalentes de poliovirus 1 y 3; previo a la producción de los graneles monovalentes de poliovirus tipo 1 y 3, se debió

contar con el Banco Celular de Trabajo (BCT) caracterizado y la semilla viral de poliovirus (SV). (Apéndice).

GRANELES MONOVALENTES DE POLIOVIRUS TIPO 1 Y 3

Los graneles monovalentes de Poliovirus tipo 1 ó 3 se prepararon mezclando y clarificando las cosechas individuales aprobadas de un mismo tipo de Poliovirus. La cosecha individual es una suspensión homogénea que contiene partículas virales de un mismo tipo de Poliovirus y detritos celulares, obtenidos en un ciclo de producción bajo las mismas condiciones de operación.

Una vez que se contó con los dos graneles monovalentes aprobados (tipo 1 y 3), se realizaron los cálculos necesarios para la formulación, en función de los títulos virales de los graneles monovalentes de polio tipo 1 y 3, y en cumplimiento de las especificaciones de la OMS y de la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021). Cada uno de los graneles monovalentes de poliovirus tipo 1 y 3 se descongelaron y se mezclaron con las cantidades calculadas de estabilizador y excipiente en un tanque mezclador provisto de sistema de enfriamiento y agitación.

Ya que se tuvo la formulación homogénea de la vacuna granel final, en condiciones de refrigeración, se procedió al envase aséptico de los tubos goteros con 2 mL que representan 20 dosis cada uno.

BANCOS CELULARES

Estos bancos fueron evaluados y caracterizados de acuerdo con las Recomendaciones para la Evaluación de Cultivos Celulares Animales como Substratos para la Fabricación de Productos Biológicamente Medicinales y para la Caracterización de Bancos Celulares.

Los cultivos celulares de producción se prepararon en condiciones asépticas en áreas en donde no se manejaron otras células. Para el crecimiento de las células, el medio de mantenimiento usado para la multiplicación del virus no contenía suero (SFB). El medio de cultivo contenía un indicador de pH, el rojo de fenol. Durante la producción del virus vacunal, el sustrato estaba libre de antibióticos. (Apendice).

DESARROLLO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL

El desarrollo de la Vacuna Antipoliomielítica Bivalente (bOPV) se diseñó en tres etapas:

- Etapa experimental.
- Etapa piloto.
- Transferencia Tecnológica.

DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LA FORMULACIÓN DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL

El lote de bOPV experimental se produjo en la planta de producción del INV; para la formulación del lote experimental de bOPV se utilizaron lotes de graneles de

poliovirus tipo 1 y tipo 3.

La formulación utilizada para el lote experimental de bOPV, denominado VeBi1+301, se determinó en base a la termoestabilidad y potencia reportada para poliovirus vacunales (Cáceres & Sutter, 2001), (Jacob, *et al.*, 1976), (Patriarca, *et al.*, 1991) y a los estudios de estabilidad de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ de la tOPV producida en el INV.

FASE PILOTO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL

- Se fabricaron lotes piloto de consistencia de Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral con Buenas Prácticas de Fabricación, utilizando la misma formulación del lote experimental código VeBi1+301.
- Se validaron los procesos de formulación, envase y acondicionamiento, durante la fabricación de los lotes piloto de Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral.

Para la formulación de Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral se realizaron los cálculos matemáticos para un volumen de 130 L (en base a la formulación utilizada en el lote experimental código VeBi1+301), volumen correspondiente a la fabricación de cada uno de los cinco lotes piloto (VeB01, VeB02, VeB03, VeB04 y VeB05), para el cumplimiento con las especificaciones de la OMS y de la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021).

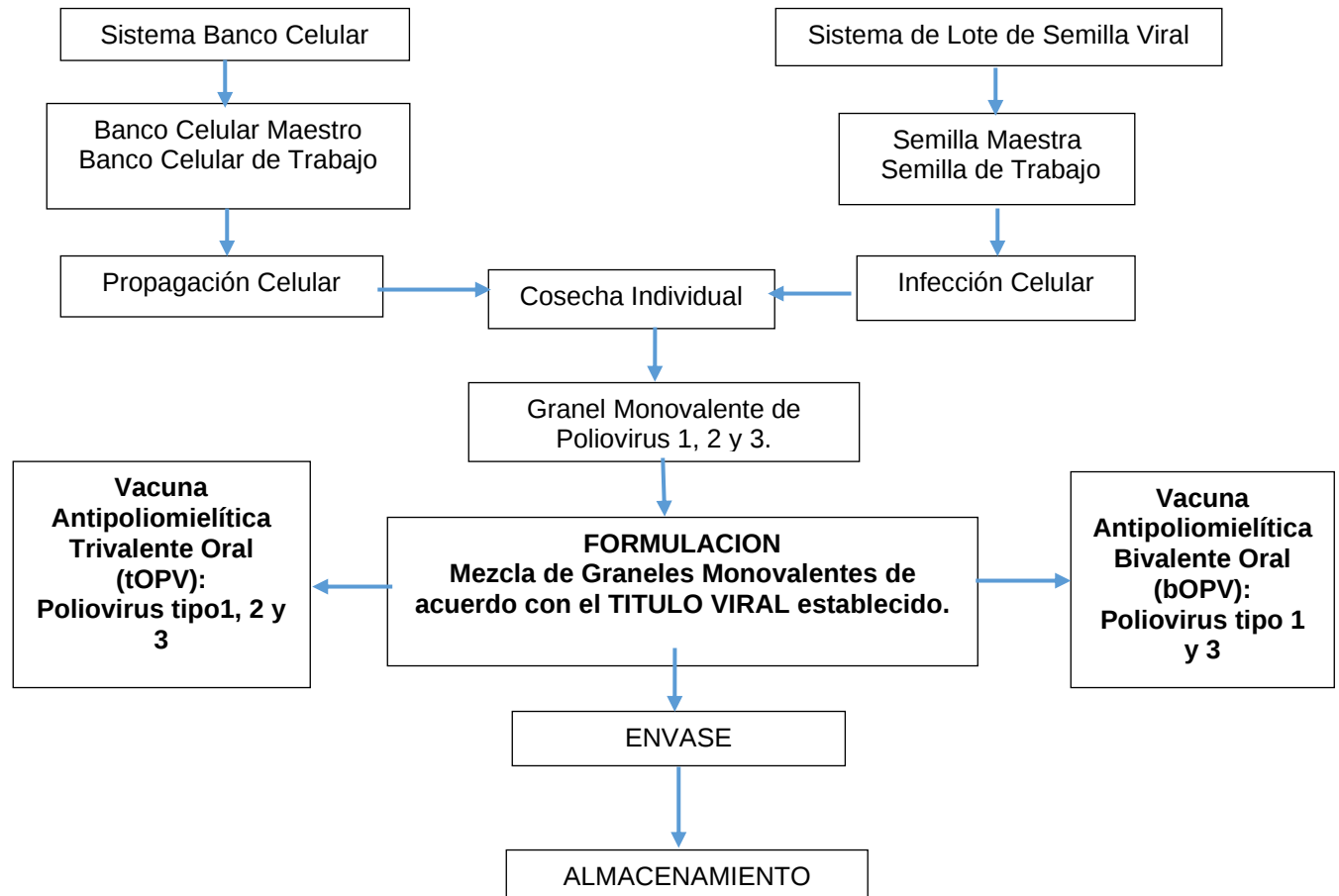
FASE DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

Con base a los resultados de los lotes experimental y piloto de la vacuna bOPV, así como los resultados del ensayo clínico, aunado a los datos históricos de los resultados de estabilidad de los últimos 9 lotes fabricados de la vacuna tOPV, se realizó la formulación y envase de un lote de bOPV denominado Lote de Transferencia Tecnológica (VeB06) para verificar los parámetros críticos de operación y los atributos de calidad, a través de un protocolo de validación, con el objetivo de demostrar que el producto es homogéneo y cumple con especificaciones de diseño, con la finalidad de escalar este proceso a una plataforma industrial.

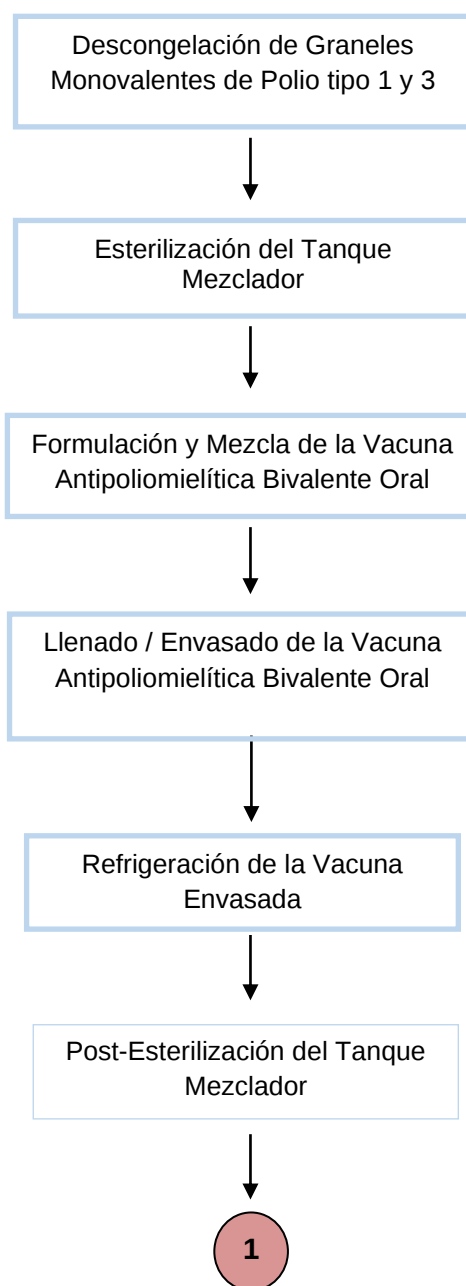
El lote de transferencia se diseñó tomando en consideración el análisis de riesgo y mapeo de procesos, para determinar los parámetros críticos a evaluar durante la validación de los procesos de formulación, mezcla y envase de bOPV lote VeB06.

Al igual que el lote experimental y los lotes piloto, este lote de Transferencia Tecnológica (VeB06) no fue comercializado.

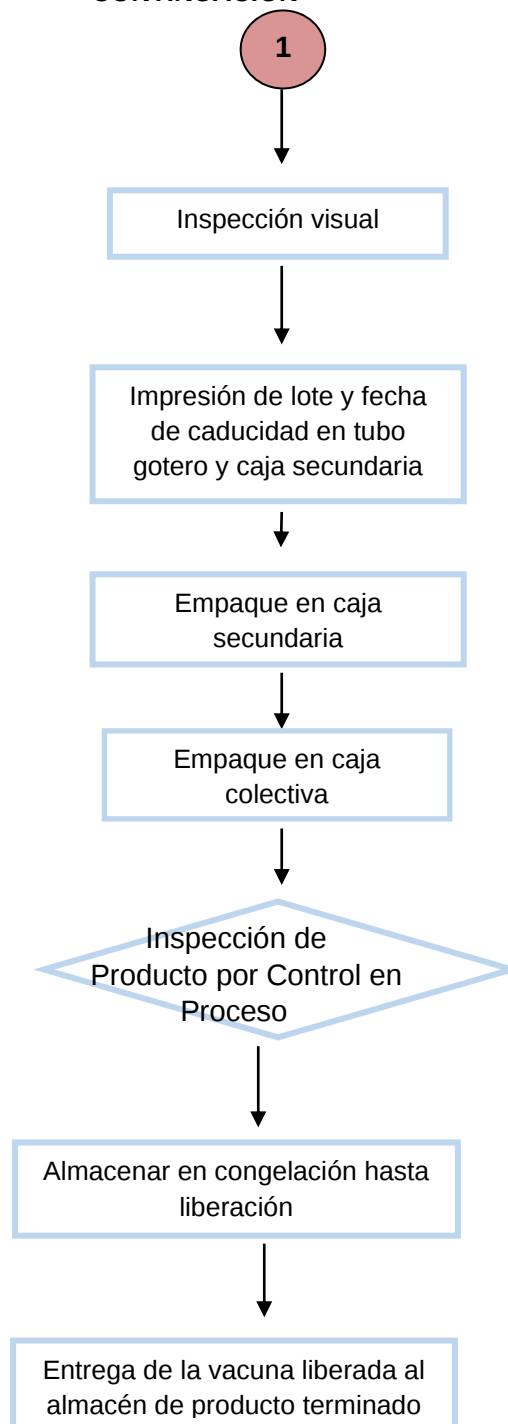
**DIAGRAMA DE FLUJO DE LA FABRICACIÓN DE LA VACUNA
ANTIPOLIOMIELÍTICA**



**DIAGRAMA DE FLUJO DE LA FORMULACIÓN, MEZCLA, LLENADO Y
ACONDICIONAMIENTO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL**



CONTINUACIÓN



RESULTADOS

Cabe mencionar que el INV fabricó sus vacunas en áreas dedicadas y clasificadas que cumplen con la *NOM-059 “Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos”*, normas Internacionales como la *ISO 1464* y series de Reporte Técnico de OMS No. 957 (Technical Report Series No. 957, 2010 “*Good Manufacturing Practices for sterile pharmaceutical product*”) y bajo las cuales se realizó el diseño y la construcción.

FASE EXPERIMENTAL DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL

Tomando en consideración la composición y especificaciones de la Vacuna Antipoliomielítica Oral, para los serotipos 1 y 3, se produjo un lote de bOPV experimental, en la planta de producción del INV en cumplimiento con BPF.

La formulación utilizada para el lote experimental de bOPV, denominado VeBi1+301, se determinó en base a la termoestabilidad y potencia reportada para poliovirus vacunales.

El lote VeBi1+301 constó de 1,520 goteros (30,400 dosis).

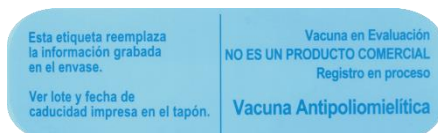
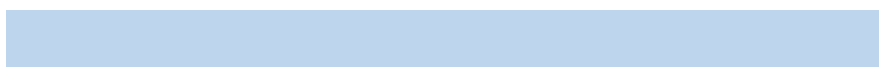
Los reportes de la Gerencia de Control de Calidad de Vacunas Virales, del lote experimental de vacuna bOPV código VeBi1+301, se compararon con todas las especificaciones establecidas por la FEUM para la bOPV, en referencia a los serotipos 1 y 3 (descripción, identidad, esterilidad, potencia y estabilidad térmica).

TABLA 1. Especificaciones establecidas por la FEUM para bOPV aplicadas al lote experimental VeBi1+301 (FEUM 13^a. Ed., 2021).

CARACTERÍSTICA	LOTE VeBi1+301	ESPECIFICACIÓN
ESTERILIDAD	CUMPLE	Ausencia de bacterias y hongos
DESCRIPCIÓN	CUMPLE	Es una preparación líquida, transparente, de color naranja pálido a rojizo, libre de partículas extrañas visibles.
IDENTIDAD VIRAL	CUMPLE	Positiva para poliovirus tipos 1 y 3 por neutralización.
POTENCIA (EN LOG ₁₀ DICC ₅₀ /DOSIS)	TIPO 1: CUMPLE TIPO 3: CUMPLE	Tipo 1: al menos 6.00 log ₁₀ DICC ₅₀ /dosis Tipo 3: al menos 5.78 log ₁₀ DICC ₅₀ /dosis
ESTABILIDAD TÉRMICA	CUMPLE	La diferencia en la concentración de virus total de las muestras almacenadas a 4°C y a 37°C no debe ser mayor de 0.6 log ₁₀ DICC ₅₀ por dosis humana
VOLUMEN	CUMPLE	Mayor o igual a lo indicado en el marbete. (No menos de 2.0 mL)
HERMETICIDAD	CUMPLE	No presenta fuga
pH	CUMPLE	6.0 a 7.5
ESTABILIDAD 5°C ± 3°C	CUMPLE: 6 MESES	
ESTABILIDAD -25°C A - 35°C	CUMPLE: 24 MESES	

Para el llenado y acondicionamiento de la vacuna antipoliomielítica bivalente VeBi1+301 se utilizó el envase primario [gotero de 2 mL (20 dosis)] utilizado para la tOPV, por lo que para diferenciarlas, a la bOPV se le colocó una etiqueta adherible en el cuerpo del envase con características de resistencia a las condiciones de almacenamiento (5°C±3°C y -25°C).

FIGURA 1. Etiqueta utilizada para identificar los goteros de bOPV se le colocó en el cuerpo del envase gotero y envase secundario de bOPV.



Etiqueta del envase
primario de la bOPV



bOPV en envase
primario con etiqueta



Envase secundario de
bOPV

FASE PILOTO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA BIVALENTE ORAL

Para la formulación de Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral se realizaron los cálculos matemáticos para un volumen de 130 L (en base a la formulación utilizada en el lote experimental código VeBi1+301), volumen correspondiente a la fabricación de cada uno de los cinco lotes piloto (VeB01, VeB02, VeB03, VeB04 y VeB05), para el cumplimiento con las especificaciones de la OMS y de la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021).

Los primeros tres lotes piloto fueron preparados para verificar consistencia del proceso a través del control y monitoreo de parámetros críticos; utilizando los parámetros de operación (mismos que se han utilizado en la producción de tOPV), se elaboró el protocolo de validación correspondiente para fines de registro de producto.

Los lotes VeB01, VeB02, VeB03, VeB04 y VeB05 de Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral tipos 1 y 3 se analizaron en base a los requisitos de calidad nacionales de acuerdo con la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021), señalados para la Vacuna Antipoliomielítica Oral, en los serotipos 1 y 3, así como las recomendaciones de la OMS, descritas en las series de reportes técnicos (TRS 904, 2002 y TRS 980, 2014).

El lote VeB05 se utilizó para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral tipos 1 y 3 por medio de un estudio clínico, para con ello solicitar el registro sanitario ante la COFEPRIS.

TABLA 2. Características de Calidad de los cinco lotes piloto de Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral.

CARACTERÍSTICA	LOTE				
	VeB01	VeB02	VeB03	VeB04	VeB05
ESTERILIDAD	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
DESCRIPCIÓN	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
IDENTIDAD	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
POTENCIA	TIPO 1: CUMPLE TIPO 3: CUMPLE	TIPO 1: CUMPLE TIPO 3: CUMPLE	TIPO 1: CUMPLE TIPO 3: CUMPLE	TIPO 1: CUMPLE TIPO 3: CUMPLE	TIPO 1: CUMPLE TIPO 3: CUMPLE
ESTABILIDAD TÉRMICA	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
VOLUMEN	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
HERMETICIDAD	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
pH	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
ESTABILIDAD 5°C ± 3°C	CUMPLE: 7 MESES	CUMPLE: 7 MESES	CUMPLE: 7 MESES	CUMPLE: 7 MESES	CUMPLE: 7 MESES
ESTABILIDAD -25°C A - 35°C	CUMPLE: 24 MESES	CUMPLE: 24 MESES	CUMPLE: 24 MESES	CUMPLE: 24 MESES	CUMPLE: 24 MESES

TABLA 3. Características de calidad de bOPV (producto terminado) de acuerdo con la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021) señalados para la Vacuna Antipoliomielítica Oral.

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN Y LÍMITES		
DESCRIPCIÓN	Es una preparación líquida, transparente, de color naranja pálido a rojizo, libre de partículas extrañas visibles.		
ESTERILIDAD	Ausencia de bacterias y hongos		
IDENTIDAD	Positiva para poliovirus tipos 1 y 3 por neutralización.		
POTENCIA	Tipo 1	al menos 10 ^{6.00} DICC ₅₀	por dosis de 0.1 ml

	Tipo 3	al menos $10^{5.78}$ DICC ₅₀	por dosis de 0.1 ml
ESTABILIDAD TÉRMICA	La diferencia en la concentración de virus total de las muestras almacenadas a 4°C y a 37°C no debe ser mayor de 0.6 log ₁₀ DICC ₅₀ por dosis humana		
VOLUMEN	Mayor o igual a lo indicado en el marbete. (No menos de 2.0 mL)		
pH	6.0 a 7.5		

FASE DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

Con base a los resultados de los lotes experimental y piloto de la vacuna bOPV, así como los resultados del ensayo clínico con el que se confirmó la inmunogenicidad y seguridad de la vacuna bivalente, aunado a los datos históricos de los resultados de estabilidad de los últimos 9 lotes fabricados de la vacuna tOPV, se realizó la formulación y envase de un lote de bOPV denominado Lote de Transferencia Tecnológica (VeB06) para verificar los parámetros críticos de operación y los atributos de calidad, a través de un protocolo de validación, con el objetivo de demostrar que el producto es homogéneo y cumple con especificaciones de diseño, con la finalidad de escalar este proceso a una plataforma industrial.

El lote de transferencia se diseñó tomando en consideración el análisis de riesgo y mapeo de procesos, para determinar los parámetros críticos a evaluar durante la validación de los procesos de formulación, mezcla y envase de bOPV lote VeB06.

TABLA 4. Características de calidad del Lote de Transferencia Tecnológica (**VeB06**) bOPV (producto terminado) y especificaciones de la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021).

CARACTERÍSTICA	LOTE	ESPECIFICACIÓN FEUM
	VeB06	
ESTERILIDAD	CUMPLE	Ausencia de bacterias y hongos
DESCRIPCIÓN	CUMPLE	Es una preparación líquida, transparente, de color naranja pálido a rojizo, libre de partículas extrañas visibles.
IDENTIDAD	CUMPLE	Positiva para poliovirus tipos 1 y 3 por neutralización.
POTENCIA	TIPO 1: CUMPLE TIPO 3: CUMPLE	Tipo 1: al menos 6.00 log ₁₀ DICC ₅₀ /dosis Tipo 3: al menos 5.78 log ₁₀ DICC ₅₀ /dosis
ESTABILIDAD TÉRMICA	CUMPLE	La diferencia en la concentración de virus total de las muestras almacenadas a 4°C y a 37°C no debe ser mayor de 0.6 log ₁₀ DICC ₅₀ por dosis humana
VOLUMEN	CUMPLE	Mayor o igual a lo indicado en el marbete. (No menos de 2.0 mL)
HERMETICIDAD	CUMPLE	No presenta fuga
pH	CUMPLE	6.0 a 7.5
ESTABILIDAD 5°C ± 3°C	CUMPLE: 7 MESES	
ESTABILIDAD -25°C A - 35°C	CUMPLE: 24 MESES	

CONCLUSIONES

El lote experimental VeBi1+301 cumplió satisfactoriamente con todas las especificaciones establecidas por la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021), señaladas para la Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral, en los serotipos 1 y 3 (descripción, identidad, esterilidad, potencia y estabilidad térmica).

Los lotes piloto VeB01, VeB02, VeB03, VeB04 y VeB05 de Vacuna Antipoliomielítica Bivalente Oral serotipos 1 y 3 cumplieron satisfactoriamente los requisitos de calidad nacionales de acuerdo con la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021), así como las recomendaciones de la OMS, descritas en TRS 904, 2002 y TRS 980, 2014.

Con base a los resultados de los lotes experimental y piloto de la vacuna bOPV, así como los resultados del ensayo clínico se confirmó la inmunogenicidad y seguridad de la vacuna bivalente y se establecieron las condiciones para la fabricación de bOPV, en base a la plataforma industrial de tOPV.

La transferencia de tecnología demostró que el producto es homogéneo y cumple con especificaciones de diseño, ya que se determinaron los parámetros críticos y se validaron los procesos de formulación, mezcla y envase mediante la producción de un Lote de Transferencia Tecnológica (VeB06) en cumplimiento de especificaciones establecidas por la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021).

APENDICE

LOTE SEMILLA DE VIRUS

Las semillas virales más comúnmente utilizadas para la producción de vacuna antipoliomielítica oral derivan de las cepas originales de Sabin. Las semillas maestras han sido denominadas SO+1, un pase adicional a partir de estas permite obtener las semillas de trabajo (SO+2) y la producción de vacuna implicaría un pase más (SO+3). Para el caso de poliovirus tipo 3 pueden utilizarse semillas de virus recuperados a partir de RNA infeccioso a nivel de pase SO+5, que han sido denominadas RSO1 para diferenciarse del SO tipo 3. Las cepas de poliovirus que se usan en la producción serán identificadas mediante registros históricos que incluyan el origen y las manipulaciones subsecuentes. Los lotes de semilla de trabajo se preparan en cantidades grandes mediante un solo pase de la semilla maestra. Los lotes de virus semilla se almacenan a temperaturas inferiores o iguales a 60°C bajo cero. Las semillas virales cumplirán con los siguientes requisitos:

IDENTIDAD: Cada lote de semilla viral de trabajo será identificado como el serotipo específico de poliovirus usando anticuerpos tipo específicos.

PRUEBA DE NEUROVIRULENCIA: Cada lote de semilla maestra o de trabajo, cumplirá con la prueba de neurovirulencia que se aplica a la vacuna antipoliomielítica oral. La prueba puede realizarse en ratón transgénico (TgmNVT) cuando la prueba ha sido autorizada para liberación de lotes de vacuna, cuando se trata de la misma semilla viral maestra y cuando no existen cambios en el proceso de producción de la semilla viral de trabajo.

AGENTES EXTRAÑOS. Cumple los requisitos. Las semillas virales de trabajo estarán libres de secuencias de ADN de virus SV40 utilizando técnicas de amplificación de ácido nucleico.

MARCADORES GENÉTICOS. Cada lote de semilla viral de trabajo se evaluará para demostrar la consistencia de sus características, ya sea a través de pruebas como rct40 que se describe en el granel monovalente o las *pruebas de análisis de mutantes mediante el uso de enzimas de restricción y PCR* (MAPREC). Por lo menos tres graneles consecutivos preparados de la semilla viral cumplirán con estos requisitos (FEUM 13^a. Ed., 2021).

COSECHAS INDIVIDUALES

Después de la inoculación de los cultivos celulares con la semilla viral de trabajo, todos los cultivos son incubados en las condiciones de temperatura establecida y no variará mas de 0.5°C. Cada fabricante define las condiciones de producción: pH, multiplicidad de infección, densidad celular y tiempo de incubación.

La suspensión viral se cosecha no después de cuatro días posteriores a la inoculación.

Las muestras para pruebas se tomarán inmediatamente durante la cosecha.

IDENTIDAD. Cada cosecha será identificada utilizando anticuerpos específicos por métodos inmunológicos, o por métodos moleculares, como secuenciación masiva.

TITULACIÓN DEL CONTENIDO VIRAL. Cumple con las especificaciones del fabricante.

AGENTES EXTRAÑOS EN COSECHAS INDIVIDUALES NEUTRALIZADAS. Se utilizarán por lo menos 50 mL o el equivalente a 500 dosis de la vacuna final, lo que sea mayor. Un volumen de por lo menos 10 mL será utilizado para las pruebas de neutralización en cada prueba.

La suspensión neutralizada será inoculada en botellas con cultivos celulares, de tal forma que la dilución resultante en el medio de dilución no exceda de 1:4. Incluir botellas de cultivo control utilizando únicamente el suero utilizado en la neutralización en el medio de cultivo.

No más del 20% de los cultivos celulares pueden desecharse por razones no específicas.

ESTERILIDAD. Un volumen de por lo menos 10 mL de cada cosecha individual se utilizará para demostrar la ausencia de bacterias, hongos y micoplasmas.

CONSISTENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS VIRALES. Se deberá demostrar la consistencia de las características virales, por las pruebas rct40 o MAPREC. (FEUM 13^a. Ed., 2021).

GRANEL MONOVALENTE

Se prepara mezclando las cosechas individuales aprobadas del mismo tipo de poliovirus. El granel monovalente que provenga de líneas celulares continuas puede ser purificado. Cada granel se pasa a través de un filtro clarificador.

Solo el granel monovalente que cumpla con los siguientes requisitos, podrá ser utilizado para preparar el granel final de la vacuna.

IDENTIDAD. Cada granel monovalente estará identificado como un tipo de poliovirus, usando anticuerpos específicos o por algún método molecular aprobado.

CONCENTRACIÓN DE VIRUS. Usar el método descrito para titular la vacuna.

Esta concentración se toma como base para formular la vacuna final a granel, calcular la cantidad de virus que se va a usar en la prueba de neurovirulencia y para establecer y vigilar la consistencia de la producción.

MARCADORES GENÉTICOS. Puede aplicarse cualquiera de los dos métodos siguientes:

rct40. Determinar la capacidad de multiplicación del poliovirus del granel monovalente a 36 y 40 °C en comparación con el lote semilla de virus o con una preparación de referencia apropiada del mismo tipo de poliovirus rct40 positiva y rct40 negativa.

La variación en las temperaturas de incubación no será mayor a $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$. El granel monovalente pasa la prueba si el título que se determina en ambas preparaciones, la muestra en prueba y la referencia a 36°C es por lo menos 5.0 logaritmos mayor que el que se determine a 40°C. Si el título a 40°C es tan bajo que no se pueda establecer una comparación válida, se puede usar una temperatura entre 39 y 39.5 °C, a dicha temperatura la reducción en el título de la preparación de referencia será del orden de 3.0 a 5.0 logaritmos de su valor a 36 °C. La reducción mínima aceptable se determina para cada cepa de virus a una temperatura determinada. Si los títulos obtenidos para una o más preparaciones de referencia no corresponden a los esperados, la prueba deberá repetirse.

MAPREC. Puede utilizarse para establecer la consistencia de la producción una vez que se ha validado y se han establecido los valores normales para el estándar, así como los criterios de aceptación y rechazo. Los resultados se expresarán en relación con el estándar internacional.

Para el tipo 3 (472-C), el lote no tendrá más del 1% de mutantes. Para los tipos 2 y 3 los límites de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Si el granel falla la prueba de MAPREC no podrá ser utilizado para producción y será necesario revisar el proceso de producción.

NEUROVIRULENCIA. Cada granel monovalente cumple con la prueba de neurovirulencia para vacuna antipoliomielítica oral.

Si la producción de vacuna ha demostrado consistencia de calidad en la prueba de neurovirulencia en mono, podrá utilizarse como alternativa la prueba en ratón transgénico.

ESTERILIDAD. Cumple los requisitos.

Los graneles monovalentes de Poliovirus tipo 1 ó 3 se preparan mezclando y clarificando las cosechas individuales aprobadas de un mismo tipo de Poliovirus. La cosecha individual es una suspensión homogénea que contiene partículas virales de un mismo tipo de Poliovirus y detritos celulares, obtenidos en un ciclo de producción bajo las mismas condiciones de operación.

Una vez que se cuenta con los dos graneles monovalentes aprobados (tipo 1 y 3), se realizan los cálculos necesarios para la formulación, en función de los títulos virales de los graneles monovalentes de polio tipo 1 y 3, y en cumplimiento de las especificaciones de la OMS y de la FEUM (FEUM 13^a. Ed., 2021). Cada uno de los graneles monovalentes de poliovirus tipo 1 y 3 se descongelan y se mezclan con las cantidades calculadas de estabilizador y excipiente en un tanque mezclador provisto de sistema de enfriamiento y agitación (FEUM 13^a. Ed., 2021).

PROPAGACIÓN CELULAR

Los cultivos celulares de producción se preparan en condiciones asépticas en áreas en donde no se manejen otras células. Para el crecimiento de las células se puede utilizar un suero animal (no humano) sin embargo el medio de mantenimiento usado para la multiplicación del virus no contendrá suero. El medio de cultivo puede contener un indicador de pH como el rojo de fenol y durante el crecimiento de las células se pueden

utilizar antibióticos aprobados. Durante la producción del virus vacunal, el sustrato estará libre de antibióticos (FEUM 13^a. Ed., 2021).

SUSTRATO PARA LA PROPAGACIÓN DEL VIRUS.

El virus se propaga en: células diploides humanas, líneas celulares continuas o cultivos primarios de riñón de mono (incluyendo subcultivos a partir de los cultivos primarios de células renales de mono).

Cultivos de células diploides o líneas celulares continuas utilizadas como sustrato de propagación de virus. Los bancos celulares cumplirán con los requisitos establecidos en la farmacopea (FEUM 13^a. Ed., 2021).

Si se usa suero de origen animal para propagar las células, se demostrará que está libre de contaminación por bacterias, hongos, micoplasmas, virus infecciosos, fagos y endotoxinas. El suero cumplirá con los requisitos relacionados con disminución de riesgo de transmisión de encefalopatías espongiformes. No se utilizará penicilina ni otros beta-lactámicos en ninguna etapa de producción.

La tripsina para preparar cultivos celulares deberá estar libre de bacteria, hongos, micoplasma y virus, especialmente virus bovinos o parvovirus porcinos (FEUM 13^a. Ed., 2021).

LINEA CELULAR VERO

ANTECEDENTES

La línea celular Vero se origina a partir de células de Riñón de Mono Verde Africano adulto (*Cercopithecus aethiops*) y fue establecida el 27 de marzo de 1962, por Y. Yasura y Y. Kawakita en la Universidad Chiba Japón, esta línea celular fue enviada a la *American Type Culture Collection* (ATCC) en pase 113 y ha sido utilizada en diversos estudios ya que es susceptible a virus de la poliomielitis, SV-40, SV-5, sarampión, arbovirus, reovirus, rubéola, adenovirus de simios, virus de influenza, virus sincicial respiratorio, vaccinia, estudios de replicación viral y ensayos de placa.

DESCRIPCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL BANCO CELULAR MAESTRO

La producción del BCM se inicia con la descongelación de un criotubo de semilla original de células Vero ATCC, con el que se obtiene una suspensión celular con medio de cultivo de crecimiento, dicha suspensión se deposita en una botella que se incuba por 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de las 24 horas se realiza un cambio de medio de cultivo y se incuba hasta obtener un 100% de confluencia celular. Posteriormente se realiza una serie de subcultivos hasta llegar al número de pase deseado, y así obtener una suspensión celular que se envasa en criotubos y se almacenan en nitrógeno líquido.

DESCRIPCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL BANCO CELULAR DE TRABAJO

La producción del BCT se inicia con la descongelación de células del BCM, obteniéndose la suspensión celular con medio de cultivo de crecimiento, la cual se distribuye en botellas para cultivo celular que se incuban por 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 24 horas se realiza un cambio de medio de cultivo y se continúa la incubación hasta obtener un 100% de confluencia celular; se realiza la disgregación y propagación de los cultivos celulares hasta el pase deseado para obtener una suspensión celular la cual también se envasa en criotubos y se almacenan en nitrógeno líquido.

TITULACION VIRAL

TITULACIÓN DE VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA ORAL BIVALENTE TIPO SABIN

La prueba consiste en la titulación de cada uno de los poliovirus tipos 1 y 3 que integran la vacuna, por el método de microtitulación en placa, utilizando un cultivo de células HEP-2C. La microtitulación se efectúa después de neutralizar 1 de los dos tipos de virus, con los sueros homotípicos correspondientes para dejar activo el que se va a titular (FEUM 13^a. Ed., 2021).

Procedimiento.

1. Previamente a la prueba, preparar las mezclas de sueros para titular cada uno de los dos tipos virales y determinar la capacidad neutralizante de cada suero el cual debe inhibir por lo menos 10^3 dosis infectivas.
2. Utilizar como medio de dilución, medio mínimo esencial de Eagle en solución salina amortiguadora de Earle, adicionado con suero fetal de bovino al 2 por ciento (v/v), y antibióticos (como solución de penicilina-estreptomicina a 100 UI/mL y 100 μ g/mL respectivamente; o solución de gentamicina a 50 μ g/mL).
3. Preparar por duplicado una serie de diluciones con factor de dilución constante (por ejemplo, de $0.3 \log_{10}$ o de $0.5 \log_{10}$) de la vacuna muestra y de una de referencia, en un intervalo que dependerá del título de la vacuna y el serotipo a titular, empleando el medio de dilución.
4. Colocar 0.05 mL de cada mezcla de sueros en cada pozo de una microplaca empleando un control celular, se recomienda usar una microplaca por serotipo a titular.
5. De cada dilución de prueba adicionar 0.05 mL por pozo, hasta completar la hilera de 8 pozos.
6. Para la titulación del virus total adicionar 0.05 mL de medio de dilución en lugar de las mezclas de suero.
7. Incubar las mezclas entre 35°C y 36°C durante 1 h en atmósfera conteniendo 5 por ciento de dióxido de carbono.
8. Preparar una suspensión de células con una concentración de 100 000 células/mL. Adicionar 0.1 mL a cada pozo de todas las microplacas.
9. Incubar las microplacas entre 35°C y 36°C por un periodo de 7 días.
10. Al final del periodo de observación examinar los cultivos al microscopio registrando la presencia o ausencia de efecto citipático (ECP) y calcular los títulos en dosis infectivas en cultivo celular al 50 por ciento (DICC₅₀) por un método estadístico.

Criterios de aceptación.

La prueba es válida si:

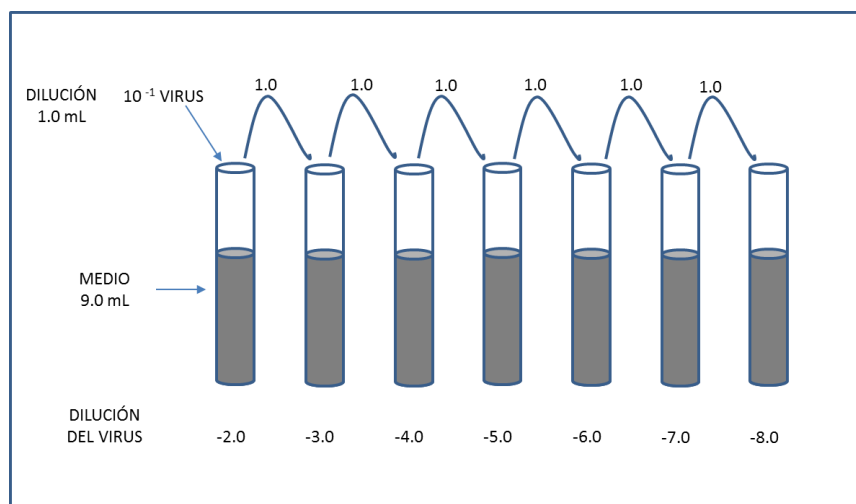
1. El título de la vacuna de referencia está dentro de $\pm 0.5 \log_{10}$ de la media establecida para esta preparación.
2. La dosis-respuesta es gradual a las diluciones empleadas.
3. La $DICC_{50}$ queda comprendida entre las diluciones de prueba, tanto para la vacuna de prueba como de referencia.
4. El control celular no presenta citotoxicidad, ni ECP al final del periodo de observación (FEUM 13^a. Ed., 2021).

MATERIAL

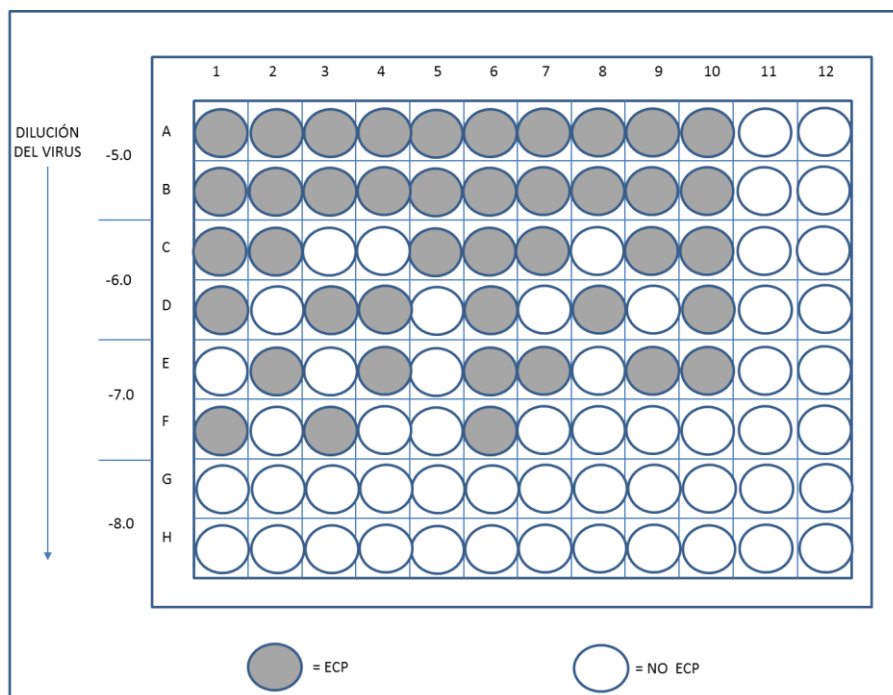
- Pipetas estériles desechables 1.0 mL
- Pipetas estériles desechables 10 mL
- Tubos estériles desechables de 10 mL
- Microplacas estériles de 96 pozos fondo redondo, con tapa.
- Puntas azules 1 mL
- Puntas amarillas 100 mL
- Micropipeta 0.1 a 1000 μ L
- Incubadora 36.5 °C, 5% CO₂
- Gabinete de Bioseguridad
- Homogeneizador vortex
- Medio de mantenimiento
- Suspensión celular Hep-2 c, con 100 000 cél/ mL
- Virus de referencia
- Muestra de virus a titular

MÉTODO

1. Marcar los tubos de dilución como 10^{-2} hasta 10^{-8}
2. Agregar 9.0 mL de medio a los tubos 1 a 7
3. Descongelar la muestra de virus (0.1 mL) a titular de un serotipo.
4. Adicionar al virus, 0.9 mL de medio y homogenizar (dilución 10^{-1}) utilizando el vortex
5. Adicionar 1.0 mL del virus al primer tubo, con ayuda de una micropipeta.
6. Homogenizar la dilución.
7. Repetir el proceso, transfiriendo 1.0 mL cada vez, cambiando la pipeta entra una y otra dilución; continuar hasta llegar al tubo 7 (Fig. 11.1).
8. Adicionar, a la microplaca que contiene 100µL de suspensión celular/pozo, 100 µL de cada dilución a los pozos de las columnas 1 a 10, de las filas A – H, inoculando 20 pozos por dilución (Fig. 11.2).
9. Adicionar 100µL de medio de mantenimiento a las hileras 11 y 12 que serán el testigo celular.
10. Realizar la prueba por duplicado.
11. Seguir el mismo procedimiento para procesar la referencia.



Preparación de las diluciones del virus.



Ejemplo de los resultados de titulación.

MÉTODO DE SPEARMAN-KÄRBER

Este método se basa en una idea originalmente propuesta por Spearman (1908) y más tarde desarrollada por Kärber (1931), y sólo es apropiado para el cálculo del punto final al 50 por ciento y, en ciertos casos, su intervalo de confianza.

El cálculo tiene analogía con el utilizado para determinar la media en una distribución de frecuencias agrupadas, aunque no es idéntico, ya que, al acumularse, las proporciones de reactores provienen de diferentes grupos de unidades de prueba. Aunque se recomienda que siempre que sea posible, se utilicen dosis igualmente espaciadas en una escala logarítmica y números iguales de unidades de prueba por dosis, el método admite la posibilidad de utilizar tanto diferentes intervalos entre logaritmos de las dosis, como número de unidades de prueba desiguales (ecuación 1). Para que la fórmula de deSpearman y Kärber sea aplicable, es necesario usar un intervalo de diluciones lo suficientemente amplio para incluir tanto la dilución a la cual el 100 por ciento de las unidades de prueba reaccionen, como aquella a la que ninguna lo haga. Si alguna o ambas condiciones no se cumplen, algunas veces se supone que, para un factor de

dilución constante, la dilución próxima más alta o baja a la última probada, habría producido el resultado deseado. La extrapolación de datos en esta forma no es muy recomendable y solo debe emplearse en casos excepcionales; es preferible repetir el ensayo con un intervalo de diluciones más apropiado (FEUM 13^a. Ed., 2021).

CÁLCULO DE TÍTULO VIRAL POR LA FÓRMULA DE KÄRBER

$$\text{Log DICC}_{50} = L - d (S - 0.5)$$

Donde:

L= log de la dilución más baja utilizada en la prueba

d=diferencia entre una dilución y otra

S=Suma de las proporciones de “pozos positivos” (cultivos que muestran efecto citopático)

Para este ejemplo:

$$L = -5.0; d = 1.0; S = 1 + 0.65 + 0.45 + 0 = 2.10;$$

$$\text{Log DICC}_{50} = -5.0 - 1(2.10 - 0.5)$$

$$\text{Log DICC}_{50} = - 6.60$$

$$\text{Título Viral} = 10^{6.60} \text{ DICC}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

EVALUACIÓN DE RESULTADOS DE TITULACIÓN

La prueba de Titulación se considera válida si:

- Los controles de células (CC) se observan sanos (sin ECP ni efecto citotóxico).
- La respuesta de ECP es gradual de acuerdo a las diluciones.
- Las diluciones incluyen lecturas de 0% y 100% de ECP.

- Las diferencias entre las dos titulaciones de cada serotipo de la vacuna de referencia son menores de $0.5 \log_{10} \text{DICC}_{50}$.
- El título promedio de la referencia queda dentro de $\pm 0.5 \log_{10} \text{DICC}_{50}$ de aquellos establecidos para ella.
- La diferencia entre las dos titulaciones de la vacuna en prueba no es mayor
- de $0.5 \log_{10} \text{DICC}_{50}$ para cada serotipo.

PRUEBA DE HERMETICIDAD

Esta prueba se basa en la aplicación de vacío (diferencial de presión) en los envases goteros en los que está contenida la vacuna. Si los envases no son herméticos al aplicar vacío, saldrá aire, y al suspender dicha presión, podrá penetrar la solución colorante en la que se encuentran inmersos.

La prueba se llevó a cabo utilizando 20 goteros de cada lote de vacuna monovalente y 3 L de solución de cristal violeta al 1%; cada lote se procesó de forma individual en la Estufa de Anaerobiosis (marca Nacional, modelo 3640.6, serie DAS).

PRUEBA DE IDENTIDAD

El método de identidad se basa en la neutralización de poliovirus por la presencia de anticuerpos específicos para el tipo de poliovirus en análisis (tipo 1, tipo 2 o tipo 3); el resultado es la ausencia del efecto citopático típico de poliovirus en las células sensibles o la disminución del título.

REFERENCIAS

Baicus, A., (2012). History of polio vaccination. *World J Virol.* 1(4): 108-114.

Borrego, J.J., Bosch, A. (2017). La poliomiелitis y sus sellos. *SEMAFORO*. Diciembre. NUM. 64.: 22-29.

Burns, C.C., Diop, O.M., Sutter, R.W., Kew, O.M. (2014). Vaccine-Derived Polioviruses. *J Infect Dis.* 210 (1): 283-293.

Cabasso, V., Jervis, G.A., Moyer, A.E., Roca-García, M., Orsi, E.V., Cox, H.R. (1960). Cumulative testing experience with consecutive lots of oral poliomiелitis vaccine. *British Medical Journal.* Feb 6: 373-387.

Cáceres, V.M, and Sutter, R.W., (2001). Sabin Monovalent Oral Polio Vaccines: Review of past experiences and their potential use after Polio Eradication. *Clin Infect Dis.* 33: 531-41.

Chumakov, M.P., Voroshilova, M.K., Drozdov, S.G., Dzagurov, S.G., Lashkevich, V.A., Mironova, L.L., Ralph, N-M., et al. (1961). Some results of the work on mass immunization in the Soviet Union with Live Poliovirus Vaccine prepared from Sabin Strains. *Bull Wld Hlth Org* 25: 79-91.

Dane, D.S., Dick, J.H., Connolly, O.D., Fisher, F., McKeown, M., Briggs, R., Nelson, D. and Wilson. (1957). Vaccination against poliomyelitis with live virus vaccines: A trial of TN type II vaccine, A trial of SM type I attenuated poliomyelitis virus vaccine and The evaluation of TN and SM virus vaccines. *British Medical Journal*. Jan 12: 59-74.

Elena, M.R., (2021). La Erradicación de la Poliomielitis en el Mundo. Sevilla. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia.

Esteve-Jaramillo, A., Richardson-López V.L. (2012). Hacia la erradicación de la poliomyelitis: logros y retos en México. *Salud Pública Mex*. 54: 537-543.

Gómez-De Lara, J.L., Rodríguez-Paz, C.A. (2021). Aspectos históricos, clínicos y epidemiológicos de la poliomyelitis en México (1946-1960). *Rev Med Ins Mex Seg Soc*. 59(6): 585-590.

González-Rubio, R., (2018). La Poliomielitis y su erradicación en México y las Américas Reto histórico de salud hecho realidad. *Rev Sal Jal*.; 5(1): 49-51.

Holland, J.J., McLaren, J.C., Syverton, J.T. (1959). The mammalian cell virus relationship: III. Production of infectious poliovirus by non-primate cells exposed to poliovirus ribonucleic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 100, 843-845.

Iwasaki, A., Welker, R., Mueller, S., Linehan, M., Nomoto, A., Wimmer, E. (2002). Immunofluorescence analysis of poliovirus receptor expression in Peyer's patches of humans, primates, and CD155 transgenic mice: implications for poliovirus infection. *J Infect Dis.* 186 (5), 585-592.

Jacob, J.T., Devarajan, L.V., Balasubramanyan, A. (1976). Immunization in India with trivalente and monovalent oral poliovirus vaccines of enhance potency. *Bull. World Health Organ.* Vol. 54.

Koike, S., Taya, C., Kurata, T., Abe, S., Ise, I., Yonekawa, H., Nomoto, A. (1991). Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 951-955.

Koprowsky, H. (1960). Historical Aspects of the development of live virus vaccine in poliomyelitis. *British Medical Journal.* Jul 9: 85-91.

Mendelsohn, C., Wimmer, E., Racaniello, V.R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell.* 56, 855-865.

Mosquera, M.A., Barón, N., Ballester, R. (2014). El camino hacia la erradicación de la poliomyelitis a través de la Organización Panamericana de la Salud. *Rev Panam Salud Pública.* 36(3):185–92.

Mueller, S., Wimmer, E., Cello, J. (2005). Poliovirus and Poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res.* 111 (2), 175-193.

Patriarca, P.A., Wright, P.F., Jacob, J.T. (1991). Factors affecting the immunogenicity of Oral Poliovirus Vaccine in developing countries: review. *Rev of Infec Dis.*; 13: 926-39.

Plotkin, S.A. (2011). History of Vaccine Development. Springer.

Plotkin, S.A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nat Med* 11(4): 5-11.

Plotkin, S.A. (1962). Recent results of mass immunization against poliomyelitis with Koprowski strains of attenuated live poliovirus. *A J P H* 52(6): 946-960.

Polio vaccines: WHO position paper, January. (2014). Weekly epidemiological record. *J Infect Dis.* 89 (9): 73-92.

Racaniello, V.R. (2001). Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Howley, P., Knipe, D. (Eds), Fields virology, vol. 1 Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 685-722. 2 vols.

Racaniello, V.R. (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* 344:9-16.

Ruiz-Gómez, J., Valdespino, J.L., Olaiz-Fernández, G., Arias-Toledo, E., Sepúlveda, J. (2007). Seroprevalencia de anticuerpos contra el poliovirus I en niños mexicanos. *Salud Publica Mex*;49 supl 3: S361-S369. (Ruiz-Gómez et al, 2007).

Sabin, A.B., (1957). Present Status of Attenuated Live virus Poliomyelitis Vaccine. *Bull N.Y. Acad Med* 33 (1): 17-39.

Sabin, A.B., Ramos-Álvarez, M., Álvarez-Amezquita, J., Pelon, W., Michaels, R.H., Spiglans, I., Koch, M.A., Barnes, J.S., Rhim., (1960). Live Orally given Poliovirus Vaccine. Effects of rapid mass immunization of population and conditions of massive enteric infection with other viruses. *JAMA* 173 (14). *Bull Wld Hlth Org* 1999 77 (2): 196-201.

Secretaría de Salud. (2021). Farmacopea De Los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Edit. Comisión Permanente De La FARMACOPEA De Los Estados Unidos Mexicanos. [13 Ed.].

Slonim, D., Mares,I., Drevo, M., H Sturmová, H. and Simon, J. (1962). Experience with preparation and laboratory control of Oral Poliomyelitis Vaccine in Czechoslovakia. *Bull Wld Hlth Org*. 26: 331-339.

Smith, D.R.& Leggat, P.R., (2005). Pioneering figures in medicine: Albert Bruce Sabin-Inventor of the Oral Polio Vaccine. *Kurume Medical Journal*. 52: 111-116.

World Health Organization. (2004). Polio laboratory manual. Geneva. [4th Ed.]:74-78.

World Health Organization. (2009). Weekly epidemiological record. Advisory Committee on Poliomyelitis Eradication; recommendations on use of bivalent oral poliovirus types 1 and 3. 84: 289-300.

World Health Organization. 2010. Weekly epidemiological record. Advisory Committee on Poliomyelitis Eradication; polio vaccines and polio immunization in the pre-eradication era: *WHO position paper*. 85: 213-228.

World Health Organization. WHO. (2014). Weekly epidemiological record. 89 (9): 73-92.

World Health Organization. (2015). Global Polio Eradication Initiative. *Polio News*. September 2015.

World Health Organization.(2015). World Health Assembly resolution: poliomyelitis. Geneva, Switzerland: World Health Organization, sixty-eighth World Health Assembly, May 26, 2015. Resolution no.WHA 68.3.

