

336427



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO  
CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
INCORPORADA A LA UNAM

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE TÉCNICAS *“in vitro”* vs *“in vivo”*  
PARA LA EVALUACIÓN DE POTENCIA EN LA FRACCIÓN  
DIFTÉRICA DE VACUNAS BACTERIANAS”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

**ANA LORENA ESPINOSA SAN JUAN**

DIR. DE TESIS: QFB. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑES

MÉXICO, D.F.

2005.

11347793



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**


JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: QFB. ESPERANZA HERNÁNDEZ KOELIG  
VOCAL: DR. JUAN ANTONIO JIMÉNEZ SCHERER  
SECRETARIO : QFB. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ  
1ER. SUPLENTE: DR. GUILLERMO DEL REY PINEDA  
2DO. SUPLENTE: QFB. GERARDO GARCÍA CAMACHO

Asesor

QFB. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ana Lorena  
Espinosa San Juan  
FECHA: 14 de Septiembre 2005  
FIRMA: 

Sustentante

ANA LORENA ESPINOSA SAN JUAN

## *AGRADECIMIENTOS*

### *A MIS PADRES:*

*Los logros de mi vida se lo debo a ustedes que  
con su esfuerzo y dedicación me han impulsado  
a culminar cada proyecto que decido  
emprender.*

### *CARLITOS:*

*Cada actividad que realizo es con el propósito  
de buscar una vida juntos llena de bienestar.  
Gracias por tu compañía, apoyo y por el gran  
amor que me ofreces.*

*Mis apoyos desde niña:  
Ricardo, Oscar*

*Mis segundas familias:  
Fam. Espinosa Santana,  
Fam. Hernández Arteaga, Fam. Mata Hernández, Fam. Hernández Solís,  
Fam. Ortiz Arteaga*

*Mis ángeles de la guarda:  
Pita, Ma. Elena*

*Mi directora externa de tesis:  
QBP. Teresa Jaramillo  
"Gracias por todo lo ensañado para la culminación de esta tesis"*

*Y aquellas personas que aun no están en esta tierra pero  
que son los principales motivos de superación*

*El día que el hombre  
se diese cuenta de sus profundas equivocaciones,  
habría terminado el progreso de la ciencia.*

*Marie Curie*

## ÍNDICE

CAPÍTULO	CONTENIDO	PÁG.
1	INTRODUCCIÓN	2
2	OBJETIVO	6
	2.1 General	6
	2.2 Particulares	6
3	JUSTIFICACIÓN	8
4	HIPÓTESIS	10
5	MARCO TEÓRICO	12
	5.1 ¿Qué es una Vacuna?	12
	5.2 Historia de las Vacunas	12
	5.3 Principales conceptos relacionados con la vacunación	14
	5.4 Bases inmunitarias de las vacunaciones	16
	5.4.1 Células del sistema inmunológico	16
	5.4.2 Moléculas del sistema inmunológico	16
	5.4.3 Neutralización de toxinas bacterianas	18
	5.5 Principios básicos de la Inmunización	19
	5.6 Tipos de Vacunas	22
	5.6.1 Clasificación Microbiológica	22
	5.6.2 Clasificación Sanitaria	23
	5.7 Requerimientos para la efectividad de las Vacunas	24
	5.8 Características Generales de las Vacunas	25
	5.8.1 Seguridad	26
	5.8.2 Inmunogenicidad	26
	5.8.3 Eficacia protectora	27
	5.8.4 Eficiencia	28
	5.8.5 Estabilidad	28
	5.9 Disposiciones Generales para la vacunación contra Difteria	28
	5.10 Difteria	30
	5.10.1 Manifestaciones Clínicas	30
	5.10.2 Evolución y Pronóstico	30
	5.10.3 Agente Etiológico	31
	5.10.4 Epidemiología e Inmunidad	32
	5.10.5 Anatomía Patológica y Patogenia	32
	5.10.6 Diagnóstico de laboratorio	33
	5.10.7 Epidemiología	34
	5.10.8 Tratamiento de la Difteria	35
	5.10.9 Principales medidas a considerar	37
	5.11 Posología de las vacunas diftéricas	37
	5.12 Control de Calidad en Productos Biológicos	38
	5.12.1 Manejo y conservación de Productos Biológicos	38
	5.12.2 Métodos de Productos Biológicos	39

5.12.3	Análisis de potencia en vacunas contra difteria " <i>in vivo</i> "	40
5.12.4	Análisis de potencia en vacunas contra difteria " <i>in vitro</i> "	41
5.13	Conceptos Estadísticos y Epidemiológicos	41
6	<b>METODOLOGÍA</b>	45
6.1	Material	45
6.2	Material Biológico	45
6.3	Preparación de Reactivos	45
6.4	Características generales de la prueba de potencia	46
6.4.1	Animales de Experimentación	46
6.4.2	Productos para analizar	47
6.4.3	Área de Experimentación	47
6.5	Preparación de muestras	47
6.5.1	Inmunización de cobayos para la obtención de suero antidiftérico	47
6.6	Titulación de toxina diftérica	48
6.7	Metodología de técnica " <i>in vivo</i> " (Lr/100)	48
6.7.1	Fundamento de la prueba	48
6.7.2	Procedimiento para la determinación de la potencia de antitoxina diftérica	48
6.8	Metodología de técnica " <i>in vitro</i> "	48
6.8.1	Fundamento de la prueba	49
6.8.2	Procedimiento para determinar la potencia de antitoxina diftérica	48
6.9	Esquema general para la comparación de técnicas propuestas	49
7	<b>RESULTADOS</b>	51
7.1	Evaluación de potencia de la fracción diftérica por los dos métodos (4 semanas después de la Inmunización)	51
7.2	Evaluación de potencia de la fracción diftérica por los dos métodos (6 semanas después de la Inmunización)	52
7.3	Resultados comparativos por los dos métodos de análisis para cada tipo de producto	64
7.3.1	Vacuna DPT (4 semanas después de la inmunización)	55
7.3.2	Vacuna DPT (6 semanas después de la inmunización)	57
7.3.3	Vacuna Td (4 semanas después de la inmunización)	59
7.3.4	Vacuna Td (6 semanas después de la inmunización)	61
7.3.5	Vacuna Combinada (4 semanas después de la inmunización)	63
7.3.6	Vacuna Combinada (6 semanas después de la inmunización)	65
7.4	Resultados Generales (4 semanas)	67
7.5	Resultados Generales (6 semanas)	67

7.6	Gráficas comparativas de resultados entre 4 y 6 semanas	68
7.6.1	Vacuna DPT	68
7.6.2	Vacuna Td	69
7.6.3	Vacuna Combinada	70
8	DISCUSIÓN	72
9	CONCLUSIÓN	76
10	BIBLIOGRAFÍA	79
	Anexo 1	82
	Anexo 2	84
	Anexo 3	86



## CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUCCIÓN

El aspecto fundamental para la prevención de enfermedades transmisibles, es romper la cadena epidemiológica en alguno de sus tres eslabones: las fuentes de infección, los mecanismos de transmisión o la susceptibilidad de los individuos sanos.<sup>1</sup>

Considerando el primer punto que es la fuente de infección, las acciones sanitarias posibles son el aislamiento, el tratamiento específico y la eliminación; el punto referente a los mecanismos de transmisión, las acciones sanitarias fundamentales son el saneamiento general o específico y las barreras mecánicas; y por último, sobre la susceptibilidad del individuo sano se puede inducir mediante la quimioprofilaxis, la inmunización pasiva y la inmunización activa.<sup>1</sup>

La inmunización activa ocupa un lugar muy destacado en la prevención de enfermedades transmisibles, de reservorio humano y transmisión interhumana por vía aérea, su papel es fundamental ya que en ellas las acciones sanitarias sobre las fuentes de infección y sobre los mecanismos de transmisión son muy poco eficaces.<sup>2</sup>

Las inmunizaciones pasivas presentan la ventaja de conferir una protección inmediata, la cual es muy importante en casos de exposición a ciertas infecciones. Sin embargo, la inmunización pasiva tiene el inconveniente de ser de corta duración, ya que no hay estimulación de los mecanismos inmunitarios.<sup>2</sup>

Al incorporar las inmunizaciones a los servicios de asistencia sanitaria habituales, los terapeutas han podido controlar un porcentaje sustancial de enfermedades en la primera mitad del siglo XX. Para la sociedad actual, la inmunización representa uno de los medios más importantes para prevenir las enfermedades infecciosas graves. Se han autorizado hasta ahora más de 50 productos biológicos y se han usado alrededor de 11 antígenos para la inmunización sistemática de niños, y para los adultos se han elaborado más de cinco vacunas habituales, las cuales han dado lugar a la erradicación total de la viruela, a la desaparición prácticamente total de la poliomielitis en Norteamérica y Sudamérica, y a la eliminación casi absoluta del síndrome de la rubéola congénita, del tétanos y de la difteria, así como una significativa disminución de la tos ferina, la rubéola, el sarampión y la parotiditis.<sup>3</sup>

Uno de los mecanismos que se produce en la administración parenteral de proteínas bacterianas, tales como toxoides tetánico y diftérico, es la inducción a la producción de anticuerpos protectores contra aquellas bacterias a las que se dirige dicha vacuna. Para estimular al sistema inmune a producir anticuerpos que alcancen niveles satisfactorios que confieran inmunidad, se requiere no sólo una inmunización, se requiere una serie inicial de 2 ó más dosis, teniendo de esta forma la seguridad de tener niveles de protección aceptables.<sup>3</sup>

Después de completar la inmunización primaria, la cantidad de anticuerpos circulantes contra los toxoides diftérico y tetánico comienza a disminuir gradualmente,

pero se sabe que la protección y los niveles de anticuerpos son aceptables hasta por 10 años. Es por esta razón que las campañas de vacunación recomiendan un refuerzo de toxoides diftérico y tetánico cada 10 años.<sup>4</sup>

La inmunización contra difteria y tétanos se ha asociado con una disminución notable en las tasas de incidencia de morbilidad y mortalidad debida a estas enfermedades. La inmunización simultánea con vacunas combinada como DPT (Vacuna antipertussis con toxoides diftérico y tetánico) y Td (Vacuna con toxoides diftérico y tetánico) se han constituido en la piedra angular de muchos programas nacionales de inmunización.<sup>5</sup>

El impacto mundial de la introducción de la vacuna antidiftérica se dio en los años de 1920 y su vasta aplicación en los años 50, de esta forma la incidencia de la difteria declinó en forma considerable en muchas países.<sup>5</sup>

En Francia, la vacuna erradicó la difteria por completo y no se ha informado casos desde 1990, mientras que en 1945 se informaron 45,000 casos y las tasas de mortalidad se extendían entre 50 y 100 muertes por millón.<sup>5</sup>

En Suiza, la vacuna antidiftérica se utilizó en cierta medida desde 1938, y en forma más sistemática luego de la Segunda Guerra Mundial. Entre 1940 y 1949, se registraron en promedio de 3,040 casos de difteria y 130 fatalidades por año, mientras que entre 1985 y 1994 no se registraron muertes. Se estima que desde entonces se evitaron 4,600 casos de difteria y 100 muertes relacionadas con la difteria en Suiza.<sup>5</sup>

En los Estados Unidos, se registraron 147,991 casos de difteria y 13,170 fatalidades en 1920. En 1926, se informaron 206,939 casos, comparados con sólo 3 casos en 1983 y 1 caso en 1998.<sup>5</sup>

Afortunadamente los avances registrados en el Programa de Vacunación colocan a México en un lugar muy importante ya que se tiene coberturas prácticamente universales, además de contar con uno de los esquemas más completo de América Latina.<sup>5</sup>

Para controlar, eliminar y erradicar las enfermedades evitables por vacunación, el Gobierno Federal, por conducto de la Secretaría de Salud y del Consejo Nacional de Vacunación, ha considerado diferentes aspectos en relación a la aplicación de las vacunas, con base en lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud.<sup>6</sup>

La NOM-023-SSA2-1994, para el control, eliminación y erradicación de las enfermedades evitables con vacunación, considera todas las vacunas que actualmente se aplican en el país dentro del Programa de Vacunación Universal, y también aquellas que son posibles ingresen como elementos de apoyo en beneficio de la población residente en la República Mexicana. Tiene como propósito asegurar la protección de toda la población susceptible, así como la de los grupos de mayor riesgo en el país, contra

aquellas enfermedades evitables por vacunación. Teniendo como norma que todas las vacunas que se apliquen en el territorio nacional, de origen mexicano o extranjero, cumplirán con las especificaciones de calidad señaladas en cada caso en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos vigente.<sup>6</sup>

Dentro de estas especificaciones se encuentra presente un parámetro importante dentro del Control de Calidad el cual es el análisis de potencia y se realiza en vacunas DPT, Td y sus combinaciones con otras vacunas, sueros hiperinmunes, inmunoglobulinas y antitoxina diftérica; este análisis tiene como principio una reacción de seroneutralización, siendo este método y sus variantes nuestro objeto de estudio en esta tesis.<sup>6</sup>

## CAPÍTULO 2

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 General**

Comparar dos métodos de análisis "*in vivo*" vs "*in vitro*" para la prueba de potencia realizada a vacunas con toxoides diftéricos, como un método de control de calidad para el cumplimiento de las especificaciones de calidad señaladas para productos biológicos en México.

### **2.2 Particulares**

Realizar las pruebas de potencias en los productos con toxoides diftéricos considerando variantes de tiempo después de inmunizar al animal de experimentación para realizar la reacción de seroconversión.

Comparar la respuesta obtenida en las pruebas de potencia entre productos combinados y simples distribuidos en el mercado mexicano.

## CAPÍTULO 3

### 3 JUSTIFICACIÓN

En la comparación del método “*in vivo*” contra el método “*in vitro*” es necesario indicar las variantes a considerar como factor de error y las condiciones aplicadas para la disminución de éste, siendo descritas las variantes a continuación:

- El tiempo en el que se realiza el análisis;
- El estado físico de los animales de laboratorio y;
- El producto utilizado en la prueba.

Considerando el tiempo en el que se realiza el análisis, es importante mencionar que se está realizando en dos momentos por igual para todos los productos, estos tiempos son establecidos según el Método de Productos Biológicos (MRB) No. 055 establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) el cual su especificación indica que el tiempo de seroconversión es “*después de 4 semanas como mínimo y no más de 6 semanas*”, siendo estos tiempos nuestra primer variante.<sup>7</sup>

En cuanto al estado físico de los animales de laboratorio, la alimentación, las características ambientales, higiene y la reproducción son realizados y controlados por medio de Procedimientos de Operación Normalizados (PON) establecidos por el Laboratorio Nacional de Salud Pública (LNSP) con referencia en el PROY-NOM-062-200-1999 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo.<sup>8</sup>

Y por último, considerando la utilización de productos de diferentes fabricantes y el uso de vacunas simples y combinadas, es conveniente mencionar que el método utilizado como estándar de oro es específico para la fracción diftérica de dichas vacunas.



## CAPÍTULO 4

#### 4 HIPÓTESIS

Considerando los factores que pueden provocar error en nuestro análisis de comparación y las medidas para disminuirlos, considero que se obtendrán resultados aceptables cercanos al 100% en los parámetros de reproducibilidad y especificidad para el método *in vivo* tomado como referencia el método ya establecido *in vitro*, sin embargo aun no se podrá considerar la sustitución de dicho método dentro del conjunto de pruebas de Control de Calidad para productos biológicos con toxoides diftéricos ya que los valores de los resultados que cada método reportara tendrán una variación en Unidades Internacionales (UI) y no será posible tener una factor de conversión entre los dos métodos.

## CAPÍTULO 5

## 5 MARCO TEÓRICO

### 5.1 ¿Qué es una vacuna?

Las vacunas son suspensiones de microorganismos vivos, por lo general atenuados o inactivados, o sus fracciones, que son administradas al individuo sano susceptible, con el objetivo de inducir inmunidad activa protectora contra la enfermedad infecciosa correspondiente.<sup>5</sup>

La respuesta inmune protege al cuerpo contra la enfermedad. Los niños nacen con una inmunidad natural contra la enfermedad gracias a la transmisión de anticuerpos de la madre al feto a través de la barrera placentaria. Esta inmunidad se mantiene durante el periodo en que los niños son amamantados.<sup>5</sup>

La vacunación es un medio para desencadenar la inmunidad adquirida. Esta es una forma especializada de inmunidad que aporta protección duradera contra antígenos específicos, responsables de ciertas enfermedades.<sup>5</sup>

Se administran dosis pequeñas de un antígeno con el fin de activar *la memoria inmune* la cual permite al cuerpo reaccionar rápida y eficientemente a las exposiciones futuras a cualquier antígeno antes de que puedan causar daño. La vacunación es uno de los mejores medios para protegerse contra muchas enfermedades contagiosas. Las vacunas son preparaciones inmunogénicas capaces de inducir una respuesta de protección en el individuo que es inoculado.<sup>9</sup> Son preparaciones obtenidas a partir de agentes infecciosos o tóxicos que, inducen un estado específico de protección contra los efectos nocivos del agente de donde proviene. Desde su aparición, las vacunas se han constituido en el primer recurso en la prevención de enfermedades infecciosas, ya que han logrado prevenir enfermedades humanas o de animales antes de su aparición, y hasta se ha logrado la erradicación de las mismas.<sup>3</sup>

Vacunación e inmunización suelen emplearse indistintamente, pero el primero indica solo la administración de una vacuna o un toxoide, mientras que el segundo se refiere al modo de inducir o conferir inmunidad por cualquier medio, sea con medidas activas o pasivas. De ahí que la vacunación no garantice la inmunización.<sup>2</sup>

### 5.2 Historia de las vacunas

El mantenimiento de la salud implica prevenir la aparición de las enfermedades. Durante los primeros millones de años de la existencia del humano, la prevención de la enfermedad fue intentada a través de medidas mágicas como el uso de amuletos, de conjuros o de diversas formas y actos de fe, a consecuencia de la ignorancia total sobre la etiología y la patogenia de las enfermedades, durante ese largo periodo, las actividades médicas sólo pudieron enfocarse a la restauración de la salud perdida mediante la búsqueda empírica de procedimientos o sustancias terapéuticas. Ese camino

fructificó en cuanto a los avances en la cirugía y en la obtención de fármacos, pero pronto se vieron sus limitaciones.<sup>3</sup>

Cuando el ser humano racionalizó que era preferible buscar medidas de prevención y que el esfuerzo y recursos utilizados en ello se recuperarían con creces a consecuencia de su impacto en los ámbitos sociales, económicos y político, se dio uno de los pasos más trascendentes en la historia de la medicina.<sup>3</sup>

Durante ciertas etapas de la historia de muchos pueblos, algunas enfermedades de tipo infeccioso disminuyeron considerablemente a consecuencia indirecta de la mejoría de sus condiciones generales de vida, tales como mejor alimentación, disponibilidad de aguas potables y medidas correctas para la eliminación de excretas. En realidad, estas situaciones nunca fueron permanentes, ya que era suficiente cualquier desequilibrio en la estabilidad de esa sociedad o la llegada de un agente infeccioso nuevo para que se presentaran situaciones desastrosas en la salud.<sup>3</sup>

No fue sino hasta hace pocos años que se alcanzaron las condiciones específicas de protección, entre las primeras conclusiones empíricas a que llegaron los estudiosos de la salud, se indicó que algunas de las características de los cuadros infecciosos podrían relacionarse con el agente causal y que ciertas enfermedades dejan en los sobrevivientes un estado de inmunidad, estos hallazgos hicieron que hace unos tres mil años en China se comenzara a inocular la piel de individuos sanos con las costras secas o el líquido de las pústulas de una forma favorable de la viruela en otro niño. Esta medida daba lugar a una infección limitada poco grave con mortalidad muy baja con relación a la producida con un brote epidémico y que posteriormente libraba al sujeto de adquirir la viruela. Esta práctica fue llamada variolización. En 1758 se intentó producir un sarampión benigno en sujetos sin antecedentes de la enfermedad, frotando su piel escarificada con sangre tomada de las lesiones de pacientes en su fase eruptiva, esta sarampionización se usó en 15 niños donde en 7 de ellos se obtuvo un ataque leve de sarampión.<sup>3</sup>

El nacimiento de la inmunología como una ciencia se puede fechar cuando Edward Jenner vacunó con éxito contra la viruela en 1796.<sup>3</sup>

A fines del siglo XIX se perfeccionó la técnica de multiplicación de virus vacunal en la piel escarificada de bovinos u ovinos. La linfa así producida era suspendida en glicerol y distribuida en capilares de vidrio, dentro de los cuales se conservaba intacta durante dos o tres días a temperatura ambiente, esta innovación permitió la vacunación de muchos más sujetos, lo cual se incrementó cuando se tuvo la posibilidad de refrigerar la vacuna y todavía más al lograr liofilizarla.<sup>3</sup>

El 1958, la URSS propuso ante la Organización Mundial de la Salud (OMS) la instauración de un programa mundial de erradicación de la viruela, el cual fue aprobado en 1959. Durante los primeros años se lograron avances importantes pero sin todo el éxito esperado, principalmente a causa de la insuficiencia de vacuna, a diferencias en su

producción y control de calidad y a la falta de mecanismos adecuados para su conservación y distribución.<sup>3</sup>

El programa fue reorganizado entre 1965 y 1967 ante todo esto se uniformaron las pruebas de potencia, pureza y estabilidad de todos los lotes de vacuna utilizadas y bajo esas bases se promovió su producción en los países de áreas endémicas.<sup>3</sup>

En México en el año de 1994 para controlar, eliminar y erradicar las enfermedades evitables por vacunación, el Gobierno Federal, considero los diferentes aspectos a considerar con relación a la aplicación de las vacunas, con base en lo recomendado por la OMS.<sup>10</sup>

La Norma Oficial Mexicana vigente considera a todas las vacunas que se aplicaban en el país dentro del Programa de Vacunación Universal, y también aquellas que ingresaran como elementos de apoyo en beneficio de la población. Teniendo como propósito asegurar la protección de toda la población susceptible, así como la de los grupos de riesgo en el país.<sup>6</sup>

Los objetivos principales son satisfacer la prestación de servicios con el fin de controlar, eliminar y erradicar las enfermedades. Uniformar los criterios, lineamientos, estrategias y procedimientos de vacunación.<sup>6</sup> Cumpliéndose de esta forma todos los lineamientos que indica la norma hasta estas fechas.

### **5.3 Principales conceptos relacionados con la vacunación**

Es de gran importancia conocer los principales conceptos referentes al tema de las vacunas, para de esta forma poder alcanzar la mejor aplicación de los términos utilizados.

Se conoce como anticuerpo a la molécula proteica producida por las células plasmáticas en respuesta a la estimulación de un antígeno. Cada anticuerpo es capaz de unirse específicamente con el antígeno que ha inducido su formación.<sup>6</sup>

El antígeno es la molécula o fracción de la misma capaz de ser reconocida por un anticuerpo o receptor de células T. La mayoría de los antígenos son inmunógenos, es decir, tienen la capacidad de generar una respuesta del sistema inmunológico.<sup>6</sup>

La antitoxina es el anticuerpo capaz de neutralizar la acción tóxica de un antígeno.<sup>6</sup>

El control es la aplicación de medidas para la disminución de la incidencia, en casos de enfermedad.<sup>6</sup>

La eliminación es la ausencia de casos, aunque persista el agente causal.<sup>6</sup>

La erradicación es la desaparición en un tiempo determinado, tanto de casos de enfermedad como del agente causal.<sup>6</sup>

Un esquema básico de vacunaciones es el calendario para la aplicación de vacunas, con el fin de prevenir enfermedades como son poliomielitis, tuberculosis, BCG, tétanos, difteria, tos ferina, *Haemophilus influenzae* tipo b, Hepatitis B, sarampión, rubéola y parotiditis.<sup>6</sup>

Un esquema completo de vacunación es el número ideal de vacunas, dosis y refuerzos que debe recibir la población, de acuerdo con su edad.<sup>6</sup>

Los eventos graves temporalmente asociados a la vacunación son aquellas manifestaciones clínicas que ponen en riesgo la vida del paciente, o cuyas secuelas afectan la capacidad funcional del individuo, incluyendo en su caso, las defunciones.<sup>6</sup>

Los eventos leves temporalmente asociados a la vacunación son manifestaciones clínicas locales en el sitio de aplicación de las vacunas y a las sistémicas que se tratan en forma ambulatoria y no dejan secuelas.<sup>6</sup>

Un evento moderado temporalmente asociado a la vacunación es la manifestación clínica que, aun cuando requieren hospitalización, no ponen en riesgo la vida del paciente, o las secuelas presentadas no afectan la capacidad funcional del individuo.<sup>6</sup>

El evento temporalmente asociado a la vacunación es toda aquella manifestación clínicas que se presentan dentro de los 30 días posteriores a la aplicación de una o más vacunas y que no son ocasionadas por alguna entidad nosológica específica.<sup>6</sup>

La inactivación de las vacunas es el proceso mediante el cual se suprime la acción o el efecto de las vacunas, generalmente a través de la exposición al calor o uso de alguna solución desinfectante, al término de su vida útil o de su caducidad.<sup>6</sup>

Se conoce como inmunidad al estado biológico del organismo capaz de resistir y defenderse de la agresión de agentes extraños; sin embargo, en ocasiones el organismo también actúa contra sustancias propias.<sup>6</sup>

La inmunidad activa es la protección de un individuo susceptible a una enfermedad transmisible, mediante la aplicación de una vacuna o toxoide.<sup>6</sup>

La inmunidad adquirida es cualquier forma de inmunidad no innata, que se adquiere a lo largo de la vida. Puede ser natural o artificial, e inducida activa o pasivamente.<sup>6</sup>

La inmunidad pasiva es la forma de inmunidad adquirida, debida a la acción de los anticuerpos transmitidos en forma natural a través de la placenta de la madre al feto, a través del calostro de la madre al lactante o bien artificialmente por inyección de sueros

como tratamiento profiláctico de alguna enfermedad. La inmunidad pasiva no es permanente ni dura tanto tiempo como la activa.<sup>6</sup>

Se conoce como inmunogenicidad a la capacidad que tiene un antígeno de inducir una respuesta inmune.<sup>6</sup>

Los insumos para la vacunación son todos los recursos materiales desechables, que se utilizan para la aplicación de los biológicos, incluyendo estos mismos, así como las torundas, alcohol, jeringas y agujas.<sup>6</sup>

Red o cadena de frío es el sistema logístico que comprende al personal, al equipo y a los procedimientos para almacenar, transportar y mantener las vacunas a temperaturas adecuadas, desde el lugar de su fabricación hasta el momento de aplicarlas a la población sujeta algún Programa.<sup>6</sup>

El Sistema Nacional de Salud es un conjunto constituido por las dependencias e instituciones de la Administración Pública, tanto federal como local, y por las personas físicas o morales de los sectores social y privado que prestan servicios de salud, así como por los mecanismos establecidos para la coordinación de acciones. Tiene por objeto dar cumplimiento al derecho de protección a la salud.<sup>6</sup>

Los sueros son productos de origen animal derivados de la sangre del caballo u otras especies.<sup>6</sup>

El toxoide es la toxina que ha sido tratada con productos químicos o calor, a fin de perder su efecto tóxico, pero que conserva su inmunogenicidad.<sup>6</sup>

La vacunación es la aplicación de un producto inmunizante a un organismo, con objeto de protegerlo contra el riesgo de una enfermedad determinada.<sup>6</sup>

La vacunación universal es política sanitaria que tiene como objetivo lograr la protección de toda la población del país mediante la aplicación del esquema completo de vacunación. Establece los criterios y procedimientos para lograr el control, la eliminación y la erradicación de enfermedades evitables por vacunación.<sup>6</sup>

La vida útil de los biológicos es el periodo de vigencia de los biológicos determinado en los diferentes niveles de la cadena de frío, o en su fecha de caducidad si ésta ocurre antes.<sup>6</sup>

## **5.4 Bases inmunitarias de las vacunaciones**

### **5.4.1 Células del sistema inmunológico**

Todas las células del sistema inmunológico se originan en la médula ósea a partir de un progenitor común, la célula primordial pluripotente y a su vez de esta célula provienen el progenitor mieloide común y progenitor linfoide común (Figura 1).<sup>10</sup>



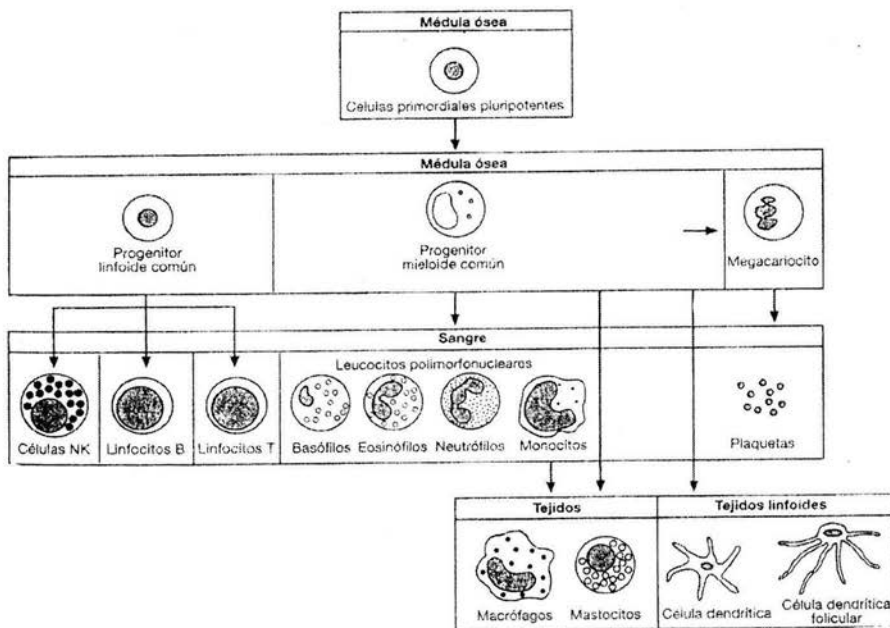


Figura 1. Principales elementos celulares del sistema inmunológico. (Salleras L, S.<sup>10</sup>)

#### 5.4.2 Moléculas del sistema inmunológico

Considerando las principales moléculas que forman parte del sistema inmunológico, tenemos como ejemplo al complemento, anticuerpos, citosinas, entre otras.

El complemento y los fagocitos son los mecanismos efectores más importantes de la inmunidad innata. El sistema del complemento está constituido por más de 30 proteínas, la mayoría de la sangre y algunas de membranas que se activan en cascada mediante dos vías principales; la alternativa al contacto con pared bacteriana y la clásica en presencia de anticuerpos. Ambas tienen como componente central el C3 y convergen en una fase terminal o lítica en la que se forma el complejo de ataque de membrana (MAC) cuya misión es la lisis del agente patógeno que origina la activación del sistema.<sup>11</sup>

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glucoproteínas sintetizadas por linfocitos B. Todas las clases de inmunoglobulinas tienen una estructura básica similar consistente en dos péptidos heterodímeros idénticos unidos por puentes disulfuro (Figura 2). Cada heterodímero está compuesto por una cadena pesada y una ligera unidas también por puentes disulfuro. Cada cadena se subdivide a la vez en 2 cadenas ligeras o 3-4 cadenas pesadas estructuralmente relacionadas de péptidos compuestos de unos 110 aminoácidos, cada uno denominado dominio, unidos entre sí por puentes disulfuro.<sup>11</sup>

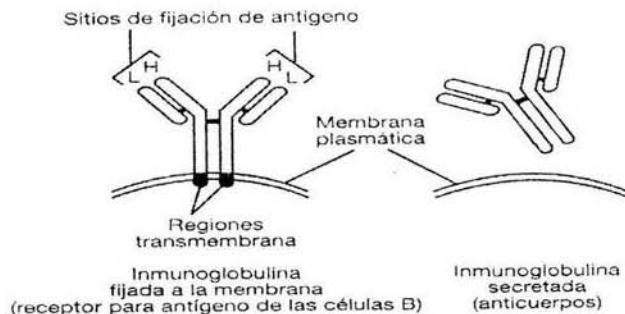


Figura 2. Inmunoglobulina fijada a la membrana del linfocito B e Inmunoglobulina secretada (Salleras L, S. (De Parslow TG)<sup>10</sup>)

El dominio aminoterminal de las cadenas pesadas y ligeras constituye la región variable de la inmunoglobulina. En ella se halla el lugar de reconocimiento antigénico. La región carboxiterminal de la molécula pertenece a las subclases estructurales que define el isotipo de la inmunoglobulina.<sup>11</sup>

Su función antiinfecciosa es en el espacio extracelular. La mayoría de las bacterias causantes de enfermedades infecciosas en el hombre se multiplican en el espacio extracelular y las que son toxigénicas vierten en él sus toxinas. Los anticuerpos componentes efectores de la respuesta inmunitaria humoral, destruyen a los microorganismos extracelulares y evitan la diseminación de una célula a otra.<sup>11</sup>

Los anticuerpos contribuyen de tres formas diferentes a la defensa antiinfecciosa específica: a) Neutralización de toxinas bacterianas en su etapa extracelular y neutralización de los virus; b) Opsonización de bacterias extracelulares, que facilita su posterior ingestión y destrucción por fagocitos y activación del complemento.<sup>11</sup>

De forma genérica se recibe la denominación de citosinas a un conjunto de proteínas de bajo peso molecular, la mayoría de ellas péptidos o glucoproteínas que son sintetizadas por las células del sistema inmunológico al producirse la respuesta inmunitaria frente a un antígeno inmunógeno (agente patógeno, toxinas, etc.). Son producidas en un primer instante por la activación celular y su vida media es muy corta.<sup>11</sup>

#### 5.4.3 Neutralización de toxinas bacterianas

La forma más simple que utilizan los anticuerpos para proteger al organismo humano de los agentes patógenos y sus productos es fijándose a ellos y en consecuencia, bloqueando su acceso a las células que puedan destruir o infectar. Los anticuerpos antitóxicos se fijan a las exotoxinas bacterianas a las cuales neutralizan impidiendo su interacción con las células del huésped que presentan receptores para la

toxina, lo que impide que pueda llevarse a cabo su acción patógena; la toxina no fijada por los anticuerpos puede reaccionar con estos receptores, mientras que la toxina que forma complejo con los anticuerpos no puede hacerlo. Este es el mecanismo protector frente a tétanos y difteria.<sup>2</sup>

### 5.5 Principios básicos de la inmunización

Desde el nacimiento, el individuo tiene la capacidad de responder a estímulos antigénicos. La inmunidad que resulta posterior a la vacunación, le evita al individuo riesgos para la salud y en algunos casos protección que no podría adquirir de otra manera.<sup>11</sup>

Los mecanismos de defensa antiinfecciosa del organismo humano son complejos. En el medio ambiente está presente una gran cantidad de microorganismos patógenos para el hombre, y este no podría sobrevivir si no dispusiera de mecanismos de defensa capaces de impedir su entrada en el organismo y de impedir su crecimiento y multiplicación una vez que han logrado atravesar las barreras externas cutáneo o mucosas.<sup>11</sup>

*Inmunidad Innata o no adaptativa:* El primer escalón de defensa frente a la infección lo constituyen la piel y las mucosas, que actúan como barreras fisicoquímicas. Los microorganismos que logran atravesar las defensas externas y penetrar en el interior del cuerpo se encuentran con un amplio conjunto de moléculas y células que actúan de forma rápida e inespecífica contra los agentes infecciosos invasores.<sup>12</sup>

Los mecanismos efectores son de dos tipos: Inmediatos o inducidos (figura 3). Los mecanismos inmediatos actúan después de la entrada del agente infeccioso y se basa en la activación del complemento por la vía alternativa y en la capacidad fagocítica de los macrófagos. Los inducidos no actúan inmediatamente, sino que son inducidos por las sustancias producidas por la activación continuada del complemento y por las citosinas segregadas por los macrófagos.<sup>12</sup>

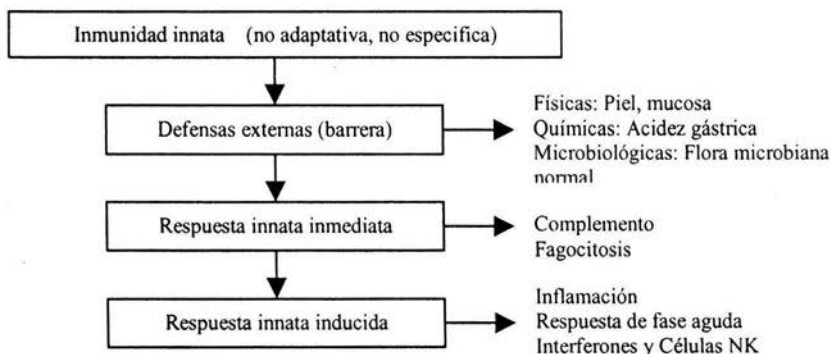


Figura 3. Mecanismo de defensa antiinfecciosa del organismo humano (tomada de Salleras L, S.<sup>3</sup>)

*Inmunidad adquirida, adaptativa o específica:* Es la respuesta inmunitaria específica donde intervienen dos tipos de linfocitos, los B y los T (Figura 4).<sup>12</sup>

Los linfocitos B, al replicarse y diferenciarse después de la estimulación antigénica, producen y secretan anticuerpos de diferentes isotipos (IgM, IgG, IgA e IgE) siendo los responsables de la respuesta inmunitaria humoral. Los linfocitos T son los responsables de la respuesta inmunitaria celular mediante la cual se lleva a cabo a través de tres subtipos celulares (Th1, Th2 y Tc).<sup>12</sup>

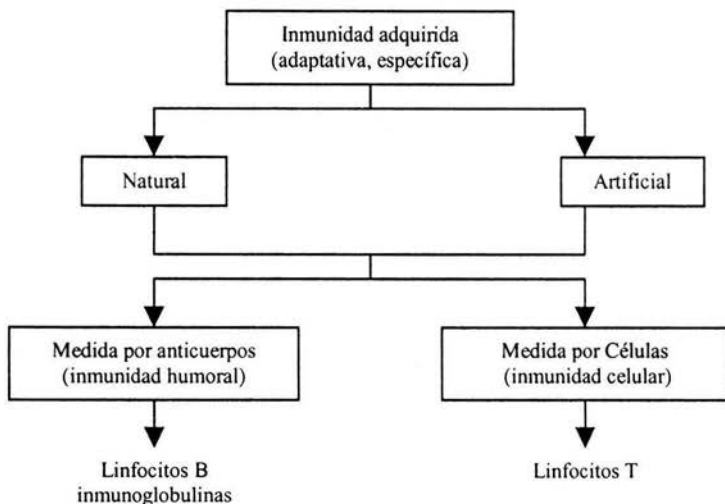


Figura 4. Mecanismo de defensa antiinfecciosa del organismo humano (tomada de Salleras L, S.<sup>2</sup>)

La respuesta inmunitaria específica frente a los agentes causantes de enfermedades infecciosas se desarrolla en tres fases:

1. - Reconocimiento del antígeno: los antígenos son detectados por los linfocitos de los clones específicos del antígeno.

2. - Activación de los linfocitos: en respuesta al estímulo antigénico los linfocitos proliferan y se diferencian en células efectoras con capacidad para destruir al patógeno invasor.

3.- Función efectora: los linfocitos efectoras destruyen directamente o indirectamente al invasor.<sup>12</sup>

A pesar de la constante exposición a agentes infecciosos, el organismo humano previene y combate las infecciones mediante dos grandes tipos de mecanismos, uno no

específico y otro específico, que trabajan de forma independiente o con mayor frecuencia, de forma conjunta. Hay, pues dos grandes tipos de mecanismos de defensa antiinfecciosa: *inespecífica*, también denominada inmunidad innata o no adaptativa cuyos principales elementos celulares efectores son los fagocitos (macrófagos y leucocitos polimorfonucleares) y las células natural killer o citotóxicas naturales (NK), y el *específico*, denominado también inmunidad celular cuyos principales elementos son los linfocitos T y B.<sup>11</sup>

El término inmunización es más amplio que el de vacunación, y hace referencia al proceso de inducción o provisión de la inmunidad artificial a un individuo sano susceptible mediante la administración de un producto inmunobiológico. La inducción artificial de la inmunidad sigue de cerca los dos principios básicos bien comprobados que utiliza la naturaleza:

- Inmunizaciones activas: Consiste en inducir y producir la respuesta inmunitaria específica protectora y estimular las defensas inmunitarias mediante la administración de vacunas o toxoides.<sup>9</sup>

- Inmunizaciones pasivas: Consiste en proporcionar una protección temporal administrando sustancias inmunitarias obtenidas fuera del organismo como inmunoglobulinas, antitoxinas o sueros.<sup>9</sup>

Métodos de Inmunización Activa: Las principales técnicas son:

- 1) Empleo de agentes infecciosos vivos, generalmente atenuados (por ejemplo: sarampión).

- 2) Empleo de agentes inactivos, de extractos o toxinas destoxificadas de los mismos, o de antígenos específicos obtenidos por recombinación genética (por ejemplo: virus de la hepatitis B).<sup>9</sup>

Métodos de Inmunización Pasiva: Las principales técnicas son:

- 1) Inmunoglobulina sérica humana convencional para uso general (por ejemplo:  $\gamma$ -globulina para administración intramuscular o intravenosa).

- 2) Inmunoglobulina sérica especial con una cantidad conocida de anticuerpos contra determinados agentes infecciosos (por ejemplo: inmunoglobulina de la hepatitis B o de la varicela-zoster).

- 3) Sueros y antitoxinas de animales.

Los factores determinantes de la respuesta inmunitaria son el carácter y la intensidad de la respuesta del huésped a las vacunas y los toxoides, las propiedades del antígeno y

de la vía de administración, la velocidad de degradación del antígeno, los rasgos genéticos del receptor y otros factores del huésped, unos conocidos y otros no.<sup>9</sup>

Se determina que la rapidez de repuesta inmunitaria a las vacunas depende de la vía de administración. Una vacuna administrada por vía parenteral puede no estimular a la IgA secretora de las mucosas y de la inmunización de la mucosa puede no inducir una buena respuesta general.<sup>9</sup>

## 5.6 Tipos de vacunas

Las vacunas pueden clasificarse desde dos puntos de vista: a) el microbiológico, según su composición y forma de obtención, y b) el sanitario, de acuerdo con los objetivos que se pretenden conseguir con su aplicación a los individuos y comunidades.<sup>13</sup>

### 5.6.1 Clasificación Microbiológica

Las vacunas que se comercializan en la actualidad se obtienen a partir de los propios agentes infecciosos, los cuales son sometidos a diferentes procedimientos para eliminar su poder patógeno pero manteniendo su capacidad inmunogénica.<sup>2</sup>

Desde el punto de vista microbiológico, las vacunas se clasifican en víricas y bacterianas. A su vez, cada una de ellas se clasifican en dos grupos: vivas atenuadas y muertas o inactivadas. Estas últimas se clasifican en enteras (contienen el virus o las bacterias completas) y subunidades (contienen antígenos secretados o fracciones víricas o bacterianas).<sup>2</sup>

Las *vacunas atenuadas* se consiguen por lo general mediante la selección de mutantes avirulentos o de virulencia atenuada, que son estables, presentan una capacidad de transmisión natural reducida, no están contaminadas y conservan su capacidad inmunogénica. Se obtiene mediante pases sucesivos en diferentes huéspedes animales y/o medios de cultivo. Este tipo de vacunas originan una infección inaparente o con síntomas mínimos que confieren inmunidad semejante a la producida por la infección natural. Los virus atenuados se multiplican en el organismo del individuo vacunado y generar respuesta inmunitaria de tipo humoral y celular, que deja una inmunidad intensa y de larga duración. Por este motivo para la primovacunación con vacunas de virus vivos atenuados, suele ser suficiente, por lo general, la administración de una sola dosis.<sup>2</sup>

Las *vacunas muertas o inactivadas* se preparan inactivando suspensiones de virus o bacterias virulenta por métodos físicos (calor) o químicos (formol, 1-propiolactona). En unos casos, las vacunas contienen los virus o las bacterias enteros o totales. En otros, se obtienen a partir de toxinas, es decir, de antígenos segregados (toxoides o anatoxinas), de fracciones víricas o de fracciones bacterianas. En estas vacunas la respuesta

inmunitaria es sólo de tipo humoral, y la inmunidad conferida es, por lo general, de menor intensidad y duración que la proporcionada por las vacunas vivas atenuadas.<sup>2</sup>

Las vacuna de anatoxinas o toxoides (toxinas que se vuelven atóxicas por la reacción del calor y el formol) son muy inmunogénicas. Como el antígeno no se multiplica en el organismo, la primovacuna requiere la administración de varias dosis, pero proporciona una inmunidad intensa y bastante duradera (aproximadamente 10 años).<sup>2</sup>

### 5.6.2 Clasificación Sanitaria

La clasificación sanitaria de las vacunas se basa en los objetivos epidemiológicos que se pretende alcanzar con la aplicación de las vacunaciones a la población. Para comprender esta clasificación es fundamental efectuar la distinción entre la inmunidad individual y la inmunidad de grupo o colectiva.<sup>1</sup>

*Inmunidad individual y de grupo:* Se dice que un individuo es inmune frente a un agente infeccioso cuando está protegido contra la entrada y el desarrollo o multiplicación de dicho agente en sus tejidos. Para la mayoría de las enfermedades, la forma más eficaz de inmunidad es la que se desarrolla después de padecer la infección clínica o inaparente. Para muchas de las enfermedades propias de la infancia, esta inmunidad desarrollada de forma natural protege durante toda la vida. Para otras, la inmunidad conferida sólo protege contra el serotipo específico causante de la infección, pudiendo el individuo ser infectado posteriormente por cualquiera de los otros serotipos del mismo antígeno. Por último, para algunas el desarrollo de la enfermedad no implica la adquisición de inmunidad, por lo que puede volver a padecerse en el futuro.<sup>1</sup>

En relación con los objetivos epidemiológicos de las vacunaciones es preciso considerar dos grandes grupos de enfermedades interhumanas y las de reservorio no humano. En ambos grupos el objetivo de la vacunación es proteger al individuo vacunado contra la invasión del agente correspondiente. Pero en las enfermedades de reservorio humano y transmisión interhumana las vacunaciones no sólo proporcionan una protección individual sino también una protección colectiva comunitaria que contribuye a romper la cadena de transmisión y obtiene resultados superiores a la suma de las inmunidades individuales. Esta inmunidad colectiva protege a la comunidad del riesgo de una epidemia, confiere una protección indirecta a los individuos que no hayan sido vacunados como consecuencia de una contraindicación o de otra causa y hace posible la eliminación de la enfermedad cuando la tasa de inmunidad colectiva es suficiente para interrumpir la transmisión.<sup>1</sup>

*Vacunas sistemáticas y no sistemáticas:* Con objeto de proteger a los individuos susceptibles y también para obtener esta inmunidad de grupo o colectiva y así controlar o incluso eliminar las enfermedades de la comunidad, los servicios de salud pública de todos los países han recomendado la administración de forma sistemática de las vacunas

que han demostrado ser eficaces contra las enfermedades transmisibles de reservorio humano y transmisión interhumana.<sup>1</sup>

Las evaluaciones sistemáticas presentan un interés individual y comunitario por lo que están indicadas en toda la población, con excepción de los casos de contraindicación general o individual. En todo el mundo se aplican en el marco de los servicios de asistencia primaria en forma de programas de salud pública, financiados con fondos estatales, con el objetivo de obtener elevadas coberturas vacunales que garanticen elevados niveles de inmunidad de grupo, lo cual es fundamental para el control y en su caso la eliminación de la enfermedad.<sup>1</sup>

## 5.7 Requerimientos para la efectividad de las vacunas

Al ser un producto que se va a administrar a personas sanas para evitar una enfermedad, es especialmente necesario que las vacunas no sean sólo eficaces, sino también que carezcan de peligro.<sup>14</sup>

El objetivo de toda vacuna es inducir inmunidad específica que evite la invasión del microorganismo, eliminar a estos microorganismos que han entrado en el huésped y neutralizar las toxinas microbianas. Debido a que una vacuna eficaz como medida de salud pública necesita que la inmunidad sea duradera, la capacidad de las vacunas para estimular a los linfocitos T y B de memoria es una importante consideración a la hora de diseñar la vacuna. El éxito de la inmunización activa para erradicar las enfermedades infecciosas depende de muchos factores. Por ejemplo, las infecciones que están causadas por agentes poco infecciosos cuyos antígenos son relativamente poco variables, probablemente son más fácilmente controlables por la vacunación. Por otro lado, la variación antigénica, la existencia de reservorio de la infección animal o ambiental, y la alta infectividad de los microorganismos hace menos probable que la vacunación erradique una determinada enfermedad infecciosa. Se han utilizado muchos tipos de agentes infecciosos y de sus productos como vacunas.<sup>14</sup>

Para obtener una vacuna hay que aplicar una estrategia sistemática básica en cuatro pasos:

- 1) Identificación de un antígeno con poder protector utilizable
- 2) Determinar la forma de presentarlo al sistema inmunitario para que actúe eficientemente
- 3) Asegurar la inocuidad del preparado
- 4) Estudiar su eficacia en la población diana

Cada una de estas cuatro etapas es sencilla teóricamente, pero difícil en la práctica, sobre todo por los ensayos clínicos. Los avances inmunológicos nos han enseñado mucho sobre la organización y funcionamiento del sistema inmunológico, también hemos aprendido que el sistema inmunológico es complicado y que los detalles sobre la composición y la presentación del antígeno son esenciales para estimular la respuesta



inmunitaria deseada. La obtención de vacunas va más allá de la técnica y de la verificación de principios básicos sobre los costos de fabricación, las necesidades que se presiden en la salud pública y la probabilidad de que el producto sea usado y se venda, dada la complejidad científica que exige, los costos de fabricación de una vacuna son elevados y su éxito dudoso, lo que añade más riesgos a la decisión de obtenerla. Es una pena que la única consecuencia segura de la incertidumbre que rodea a la obtención de una vacuna sea su mayor costo. Desde el National Vaccine Injury Compensation Program, la probabilidad de que se produzca reacciones desfavorables asociada al empleo de una vacuna es otra dificultad más que viene a añadirse al riesgo y a las necesidades de financiamiento que exige la obtención de una vacuna.<sup>14</sup>

Comprobación de las Vacunas: Normalmente, los primeros estudios para la obtención de una vacuna se llevan a cabo en modelos animales, si se dispone de ellos, para demostrar la predicción de reacciones inmunitaria, su capacidad de proteger al huésped y su inocuidad relativa. El último paso es probar la vacuna en seres humanos. Por tanto, cuando los primeros datos *in vitro* y en animales parecen comprometidos, se administran dosis progresivamente creciente de la vacuna a un pequeño número de personas para estudiar la respuesta inmunitaria y la inocuidad. Luego, se efectúan ensayos clínicos en un gran número de personas para demostrar la eficacia de la vacuna inoculando la cepa virulenta a un grupo de voluntarios infectados. Después de los ensayos clínicos en la población puede pedirse la autorización.<sup>14</sup>

Otro motivo de interés en la investigación de las vacunas es su valor real como agente protector, los modelos animales para determinar su potencia y efectividad eran vistos como inadecuados con respecto a gentes infecciosos exclusivos del hombre o cuando las manifestaciones clínicas de esas especies no coincidan con la de los humanos.

Las pruebas serológicas *in vitro* para demostrar anticuerpos específicos eran inicialmente muy elementales y carecían de la estandarización adecuada. La única prueba objetiva de su eficacia era la confrontación epidemiológica cuando sobrevivía un brote o cuando los vacunados se trasladaban a una zona endémica y resultaba que el número de casos, eran significativamente menor que la incidencia en los individuos expuestos o no vacunados.<sup>2</sup>

## 5.8 Características generales de las vacunas

Las dos propiedades principales que debe reunir una vacuna son la seguridad y la eficacia protectora. Esta última, a su vez, está íntimamente relacionada con la inmunogenicidad.<sup>2</sup>

Otras cualidades importantes son la estabilidad frente a los factores ambientales, en especial la temperatura y la luz, y un costo de producción bajo, sin ellas es difícil que una vacuna pueda llegar a toda la población objeto de los programas de vacunaciones, sobre todo en los países subdesarrollados.<sup>2</sup>

A continuación se analizarán las cinco propiedades fundamentales que debe reunir una vacuna para su aplicación efectiva en una población: seguridad, inmunogenicidad, eficacia protectora, eficiencia y estabilidad.<sup>2</sup>

### 5.8.1 Seguridad

La seguridad es una propiedad fundamental de cualquier vacuna. Las vacunas deben ser seguras incluso en los individuos inmunocomprometidos, lo cual no quiere decir que no puede tener efectos secundarios, de hecho, ninguna vacuna está completamente exenta de reacciones adversas o complicaciones vacunales.<sup>2</sup>

El grado de seguridad exigido a una vacuna está en relación con la gravedad de la enfermedad que se evita con su administración y, de forma especial, con la percepción que la población tiene del impacto y mortalidad.<sup>2</sup>

La evaluación de la seguridad de las vacunaciones se efectúa junto con la de eficacia, en estudios con voluntarios y en ensayos clínicos controlados previos a la obtención de la licencia para su registro y comercialización. Pero como el número de personas vacunadas en estos estudios es muy bajo, una vez registrada y comercializada la vacuna debe continuarse la evaluación de la seguridad mediante la vigilancia de los efectos adversos y las complicaciones vacunales en situaciones rutinarias de aplicaciones a un millón o más de receptores como mínimo.<sup>2</sup>

### 5.8.2 Inmunogenicidad

La inmunogenicidad es la capacidad de un agente infeccioso de inducir inmunidad específica. El mismo concepto es aplicable a las vacunas destinadas a la prevención de las infecciones producidas por dicho agente infeccioso.<sup>2</sup>

La eficacia de una vacuna está en función de su inmunogenicidad, es decir, de la respuesta inmunitaria específica generada. Ésta depende a su vez de la respuesta de un solo tipo celular, el linfocito, que al activarse muestra dos características fundamentales: especificidad y memoria.<sup>2</sup>

Los linfocitos B, al replicarse y diferenciarse después de la estimulación antigénica, producen y secretan anticuerpos de diferentes isotipos (IgM, IgG, IgA e IgE). Los linfocitos T son los efectores de la respuesta inmune mediada por células o inmunidad celular.<sup>2</sup>

Según Mims et al, para que una vacuna sea inmunogénica y eficaz debe cumplir con los siguientes puntos:

1. Debe inducir el tipo adecuado de resistencia inmunitaria.
2. Debe inducir una respuesta inmunitaria en el lugar adecuado.

3. Debe inducir una respuesta inmunitaria frente al antígeno o los antígenos adecuados.
4. Debe inducir inmunidad protectora de larga duración.<sup>2</sup>

### 5.8.3 Eficacia protectora

Es muy frecuente el uso de los términos eficacia, efectividad y eficiencia cuando se hace referencia a la evaluación de los resultados de las intervenciones preventivas y curativas y de los programas sanitarios aplicados a la comunidad.<sup>2</sup>

Al igual que los resultados positivos de las demás medidas preventivas o curativas, los resultados o beneficios de salud de las vacunas pueden apreciarse en dos planos: los individuos que se benefician de la vacuna aplicada en condiciones ideales (evaluación de la eficacia) y la población a la que estos pacientes pertenecen o población objeto, cuando la vacuna es aplicada en las condiciones reales o rutinarias de la práctica diaria asistencial o de desarrollo de los programas vacunales (evaluación de la efectividad). Además, estos resultados pueden relacionarse con los recursos movilizados para poner en marcha el programa de vacunaciones (evaluación de la eficiencia).<sup>2</sup>

Es importante establecer la distinción entre eficacia protectora de la vacuna y efectividad de las vacunaciones, ya que una buena eficacia protectora no siempre implica una efectividad satisfactoria. La evaluación de la eficacia de las vacunas debe ser, siempre que sea posible, experimental y realizarse mediante ensayos clínicos aleatoriamente. Solo así se tendrá la seguridad de que todos los factores que podrían influir en los resultados han sido controlados al distribuirse aleatoriamente entre el grupo de intervención y el grupo control.<sup>2</sup>

La evaluación de la efectividad solo debería llevarse a cabo cuando la vacuna haya demostrado previamente que es eficaz en un ensayo controlado, que será comunitario aleatorizado, es decir, sin excluir a los no cumplidores y aplicando la vacuna en condiciones reales o rutinarias de la práctica asistencial, si los individuos del grupo experimental no presenta mejores resultados que los del grupo control, hay que concluir que el programa no se ha aplicado correctamente o no ha sido aceptado por los individuos de la población a la que es ofrecido.<sup>2</sup>

Recientemente, Clemens et al han propuesto variar el enfoque de la evaluación para las vacunas de aplicación en los países subdesarrollados, prescindiendo de la evaluación de la eficacia protectora en condiciones ideales y pasando directamente a evaluar la efectividad de su aplicación en la población en las condiciones reales de estos países, valorando no sólo los beneficios de salud (efectividad), sino también los riesgos (seguridad) y los costos en relación con los beneficios obtenidos (eficiencia). Este sería un enfoque más pragmático que ayudaría a los planificadores a tomar decisiones sobre los programas de vacunaciones que se han de poner en marcha en los países en desarrollo. Para los países desarrollados, no obstante, debe seguirse el enfoque clásico y evaluar la eficacia protectora antes que la efectividad.<sup>2</sup>

#### 5.8.4 Eficiencia

Los costos de las intervenciones preventivas y curativas y de los programas sanitarios son cada vez más elevados, mientras que los recursos disponibles para su implementación son cada vez más escasos. De ahí que los planificadores y administradores sanitarios deban tener cada vez más en cuenta el factor económico a la hora de tomar sus decisiones sobre la puesta en marcha de nuevas vacunas, cuyo costo suele ser muy elevado, no escapa a esta regla general.<sup>2</sup>

La evaluación de la eficiencia se efectúa comparando los beneficios de la intervención aplicada a la población objeto en condiciones reales es decir la efectividad, con los costos de los recursos utilizados para su implementación. Es importante destacar que los beneficios de salud que se relacionan con los costos son los obtenidos en la población objeto en condiciones rutinarias o reales, es decir, los medidos por la efectividad. De hecho, la evaluación de la eficiencia presupone que se ha demostrado la efectividad del programa.<sup>2</sup>

#### 5.8.5 Estabilidad

Los antígenos vacunales son proteínas o polisacáridos capsulares que, al igual que otros productos inmunobiológicos, pueden sufrir degradación física tras la exposición a temperaturas elevadas. Las tasas de degradación varían de una vacuna a otra, pero, en general, para la conservación de la capacidad antigénica se recomienda conservar los preparados vacunales a temperatura entre 3° y 8°C. En los países tropicales, la pérdida de inmunogenicidad y de eficacia protectora por falta de mantenimiento de la cadena de frío es especialmente preocupante.<sup>2</sup>

Otros factores que pueden mermar la capacidad antigénica de las vacunas son la correlación, la luz y el tiempo transcurrido desde su fabricación.<sup>2</sup>

Las vacunas más inestables son las vivas atenuadas, y las menos inestables, los toxoides. Las vacunas inactivadas ocupan una posición intermedia.<sup>2</sup>

### 5.9 Disposiciones generales para la vacunación contra Difteria

Las vacunas con componentes diftéricos que deben ser aplicadas rutinariamente en el país, son:

- ✓ Toxoides DT; Td, contra difteria y tétanos
- ✓ Vacuna DPT, contra difteria, tos ferina y tétanos
- ✓ Vacuna DPT+HB+Hib, contra difteria, tos ferina, tétanos, hepatitis B e infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b

Y por disposición general, todas las vacunas que se apliquen en el territorio nacional, de origen mexicano o extranjero, deberán cumplir con las especificaciones de

calidad señaladas en cada caso por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos vigente.<sup>6</sup>

La especificación de algunos productos con fracción diftérica aplicados en territorio nacional, se describe a continuación:

- ✓ Vacuna Pentavalente (DPT+HB+Hib), contra difteria, tos ferina, tétanos, hepatitis B e infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b:

Cada dosis de 0.5 ml contendrá no menos de 30 U.I. de toxoide diftérico, no menos de 60 U.I. de toxoide tetánico, no menos de 4 U.I. de *Bordetella pertussis* inactivada, adsorbida en gel de sales de aluminio y 10 µg de proteína del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B recombinante. Así mismo cada dosis deberá contener no menos de 10 µg de polisacárido capsular purificado de *Haemophilus influenzae* tipo b, unido por covalencia a toxoide tetánico 30 µg.<sup>6</sup>

- ✓ Vacuna DPT, contra difteria, tos ferina y tétanos:

Cada dosis de 0.5 ml contiene no más de 30 Lf de toxoide diftérico, no más de 25 Lf de toxoide tetánico y no más de 15 UO de *Bordetella pertussis* adsorbidas en gel de sales de aluminio.<sup>6</sup>

- ✓ Toxoides DT; Td, contra difteria y tétanos:

DT: Cada dosis de 0.5 ml contendrá no más de 20 Lf de toxoide diftérico y no más de 20 Lf de toxoide tetánico adsorbidas en gel de sales de aluminio.<sup>6</sup>

Td: Cada dosis de 0.5 ml contiene un máximo de 5 Lf de toxoide diftérico y no más de 20 Lf de toxoide tetánico adsorbidos en gel de sales de aluminio.<sup>6</sup>

- ✓ Vacuna DPaT:

DPaT: Existe en dos presentaciones: cada dosis de 0.5 ml contiene >30 U.I. de toxoide diftérico, >40 U.I. de toxoide tetánico y el componente acelular de pertussis que contiene: 25 µg de toxina pertúsica, 25 µg de hemaglutinina fibrosa y 8 µg de pertactina; adsorbidas en fosfato de aluminio, o la vacuna acelular con cinco componentes contra tos ferina: cada 0.5 ml contiene: toxoide pertúsico 10 µg, hemaglutinina filamentosa 5 µg, fimbrias 5 µg, pertactina 3 µg y toxoide diftérico >30 U.I., toxoide tetánico >40 U.I., absorbidos en sales de aluminio 0.33 mg, contiene fenoxi-etanol 0.6% ± 0.1% v/v como agente de conservación.<sup>6</sup>

- ✓ Antitoxina diftérica equina:

Es una preparación que contiene las globulinas específicas capaces de neutralizar la toxina producida por *Corynebacterium diphtheriae*.<sup>6</sup>

## 5.10 Difteria

### 5.10.1 Manifestaciones Clínicas

Los síntomas y signos varían según el sitio y la intensidad de la infección, la edad del enfermo y la presencia o ausencia de algún proceso nasofaríngeo previo o de una enfermedad general simultánea.<sup>15</sup>

Algunas cepas de *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) elaboran la toxina diftérica, una proteína que puede producir miocarditis, polineuritis y otros efectos tóxicos sistémicos. La difteria respiratoria suele estar causada por *C. diphtheriae* toxigénico (tox+), mientras que la difteria cutánea se debe más frecuentemente a cepas no toxigénicas (tox-).<sup>15</sup>

El síntoma frecuente es el dolor de garganta. En la mitad aproximadamente de los enfermos se produce fiebre de 37.8° a 38.9°C y disfagia, y son menos frecuentes la tos, ronquera, escalofríos y rinorrea. Las manifestaciones generales se deben principalmente a los efectos tóxicos de la toxina diftérica. Los enfermos sin toxicidad muestran molestia y malestar asociado a la infección local, mientras que cuando la toxicidad es más grave, los pacientes pueden tener apatía, palidez y taquicardia que rápidamente empeora hasta el colapso vascular.<sup>15</sup>

La infección primaria en el aparato respiratorio es, casi siempre amigdalofaríngea seguida en orden descendente de frecuencia por la infección laringea, nasal y traqueobronquial. Es frecuente que se afecten muchos sitios y la propagación secundaria de la infección faríngea hacia arriba hasta mucosa nasal o hacia abajo hasta la laringe y el árbol traqueobronquial es mucho más frecuente que la infección primaria de tales sitios.<sup>15</sup>

### 5.10.2 Evolución y Pronóstico

La mayor parte de los casos de difteria aparecen en enfermos no inmunizados. El número de crisis, la gravedad del proceso y el riesgo de complicaciones son mucho menores en enfermos inmunizados. Las seudomembranas pueden seguir creciendo durante el día siguiente a la administración de antitoxina. Días después y hasta una semana como máximo se vuelven más blandas, se adhieren menos, dejan de confluir y finalmente desaparecen cuando la mucosa normal se regenera. En la etapa preantibiótica *C. diphtheriae* persiste en la faringe durante dos semanas aproximadamente, en la mitad de los enfermos y durante un mes o más en cerca de una quinta parte de los enfermos. La mortalidad se eleva a medida que aumenta la gravedad del proceso local, cuadros más extensos en la formación de las seudomembranas y cuando mayor es la demora entre el comienzo del proceso local y la administración de antibiótico. La mortalidad es máxima en la primera semana de la enfermedad.<sup>15</sup>

La tasa de mortalidad y el riesgo de aparición de miocarditis o de neuropatía periférica son significativamente menores en la difteria cutánea que en la difteria respiratoria.<sup>15</sup>

### 5.10.3 Agente Etiológico

*C. diphtheriae* recibe su nombre del griego “*coryne*” = cubos; y “*diphthera*” = piel o membrana; resaltando tanto su apariencia microscópica como el signo patognomónico de infección causada por el microorganismo.<sup>16</sup>

*C. diphtheriae* se ha relacionado toxonómicamente con las micobacterias y las nocardias debido a la presencia de similitudes en sus componentes de pared celular.<sup>16</sup>

*C. diphtheriae* es un bacilo grampositivo, aerobio, inmóvil, no esporulado, que se tiñe irregularmente (Figura 5). La bacteria mide de 2 a 6 µm de largo por 0.5 a 1 µm de ancho, con forma de porra más abultada por un extremo y que con frecuencia se dispone en racimos (en letras chinas) o en paralelo (en empalizada) *C. diphtheriae*, cuando se halla en medios especiales de cultivo que contienen telurita potásica, forma colonias de color gris a negro. Se distinguen tres variedades, llamada *gravis*, *mitis* e *intermedius*, según sea la morfología de sus colonias, su actividad hemolítica, las reacciones de fermentación de los azúcares u otras pruebas bioquímicas. Ambas cepas, la tox+ y la tox- originan infecciones y las cepas tox+ de cualquiera de los tres biotipos pueden acarrear una enfermedad grave. El biotipo al que pertenece una determinada cepa de *C. diphtheriae* puede determinarse por tipificación por fagos, análisis de polipéptidos bacterianos y otros patrones de restricción de ADN, pruebas de hibridación del ADN o reacciones en cadena de la polimerasa con sonda especificadas, ribotipaje u otros métodos.<sup>5,16</sup>



Figura 5: *Corynebacterium diphtheriae* por microscopía electrónica<sup>5</sup>

El gen de la toxina diftérica está situado en corinófagos específicos, *C. diphtheriae* no toxigénico puede adquirir la capacidad de producir toxina diftérica a través de la infección por fagos tox+ proceso que se denomina fagoconversión. El desarrollo de *C. diphtheriae* puede obtenerse contando con un medio pobre en hierro, imitando al que existe en los tejidos del huésped, favoreciendo la síntesis de la toxina diftérica y la expresión de un sistema de captación de hierro de gran afinidad dependiente de sideróforos.<sup>16</sup>

#### 5.10.4 Epidemiología e inmunidad

El hombre es el reservorio de *C. diphtheriae*. El microorganismo se transmite primariamente por contactos estrechos de los enfermos diftéricos o por portadores a sujetos susceptibles, pero el riesgo de transmisión a partir de los enfermos parece ser considerablemente mayor que en los portadores asintomáticos. Es menos frecuente el contagio a través de fomites y por vía indirecta, aunque *C. diphtheriae* puede seguir vivo en el ambiente durante semanas a meses. El periodo de incubación de la difteria respiratoria es, característicamente, de 2 a 5 días y rara vez sobrepasa los 8 días.<sup>15</sup>

La difteria cutánea, habitualmente es, una infección secundaria cuyos signos aparecen 7 días después, un promedio de (1 a > 21 días) del comienzo de las lesiones cutáneas primarias.<sup>15</sup>

En poblaciones de climas templados, la difteria afecta principalmente al aparato respiratorio; se observa a lo largo de todo el año, con mayor incidencia en los países fríos y suele deberse a *C. diphtheriae* tox+. Antes de la introducción de la inmunización activa, la difteria era una enfermedad infantil, afectaba hasta al 10% de los niños y a veces aparecía en epidemias devastadoras. La mayor parte de los lactantes son inmunes gracias al paso de la antitoxina IgG materna a través de la placenta, pero se vuelve susceptible hacia los 6 a 12 meses de edad. Un 75% aproximadamente, de las personas se vuelven inmunes hacia los 10 años, gracias a infecciones clínica o subclínica por *C. diphtheriae*. En casos no tratados, es corriente una mortalidad del 30 al 40 % y en algunas epidemias supera el 50%. El tratamiento con antitoxina reduce la mortalidad de los casos de un 5 a 10%.<sup>15</sup>

En las regiones tropicales, la difteria cutánea es más frecuente que la difteria respiratoria, ocurre durante todo el año y, a menudo, se observa como una infección secundaria complicada a otra dermatitis. Los cultivos de *C. diphtheriae* obtenidos a partir de lesiones cutáneas son más frecuentemente tox- que tox+.<sup>15</sup>

#### 5.10.5 Anatomía Patológica y Patogenia

*C. diphtheriae* infecta las mucosas, especialmente las del aparato respiratorio e invade también las lesiones descubiertas de la piel procedentes de picaduras de insectos o de traumatismos. En las infecciones originadas por *C. diphtheriae* tox+ la hiperemia y el edema inicial suelen ir seguidos de necrosis del epitelio e inflamación aguda. La coagulación de los espesos exudados fibrinospurulentos dan origen a una pseudomembrana y la reacción inflamatoria se extiende a los tejidos subyacentes. La pseudomembrana contienen gran cantidad de *C. diphtheriae*, pero rara vez se aísla de bacterias en la sangre o en los órganos internos.<sup>10,16</sup>

La toxina diftérica actúa localmente por vía general. En cantidades muy pequeñas ocasiona dermonecrosis, como sucede en la prueba de Schick y probablemente, la toxina contribuye a la formación de la pseudomembrana. La dosis letal de toxina diftérica



en sujetos no inmunizados y en animales muy susceptibles es, aproximadamente de 0.1 g/kg de peso. La toxina absorbida puede ocasionar miocarditis, neuritis y necrosis focal en otros órganos, como riñones, hígado y glándulas suprarrenales.<sup>15,16</sup>

La toxina diftérica de *C. diphtheriae* es un polímero extracelular que se sintetiza como una sola cadena de aproximadamente 61,000 daltones de peso molecular. Es desdoblada por las proteasas formando una toxina que consta de dos fragmentos, A y B, unidos por un puente disulfuro. El fragmento B, carboxilo-terminal de 40,000 d de peso molecular se une a un receptor de la membrana plasmática (una proteína integral de la membrana que corresponde al precursor de un factor de crecimiento ligado de heparina que se parece al factor de crecimiento epidérmico) situado en las células de los humanos o animales susceptibles y la toxina ligada se engloba por endocitosis mediada por el receptor. El fragmento A, aminoterminal de 21,150 d de peso molecular trasladado al otro lado de la membrana endosómica y liberado dentro del citoplasma, donde cataliza el paso de la porción ribosa difosfato de adenosina desde el dinucleótido nicotinamida adenina (NAD) a un residuo modificado de histamina (diftamida), sobre el factor 2 de elongación, inactivado así este factor A, en el citoplasma puede matar a una célula. Otras alteraciones metabólicas en las células intoxicadas son secundarias a la inhibición de la síntesis proteica.<sup>15</sup>

La toxina diftérica es sumamente tóxica de tal forma que se ha llegado a establecer que 200 a 300 moléculas de toxina son capaces de llevar a cabo la muerte de una célula en cultivo (y aún, de que una sola molécula es capaz de dañar irreversiblemente a una célula blanco); en esta actividad tóxica influyen la presión osmótica, el pH del medio, la concentración de aminoácidos y el estado metabólico de la célula susceptible.<sup>15</sup>

La susceptibilidad a la toxina depende de diversos factores y se ha llegado a establecer distintos dosis letales mínimas para los animales de experimentación; así, cobayos, conejos y humanos serían los organismos más susceptibles mientras que ratas y ratones son 1,000 veces más resistentes en virtud de no poseer los receptores celulares para la interacción con la subunidad B 160 ng/Kg de peso son letales para el hombre, conejos, cobayos y pájaros.<sup>15</sup>

#### 5.10.6 Diagnóstico de laboratorio

Posteriormente de la identificación del microorganismo pueden llevarse a cabo las pruebas de toxicidad *in vivo* o *in vitro* como son:

- A) Doble difusión en gel en presencia de antitoxina diftérica
- B) Prueba de Elek de inmunodifusión
- C) Neutralización en cobayos
- D) Ensayo en cultivo de tejidos
- E) Ensayo inmunoenzimático con el empleo de anticuerpos monoclonales

### 5.10.7 Epidemiología

Los seres humanos constituyen el único reservorio conocido para *C. diphtheriae*. Los modos principales de diseminación son a través de gotitas respiratorias por vía aérea y/o el contacto directo con secreciones respiratorias o exudados de lesiones cutáneas infectadas. Los fomites pueden jugar un papel importante en la transmisión y se han producido epidemias por leche contaminada. La mayor parte de las enfermedades del tracto respiratorio ocurren en los meses más fríos en climas templados asociadas con condiciones de hacinamiento en las viviendas y el aire seco y caliente.<sup>17</sup>

El estado del portador asintomático es importante para perpetuar la difteria endémica y epidémica; la inmunización reduce la probabilidad de que el individuo sea un portador. Los reservorios actuales para la enfermedad no están claros. En condiciones endémicas, el 3-5% de los individuos sanos pueden alojar el microorganismo en su faringe, pero en nuestro medio, donde la enfermedad es muy poco común, el aislamiento del microorganismo de los individuos sanos es muy raro. La infección cutánea, que en otro tiempo se pensaba que era principalmente un problema de los climas tropicales, ha provocado varias epidemias recientes en Europa y América del Norte sobre todo en alcohólicos e inmunodeprimidos.<sup>17</sup>

La incidencia y el patrón de difteria en el mundo occidental han cambiado notablemente en los últimos 50-75 años, pasando de 147,991 casos que se notificaron en Estados Unidos en 1920 a cifras de 5 casos en 1980.<sup>17</sup>

En el pasado el 70% de los casos se dieron en menores de 15 años de edad, pero la inmunización frente a difteria que se inició en los años 40-50's en la mayoría de los países industrializados modificó este patrón. En los años 90's se ha producido un descenso importante en los casos de difteria, concentrándose la mayor proporción de ellos en adultos. En los países en vías de desarrollo la inmunización se inició en los años 70's; con el Programa ampliado de inmunizaciones, la cobertura vacunal fue del 46% en el año 1985 y ha llegado al 79% en el año 1992. La OMS recuerda la importancia de conseguir coberturas vacunales que lleguen al 90% en todos los países, lo que permitirá en el futuro acercarnos al control y erradicación de esta enfermedad.<sup>17</sup>

La OMS comunica disminuciones semejantes pero menos notables en la incidencia mundial, aunque la enfermedad sigue siendo endémica en muchas áreas del tercer mundo.<sup>17</sup>

No es evidente la explicación completa para la disminución notable en la incidencia de la difteria. Los índices comenzaron a caer mucho antes del empleo general del toxoide y han ocurrido epidemias incluso en poblaciones muy inmunizadas. No obstante, los programas de inmunización han tenido un impacto importante. Sin embargo, en general se piensa que la inmunización con toxoide atenúa solamente los efectos locales y sistemáticos de la toxina sin prevenir la colonización local con el microorganismo. Si es así, debiera esperarse que la colonización se mantuviera elevada

en la población y las epidemias debieran ser de aparición continua entre la proporción considerable que se cree que se halla inadecuadamente inmunizada. Sin embargo, la aparición de la enfermedad es rara y la evidencia señala una incidencia muy baja de portadores, a pesar de los estudios serológicos durante los años 70's que muestran que se considera que existen niveles subprotectores de antitoxina sérica en un 25% de los niños y un 75% de los adultos.<sup>17</sup>

Varios factores pueden contribuir a nuestra buena fortuna actual: en primer lugar, aunque no está comprobado, la evidencia histórica sugiere que la difteria ha aparecido en ciclos que incluyen ondas de 100 años o más. En segundo lugar, es menos probable que los microorganismos aislados de los individuos inmunizados sean menos toxigénicos que aquellos provenientes de portadores no inmunizados. Si la producción de toxina no confiere ninguna ventaja al microorganismo en un huésped inmunizado, su costo metabólico podría poner a los microorganismos toxigénicos como una desventaja selectiva y de ese modo podría predecirse la pérdida de este atributo. Por otra parte, algunos autores piensan que la elaboración local de toxina, en ausencia de anticuerpos, aumenta la capacidad de un microorganismo para colonizar.<sup>17</sup>

La inmunización con toxoide podría contrarrestar esta ventaja selectiva de las cepas toxigénicas. Sin embargo, este mecanismo no puede ser el único factor para explicar la baja frecuencia de colonización con cepas no toxigénicas. Pueden existir algunos factores de virulencia distintos de la producción de toxina. Claramente, otros factores no definidos están contribuyendo al bajo índice actual de aislamiento del *C. diphtheriae* en otros países.<sup>17</sup>

#### 5.10.8 Tratamiento de la Difteria

En el caso del tratamiento, este debe cubrir varios aspectos:

- a) Empleo de antitoxina diftérica para contrarrestar a la toxina libre
- b) Terapéutica antimicrobiana
- c) Cuidados generales del paciente<sup>16</sup>

Se emplea antitoxina diftérica de origen heterólogo (generalmente obtenida a partir de caballo inmunizado), lo que puede ocasionar problemas de hipersensibilidad, por lo que se recomienda su empleo cuidadoso y efectuar pruebas de susceptibilidad a la antitoxina en los pacientes con difteria.<sup>16</sup>

El tratamiento con antitoxina debe instalarse lo más rápidamente posible, posteriormente a las pruebas de hipersensibilidad ante la sospecha de presencia a un cuadro de difteria, aun sin haberlo confirmado bacteriológicamente.<sup>16</sup>

Las principales manifestaciones de la difteria pueden prevenirse en los pacientes por medio de la inmunización con toxina inactivada. Por lo tanto, la documentación reciente de los niveles inadecuados de antitoxina en una gran proporción de la población

de adultos de América del Norte y Europa occidental han producido gran preocupación porque una cepa toxigénica introducida en estas poblaciones pudiera causar una epidemia importante de enfermedad. Los niveles séricos de antitoxina pueden medirse por pruebas de neutralización de la toxina en la piel de conejo, en cultivos de células Vero o por hemaglutinación, con resultados más o menos equivalentes. En general, se piensa que las concentraciones de 0,1-0,01 UI confieren protección, cifras que de forma habitual son siempre inferiores en la mayoría de los casos estudiados en epidemias.<sup>17</sup>

Las recomendaciones del Comité Asesor de Prácticas de Inmunización, publicadas en 1985 son las siguientes:

- Para niños desde 6 semanas hasta 7 años de edad; deben administrarse tres inyecciones intramusculares de 0.5 ml de vacuna para difteria-tétanos-tos ferina (DTP) a intervalos de 4-8 semanas, comenzando a las 6-8 semanas de vida, seguidas por una cuarta dosis 6-12 meses después de la tercera.<sup>9</sup>

- Para las personas de 7 años o más no vacunadas anteriormente; se administran dos dosis de 0.5 ml de Td con un intervalo de 4-8 semanas, seguidas de una tercera dosis 6-12 meses después. Como el componente pertúsico de la vacuna DTP es responsable de la mayoría de los efectos adversos y los riesgos de complicaciones de la tos ferina son mucho menores en estas edades, se omite ese componente de la vacuna. Además, como los sujetos mayores de 7 años tienen una incidencia mayor de reacciones locales y sistémicas a la concentración del toxoide diftérico presente en la vacuna DTP pediátrica (7-25 unidades de floculación límite (Lf), y se ha demostrado que una dosis menor del toxoide induce niveles protectores de antitoxina, la formulación de la vacuna Td contiene una concentración máxima de 2 unidades Lf de toxoide diftérico). Si la secuencia recomendada de inmunización primaria se interrumpe, puede completarse administrando las dosis restantes sin necesidad de volver a comenzar la serie.<sup>9</sup>

Inmunizaciones de refuerzo; los niños que han completado su inmunización primaria antes de los 4 años de edad, deben recibir una dosis de refuerzo de DTP a los 6 años. Las personas mayores de 7 años deben recibir inmunización de refuerzo con Td a intervalos de 10 años. Los pacientes deben recibir inmunización con toxoide en la etapa de convalecencia de su enfermedad porque la infección clínica no induce siempre niveles adecuados de antitoxina.

Los contactos íntimos cuyo estado de inmunización sea incompleto o incierto deben recibir rápidamente una dosis de toxoide apropiada para su edad, y deben completar la serie adecuada de inmunizaciones. Además, deben recibir tratamiento profiláctico con eritromicina o penicilina, mientras se esperan los resultados de los cultivos pretratamiento. Dadas estas medidas de prevención, se considera injustificado el uso profiláctico de antitoxina.<sup>9</sup>

### 5.10.9 Principales medidas a considerar

Es de gran importancia considerar algunas medidas de precaución para la prevención de infecciones de difteria, las cuales pueden agruparse como se indica a continuación:

1. Medidas educativas para informar a la población, especialmente a los padres de recién nacidos, sobre la necesidad de inmunización activa frente a ésta y otras enfermedades infecciosas.<sup>19</sup>

2. El control eficaz incluye inmunización activa con toxoide diftérico, además de un programa adecuado para conservar la inmunidad a largo plazo. La inmunización debe iniciarse en la lactancia con el toxoide diftérico.<sup>19</sup>

3. Los contactos adultos, cuya ocupación incluya la manipulación de alimentos, especialmente leche, o la relación con niños no inmunizados, deben ser excluidos de sus funciones hasta que los exámenes bacteriológicos aseguren que no son portadores.<sup>19</sup>

En todos los contactos íntimos es necesario obtener material de cultivos y deben ser sometidos a vigilancia aproximadamente durante siete días. Si los resultados de los cultivos son positivos, deberán recibir tratamiento con antibióticos.<sup>19</sup>

Los contactos previamente vacunados deben recibir una dosis de refuerzo de vacuna de toxoide diftérico, y en los contactos no inmunizados o inadecuadamente vacunados debe iniciarse una serie primaria de vacunación con Toxoide, DT, Td o DTP, según la edad.<sup>19</sup>

### 5.11 Posología de las vacunas diftéricas

La presencia de un solo caso obliga a desarrollar de inmediato la investigación epidemiológica y las correspondientes acciones de bloqueo vacunal.<sup>9</sup>

La aplicación de antitoxina diftérica y el tratamiento específico según sea el caso, se deberán realizar al momento en que se diagnostique por el cuadro clínico presentado, sin esperar resultados de laboratorio para su confirmación.<sup>9</sup>

En los menores de cinco años se deben aplicar las vacunas DPT+HB+Hib o DPT, según sea el caso, para completar esquemas, incluidos los refuerzos de la vacuna DPT. A los niños mayores de 5 años y personas consideradas contactos estrechos, incluyendo a médicos y enfermeras que los han atendido, se les aplicarán dos dosis de la vacuna Td, con un intervalo de 6 - 8 semanas entre cada dosis. Las acciones de control deberán notificarse en los formatos correspondientes, dentro de los tres días hábiles posteriores al término de la actividad.<sup>9</sup>

La vacuna antidifteria-tétanos (Td), contiene los toxoides diftérico y tetánico, obtenidos mediante tratamiento con formaldehído de las toxinas del *Clostridium tetani* y *Corynebacterium diphtheriae* adsorbidos en hidróxido de aluminio. Cada dosis de vacuna de 0,5 ml, está formulada para contener un mínimo de 40 unidades Internacionales (UI) de toxoide tetánico y 4 UI de toxoide diftérico adsorbidos. La vacuna se administra por vía intramuscular, aunque en situaciones especiales de personas con trastornos hemorrágicos puede administrarse por vía subcutánea.<sup>9</sup>

La vacuna se puede utilizar en las siguientes situaciones:

Vacunación primaria de personas no vacunadas previamente frente a tétanos y difteria: la primera dosis se administra en la fecha elegida, la segunda dosis alrededor de 1-2 meses después de la primera y la tercera 6-12 meses después de la segunda dosis.<sup>9</sup>

Para completar el ciclo primario de vacunación en personas que no completaron el mismo antes de los 7 años de edad.<sup>9</sup>

Como dosis de refuerzo, administrar cada 10 años a partir de la última dosis, en aquellos casos en los que se completó correctamente el ciclo de vacunación primaria.<sup>9</sup>

En el caso de heridas, con o sin administración simultánea de inmunización pasiva, dependiendo del tipo de herida y de los antecedentes vacunales del paciente.<sup>9</sup>

## **5.12 Control de calidad en productos biológicos**

### **5.12.1 Manejo y conservación de Productos biológicos**

Las instituciones y servicios de salud de los sectores público, social y privado en el país, deberán vigilar el funcionamiento adecuado de la red o cadena de frío en todas sus unidades de salud y áreas administrativas o de distribución, disponiendo para ello de equipo y personal capacitado en los procedimientos de almacenamiento, conservación, distribución, control y transporte de los biológicos.<sup>6</sup>

El transporte de los biológicos se deberá realizar del nivel nacional al nivel estatal, regional y local, empleando medios refrigerantes que mantengan la temperatura entre +2°C y +8°C.<sup>6</sup>

Los elementos que integran la cadena de frío sujetos a vigilancia estrecha son:

- Refrigeración (cámaras frías, refrigeradores y termos)
- Registro y control de temperatura
- Transporte
- Registro y control de biológicos
- Temperatura de almacenamiento de la cámara fría y de los refrigeradores, debiendo registrarse gráficamente, por lo menos cada ocho horas
- Control de los periodos de almacenamiento de los biológicos

Los periodos de almacenamiento de las vacunas en los diferentes niveles de la cadena de frío, son:

- Nivel nacional de 6 a 24 meses
- Nivel estatal de 4 a 6 meses, a partir de la fecha de recepción del nivel nacional
- Nivel jurisdiccional o zonal de 2 a 4 meses, a partir de la fecha de recepción del nivel estatal, sin sobrepasar 6 meses desde que se recibe en la entidad federativa
- Nivel local de 1 a 2 meses, a partir de la fecha de recepción del nivel jurisdiccional, sin sobrepasar 6 meses desde que se recibió en la entidad federativa
- El tiempo máximo que debe permanecer el biológico en la entidad federativa no debe sobrepasar los 6 meses (el periodo de tiempo entre los distintos niveles no es sumable)

El periodo de almacenamiento de los sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas dependerá de la fecha de caducidad de cada uno de los biológicos.<sup>6</sup>

### 5.12.2 Métodos de Productos Biológicos

Los métodos biológicos se emplean para ensayar ciertas sustancias cuya potencia no debe ser determinada por medios químicos y físicos. El principio por aplicar, siempre que sea posible, será de comparación con una preparación de referencia, con el fin de establecer cuanto de la muestra probada produce el mismo efecto biológico que una cantidad dada de la preparación patrón (la Unidad). Es una condición esencial de tales métodos de ensayo biológico que las pruebas con la preparación de referencia u con la muestra cuya potencia está siendo determinada, sean llevadas a efecto al mismo tiempo y en todos los otros aspectos, bajo condiciones estrictamente comparables.<sup>7</sup>

Cualquier estimación de la potencia derivada de un ensayo biológico, está sujeta a error aleatorio debido a la variabilidad de las respuestas con este propósito. Los métodos dan cuenta de los errores aleatorios inherentes al ensayo, pero suponen que los errores sistemáticos, no representa una fuente importante de variación en la estimación de la potencia. Puede emplearse métodos alternativos de diseño o de calculo, siempre y cuando no sean menos confiables que los descritos.<sup>7</sup>

No es posible establecer con certeza límites precisos para la potencia estimada de una preparación, con base en la evidencia de un ensayo biológico. Para muchos propósitos una confianza de 95 por ciento, es en la práctica, equivalente a certidumbre, y por lo tanto, este nivel de confianza ha sido usado en muchos casos.<sup>7</sup>

Las propias estimaciones del error están sujetan a error apreciable, a menos que se basen en un número muy grande de observaciones. Los cálculos pueden llevar, por lo tanto, a conclusiones falsas a menos que se tomen precauciones para evitar este hecho.<sup>7</sup>

Un ensayo biológico (o bioensayo) es un procedimiento para estimar la naturaleza o potencia de un material (o de un proceso), por medio de la reacción que sigue a su aplicación en la materia viva.<sup>7</sup>

Los ensayos biológicos se dividen en ensayos cualitativos o ensayos cuantitativos. Los ensayos cualitativos, con los que se pretende, por ejemplo, identificar una sustancia por medio de una reacción característica producida en una especie particular de entidad biológica, raramente presentan dificultad en su análisis estadístico. Por su parte, los ensayos cuantitativos, son semejantes a los métodos de medición física o de análisis químico cuantitativo, en que conduce a una determinación numérica de alguna propiedad del material (o proceso) por ser ensayado.<sup>7</sup>

Es muy importante que la respuesta sea definida sin ambigüedad, y debe estar tan íntimamente relacionada con el uso terapéutico del fármaco como sea posible. Ocasionalmente, cuando la respuesta conduzca a un bioensayo con poca confiabilidad, es preferible utilizar una respuesta que, aunque no este tan relacionada con el uso terapéutico, permite una mayor confiabilidad.<sup>7</sup>

La característica distintiva de los ensayos biológicos cuantitativos, es que la aplicación de estímulos idénticos a la materia viva, da lugar a respuestas no necesariamente iguales. Debido a la variabilidad inherente de las respuestas biológicas, es necesario recurrir a métodos estadísticos para obtener una mejor estimación de la potencia de un material, así como la precisión de la estimación.<sup>7</sup>

### 5.12.3 Análisis de potencia en vacunas contra Difteria "in vivo"

La fabricación de los productos biológicos, al igual que otros productos farmacéuticos, debe cumplir con los requisitos que establecen las Buenas Prácticas de Fabricación, sin embargo los productos biológicos presentan diferencias fundamentales con otro tipo de medicamentos, resultado de la variabilidad intrínseca debida a su propia naturaleza, al proceso de fabricación, a las materias primas utilizadas y a los métodos biológicos con los que son evaluados.<sup>7</sup>

Con la finalidad de disminuir esta variabilidad, principalmente en los métodos de evaluación, se utilizan patrones y preparaciones de referencia, y se ha hecho un intento por armonizar las metodologías de análisis.<sup>7</sup>

Uno de los análisis más importantes dentro del control de calidad de vacunas, es la prueba de potencia o inmunogenicidad, este estudio tiene la siguiente interpretación: Aquella dilución de la toxina que mezclada con 0.04 UI cause una reacción eritematosa característica de 10 mm de diámetro o mayor al final del período previamente establecido, contendrá 4Lr/100/0.1 ml.<sup>7</sup>



#### 5.12.4 Análisis de potencia en vacunas contra Difteria “*in vitro*”

El desarrollo e investigación en este campo ha logrado el uso de métodos inmunquímicos para caracterizar antígenos con la disminución o sustitución del uso de animales en las pruebas de potencia.<sup>7</sup>

Los métodos “*in vitro*” utilizando cultivos celulares como los de células Vero para la titulación de la antitoxina diftérica cuya interpretación se obtiene por medio del daño celular, se han utilizado por muchos años y se han encontrado para ser altamente específicos, reproductivos y sensibles, sin embargo en México aun no contamos con esta prueba dentro de nuestro grupo de pruebas estandarizadas y revisadas en la FEUM, sin embargo, este método no da resultados comparables a la prueba “*in vivo*”.

### 5.13 Conceptos estadísticos y epidemiológicos

Todo análisis estadístico debe cumplir con condiciones que deben ser exigidas por medio de una comparación de pruebas, de las cuales podemos considerar las siguientes:

**Validez:** Es el grado en que una prueba mide lo que se supone que debe medir. Considerar que un resultado de prueba no tenga que ser confirmado por procedimientos más complejos y rigurosos. La sensibilidad y la especificidad de una prueba son medidas de su validez.

**Reproducibilidad:** es la capacidad de una prueba para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares. La variabilidad biológica del hecho observado, la introducida por el propio observador y la derivada de la propia prueba, determinan la reproducibilidad.

**Seguridad:** La seguridad viene determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo.

Considerando el planteamiento de nuestro problema, podemos mencionarlo como una prueba dicotómica donde el resultado de la prueba pueda ser positivo o negativo. Interpretando este planteamiento, un resultado positivo se asocia con la seroneutralización de la toxina y un resultado negativo con la presencia de toxina causante de la intradermoreacción.

Los datos obtenidos permiten clasificar los resultados en cuatro grupos según una tabla 2x2 (Figura 7), en ella se enfrenta el resultado de la prueba de referencia o “gold standard” que vayamos a utilizar. El resultado de la prueba puede ser positivos o negativo. El análisis de su validez puede obtenerse calculando los valores de sensibilidad y especificidad.

		Estándar de oro	
		(+)	(-)
Prueba comparable	(+)	a (positivo - positivo)	b (positivo - negativo)
	(-)	c (negativo - positivo)	d (negativo - negativo)

Figura 7: Tabla 2x2 para clasificación de grupos de resultados.

A partir de esta agrupación de resultados, podremos obtener los parámetros descritos a continuación:

**Sensibilidad:** Es la probabilidad de clasificar correctamente un resultado, es decir, la probabilidad de que una reacción positiva se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad de la prueba para detectar la reacción.

**Especificidad:** Es la probabilidad de clasificar correctamente la ausencia de reacción es decir, la probabilidad de que una reacción negativa se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar la ausencia de reacción.

**Valores predictivos:** Los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten, por lo tanto, valorar la validez de una prueba. Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición de la reacción con respecto a los componentes de esta.<sup>22</sup>

**Valor predictivo positivo:** Es la probabilidad de existir reacción si se obtiene un resultado positivo. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de resultados positivos en la prueba que finalmente resultaron correctos.<sup>22</sup>

**Valor predictivo negativo:** Es la probabilidad de que una ausencia de reacción en la prueba esté realmente ausente.<sup>22</sup>

#### Cálculos:

$$\text{Sensibilidad (\%)} = 100 \cdot a / (a+c)$$

$$\text{Especificidad (\%)} = 100 \cdot d / (b+d)$$

$$\text{Prevalencia verdadera (\%)} = 100 \cdot (a+c) / n$$

$$\text{Prevalencia aparente (\%)} = 100 \cdot (a+b) / n$$

$$\text{Valor predictivo + (\%)} = 100 \cdot a / (a+b)$$

$$\text{Valor predictivo - (\%)} = 100 \cdot d / (c+d)$$

Otros valores que pueden resultar de interés en la evaluación de pruebas diagnósticas son:

**Valor global:** es la proporción reacciones bien clasificados por la prueba.

Positivos reales y detectados como tales + Negativos reales y detectados como tales / Total

Es decir:  $a+d / a+b+c+d$

**Malas clasificaciones:** es la proporción de individuos mal clasificados por la prueba.

Falsos positivos + falsos negativos / Total

Es decir:  $b + c / a+b+c+d$

Existe una relación directa entre estos parámetros, de manera que la prevalencia aparente depende de la prevalencia real y de la sensibilidad y especificidad de la prueba. Así, mediante esa relación podemos determinar la prevalencia real de reacción a partir de los resultados obtenidos en la prueba:

$$P \text{ real} = (P \text{ aparente} + \text{Especificidad} - 1) / (\text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1)$$

## CAPÍTULO 6

## 6. METODOLOGÍA

En método utilizado como estándar "*in vivo*" es la técnica de sero-neutralización de toxina, evaluado por reacción intradérmica en cobayo, y el método comparable "*in vitro*" es en medio de cultivo celular evaluando el daño celular por la toxina utilizando células VERO.

### 6.1 Material

El material utilizado para realizar la inmunización de los animales, la preparación de soluciones, la obtención del suero y el análisis de cada muestra por las dos metodologías, debe de ser nuevo y estéril con el fin de no presentar contaminaciones como es: Jeringas de varia medidas, tubos de ensayo, algodón, gasas, frascos, pipetas serológicas, micropipetas, guantes y matraces, considerando el equipo utilizado podemos mencionar como básico el uso de Centrífuga, incubadora, refrigerador, autoclave, potenciómetro balanza analítica y horno.

### 6.2 Material biológico

Dentro del material biológico es importante mencionar que los animales utilizados deben de contar con características y condiciones de salud controladas, y para tener una adecuada seroconversión al ser inmunizados es importante que cuenten con un peso de 450 a 550g.

Considerando que nuestras muestras serán analizadas con controles y estándares, se utilizarán de dos tipos, nacionales e internacionales los cuales son los siguiente: Patrón de toxina diftérica titulada en Lr/100, Antitoxina diftérica de Referencia titulada en UI/ml, Estándar Nacional de Antitoxina diftérica lote AD01, con potencia de (10 UI/ml) a una concentración de 0.25 UI/ml y Estándar Nacional de Toxina difterica lote TD01 a una concentración de 100,000 Lm/ml.

Finalmente dentro de material biológico contamos con células Vero que serán utilizadas para nuestra metodología *in vitro*

### 6.3 Preparación de Reactivos

Los reactivos utilizados para la realización de nuestras metodologías son los siguientes:

- ❖ Solución salina isotónica al 0.85% (SSI)

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml
- Disolver el reactivo en agua destilada, filtrar, distribuir en frascos y esterilizar en autoclave durante 15 min. A 121°C

- ❖ Alcohol al 70% v/v
 

Alcohol	70 ml
Agua destilada	30 ml
  
- ❖ Regulador de Glenny
 

Borato de sodio	3.16 g	
Acido bórico		4.66 g
Cloruro de sodio	5.50 g	
Agua destilada c.b.p.	2,000 ml	

Disolver los reactivos en el agua destilada, filtrar, pH final  $8 \pm 0.1$  y distribuir en frascos y esterilizar en autoclave durante 15 min. A 121°C.
  
- ❖ Medio 199 completo
 

Medio 199	94.0 ml
Suero fetal bovino	5.0 ml
Antibac	1.0 ml

#### 6.4 Características generales de la prueba de potencia

Inmunización con DPT, Td a una y media dosis humana a cada uno de 5 cobayos, los cuales se sangraran por punción cardiaca “*después de 4 semanas como mínimo y no más de 6 semanas*”, según técnica descrita en FEUM, valorando en una mezcla de los sueros de cobayo la concentración en cada lote de producto de antitoxina diftérica. La mezcla de sueros de los cobayos inmunizados deben contener no menor de 0.5 UI de antitoxina diftérica por mililitro de suero para nuestro método “*in vivo*” y para el método “*in vitro*” la dosis límite citopatológica para el método de células Vero es de 1 UI/ml (Lcd/1).

##### 6.4.1 Animales de experimentación

El procedimiento para la utilización de animales en nuestras metodologías es guiado por el PROY-NOM-062-ZOO-1999, el cual muestra las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y aplica a bioerios que manejen roedores, rata, ratón, cobayo entre otros.

Considerando el trato a los animales es importante que en todos los traslados se minimice el tiempo para evitar el riesgo de zoonosis, antropozoonosis, protegerlos contra condiciones climáticas externas, evitar el hacinamiento, brindar agua y alimento cuando esté indicado y protegerlos contra traumatismos.

Encierro primario: El equipo para alojar a los animales debe estar diseñado para facilitar el bienestar del animal, satisfacer las necesidades de la investigación y reducir o eliminar las variables experimentales. Todos los días se observará a los animales para detectar señales de comportamiento anormal, enfermedades, heridas o muerte.

**Alimento:** La composición general de un alimento para roedores de laboratorio en base seca para cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactación y mantenimiento.

**Alimentación y provisión de agua:** El alimento debe proporcionarse a libre acceso o en forma restringida dependiendo de las necesidades de la cepa, bioterio y de los procedimientos experimentales.

#### 6.4.2 Productos para analizar

Los productos utilizados dentro de la comparación de técnicas “*in vivo*” contra “*in vitro*” fueron tomados de tres laboratorios productores de vacunas, el número de muestras fueron de 100 distintos lotes evaluados en un año en las áreas del Laboratorio Nacional de Salud Pública, las vacunas utilizadas fueron aquellas con componentes diftéricos que deberán ser aplicadas en el país, como:

- ✓ Vacuna DPT+HB+Hib, contra difteria, tos ferina, tétanos, hepatitis B e infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b
- ✓ Vacuna DPT, contra difteria, tos ferina y tétanos
- ✓ Toxoides DT; Td, contra difteria y tétanos
- ✓ Vacuna DPaT.

#### 6.4.3 Área de experimentación

**Instalaciones para animales de laboratorio:** Las instalaciones para el alojamiento de los animales, son diseñadas con apego a las necesidades de la metodología, controlando el medio ambiente, a fin de evitar que variaciones de éste afecten la respuesta experimental, la temperatura debe ser estable en el rango de 20 a 21°C con una humedad relativa entre el 45 y el 55% una ventilación que permita un recambio de aire ambiental, la iluminación tiene efectos benéficos sobre la reproducción y conducta animal, este control se alcanza mediante buenas prácticas de cuidado animal.

### 6.5 Preparación de muestras

#### 6.5.1 Inmunización de los cobayos para la obtención de suero antidiftérico

Inyectar por vía subcutánea una y media dosis individual humana de la vacuna (0.75 ml) a no menos de 4 cobayos de 450 g a 550g de peso. Después de 4 semanas sangrar a los animales y separar el suero. Preparar una mezcla a partes iguales del suero de cada cobayo, y en ésta valorar la concentración de antitoxina presente, el mismo procedimiento realizarlo a los mismos animales a las 6 semanas después de la inmunización.

## 6.6 Titulación de la Toxina Diftérica

Se siguió el MPB 030 de la FEUM Titulación de la toxina diftérica en Lr/100 explicado en el **Anexo 1**.

La definición que consideraremos para entender la dosis Lr/100 de una toxina diftérica es: una unidad de combinación que consiste en la cantidad mínima de toxina que al ser mezclada con 0.01 UI de antitoxina estandar, es neutralizada parcialmente, quedando la suficiente toxina libre para producir una reacción eritematosa característica de aproximadamente 10 mm de diámetro, entre las 48 y 72 h posteriores a la inyección intradérmica de la mezcla en cobayos.

## 6.7 Metodología de Técnica “*in vivo*” (Lr/100)

### 6.7.1 Fundamento de la Prueba

Consideraremos la misma definición utilizada para la titulación de la toxina diftérica, en este caso considerando con antitoxina la muestra obtenida después de la inmunización y obtención de suero del cobayo, donde la dosis Lr/100 de una toxina diftérica es una unidad de combinación que consiste en la cantidad mínima de toxina que al ser mezclada con 0.01 UI de antitoxina (muestra de suero), es neutralizada parcialmente quedando la suficiente toxina libre para producir una reacción eritematosa característica de aproximadamente 10mm de diámetro, entre las 48 y 72 horas posteriores a la inyección intradérmica de la mezcla.<sup>21</sup>

### 6.7.2 Procedimiento para determinar la potencia de antitoxina diftérica

El procedimiento para la determinación de la potencia de la antitoxina diftérica (muestra) es tomado del MPB 055. Potencia de Toxoide Difterico descrito en la FEUM (Método 1) **Anexo 2**.

## 6.8 Metodología de Técnico “*in vitro*” (Células Vero LM/10,000)

### 6.8.1 Fundamento de la prueba

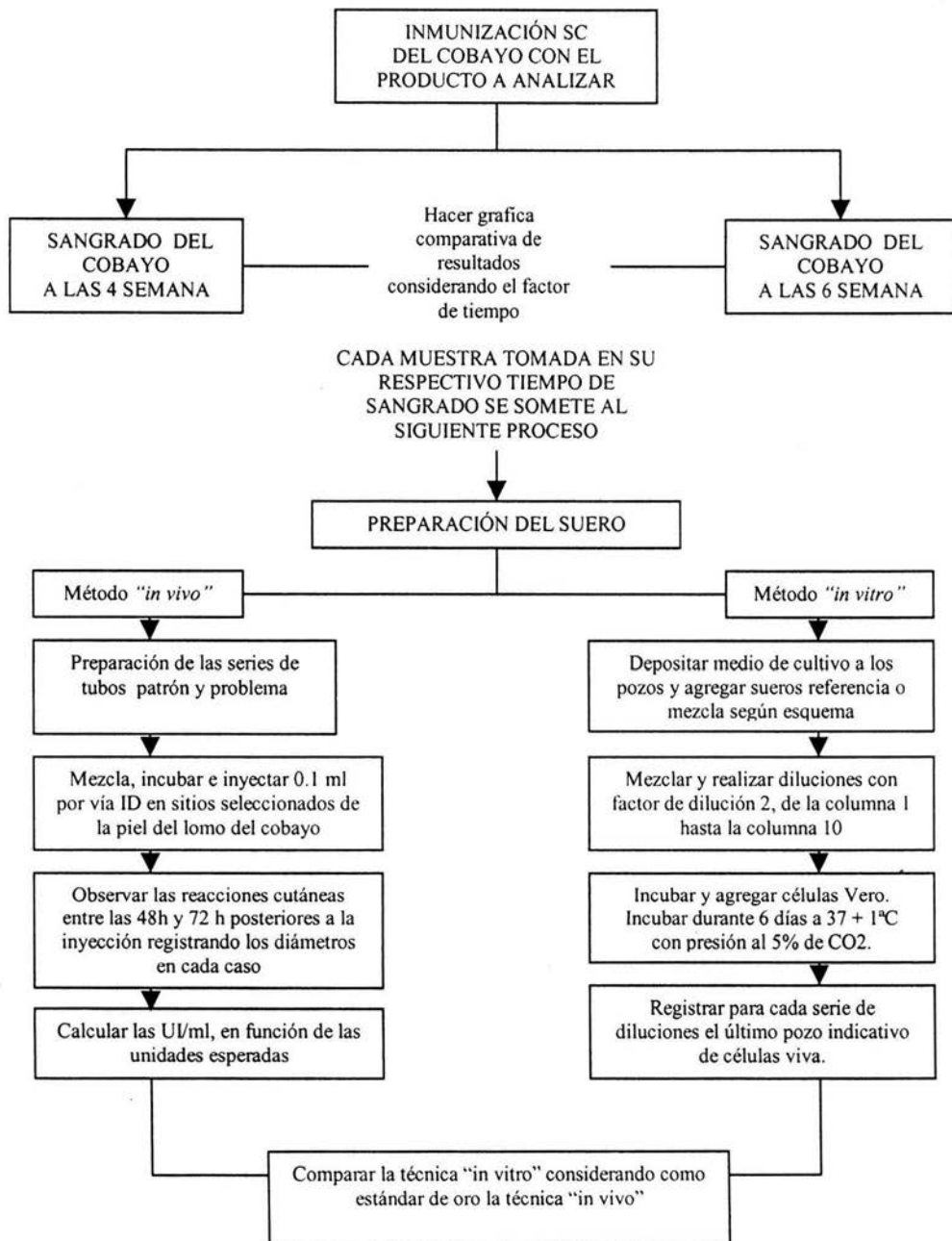
La dosificación Lm/10000 de esta prueba se define como la dosis más baja de toxina capaz de producir una inhibición metabólica en la presencia de 0.0001UI de antitoxina. Esta dosis corresponde aproximadamente a  $1 \times 10^{-4}$  Lf/50ml.

### 6.8.2 Procedimiento para determinar la Potencia de antitoxina diftérica

El procedimiento propuesto para la determinación de la potencia de la antitoxina diftérica (muestra) por el método *in vitro* es descrito en **Anexo 3**.



## 6.9 Esquema general para la comparación de técnicas propuestas



## CAPÍTULO 7

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Evaluación de potencia de la Fracción Diftérica por los dos métodos (4 semanas después de la inmunización)

Folio	Lr/100 (UI/ml)	Celulas VERO (UI/ml)	Folio	Lr/100 (UI/ml)	Celulas VERO (UI/ml)
1	2.25	0.062	69	3.5	0.2
2	1.75	0.183	70	3.5	0.8
3	1.5	0.093	71	3.5	0.2
4	2	0.12	72	1.5	0.1
5	1.5	0.067	73	3.5	0.1
6	5	0.25	74	3.5	0.1
7	2	0.25	75	2	-
8	5	0.21	76	1.5	0.08
9	2	0.062	77	7.5	0.8
10	1.5	0.5	78	2	0.005
11	2	0.06	79	3.5	-
12	1.5	0.01	80	3.5	1.6
13	3.5	0.125	81	3.5	0.4
14	3.5	0.125	82	5	0.4
15	0.75	0.062	83	7.5	-
16	0.75	0.15	84	10	0.4
17	5	0.062	85	10	0.4
18	1	0.015	86	10	-
19	5	1	87	7	0.4
20	3.5	0.25	88	7	0.0025
21	2	0.06	89	7.5	0.1
22	3.5	0.25	90	2	0.1
23	7.5	1	91	3.5	0.05
24	7.5	0.25	92	3.5	0.05
25	3.5	0.078	93	7.5	0.2
26	3.5	0.156	94	10.5	-
27	7.5	0.15	95	10.5	0.1
28	5	0.2	96	10.5	-
29	2	0.039	97	3.5	0.1
30	0.75	0.078	98	7.5	-
31	7.5	0.156	99	3.5	-
32	4.5	0.27	100	5	0.1
33	3	0.066	101	7.5	0.25
34	4.5	0.2	102	7.5	0.1
35	2	0.016	103	7.5	0.2
36	3	0.27	104	7.5	-
37	3	0.133	105	>10	0.2
38	3	0.2	106	> 10	0.1
39	3	0.4	107	7.5	-
40	2	0.1	108	> 10	-

41	5	-	109	3.5	0.1
42	1.5	0.05	110	7.5	-
43	2	0.1	111	7.5	0.2
44	2	0.4	112	>10	0.2
45	2	0.4	113	5	-
46	2	0.2	114	2	0.2
47	3.5	0.2	115	2	0.8
48	2	0.1	116	2.5	0.04
49	3.5	0.2	117	2	0.05
50	2	0.2	118	3.5	0.025
51	7.5	0.1	119	3.5	0.1
52	3.5	0.8	120	3.5	0.2
53	3.5	0.4	121	3.5	0.1
54	7.5	0.8	122	2.5	-
55	-	0.1	123	5	-
56	2	0.4	124	3.5	-
57	2	-	125	3.5	0.1
58	2	0.1	126	5	0.1
59	2.5	0.1	127	3.5	0.1
60	5	0.2	128	10	0.2
61	2.5	0.2	129	5	-
62	2.5	0.4	130	10	-
63	2	0.4	131	3.5	0.4
64	7.5	0.25	132	> 10	-
65	1.5	0.02	133	1.5	-
66	3.5	0.4	134	3.5	-
67	3.5	0.1	135	3.5	-
68	2	0.4			

(-) = Resultado invalido por falta de muestra suficiente

## 7.2. Evaluación de potencia de la fracción Diftérica por los dos métodos (6 Semanas después de la Inmunización)

Folio	Lr/100 (UI/ml)	Celulas VERO (UI/ml)	Folio	Lr/100 (UI/ml)	Celulas VERO (UI/ml)
1	1.5	0.046	69	2	0.12
2	1.75	0.417	70	3.5	0.5
3	1.5	0.25	71	3.5	1
4	1.33	0.075	72	3.5	0.2
5	1.16	0.125	73	3.5	0.2
6	5	0.62	74	3.5	0.4
7	1.75	0.156	75	2	0.8
8	-	-	76	0.75	0.0025
9	1.25	0.5	77	-	-
10	0.87	0.006	78	-	0.4
11	1.5	0.25	79	7.5	-
12	-	-	80	-	-
13	1.5	-	81	-	-

14	2	0.25	82	-	-
15	0.5	0.031	83	3.5	1.6
16	0.87	0.031	84	-	0.8
17	2.25	0.5	85	7.5	3.2
18	2.25	0.25	86	1.5	0.8
19	3.5	1	87	7.5	0.2
20	3.5	0.5	88	7.5	-
21	1.25	0.5	89	7.5	-
22	1.5	1	90	2	0.2
23	4.5	0.1	91	2	0.12
24	1.5	0.4	92	2	-
25	2.25	-	93	3.5	-
26	2.25	0.312	94	10	-
27	2.25	0.3	95	10	-
28	2.25	-	96	1.5	-
29	0.75	0.156	97	1.5	-
30	0.75	0.156	98	-	-
31	3.5	0.06	99	-	-
32	-	0.041	100	-	0.8
33	3	0.033	101	1.5	0.12
34	4.5	-	102	3.5	2
35	2.25	0.066	103	1.5	0.4
36	1.5	0.28	104	3.5	0.2
37	-	0.9	105	3.5	-
38	3	0.2	106	1.5	0.1
39	5	-	107	1.5	-
40	5	0.4	108	2	0.4
41	5	0.4	109	1.5	0.2
42	-	0.1	110	7.5	0.8
43	1.5	0.8	111	1.5	0.4
44	3.5	0.8	112	2	0.4
45	2	0.8	113	1.5	0.1
46	-	0.4	114	3.5	0.4
47	2	0.4	115	1.5	0.1
48	5	0.2	116	-	0.1
49	2	0.087	117	-	0.1
50	5	0.4	118	-	-
51	7.5	0.2	119	-	-
52	7.5	0.4	120	-	-
53	5	0.2	121	-	0.1
54	7.5	-	122	1.5	-
55	-	-	123	1.5	0.2
56	3.5	0.4	124	1.2	0.4
57	3.5	1	125	3.5	-
58	3.5	0.1	126	5	0.2
59	2	0.4	127	2.5	0.4
60	-	-	128	-	0.8
61	3.5	0.1	129	3.5	0.8

62	-	-	130	-	0.4
63	1.5	0.1	131	-	0.2
64	5	2	132	-	-
65	3.5	0.4	133	-	0.2
66	2	0.25	134	-	0.4
67	3.5	0.25	135	-	-
68	1.5	0.5			

(-) = Resultado invalido por falta de muestra suficiente

### 7.3. Resultados comparativos por los dos métodos de análisis para cada tipo de producto

- Vacuna DPT (4 y 6 Semanas)
- Vacuna Td (4 y 6 Semanas)
- Vacuna combinada (4 y 6 Semanas)

Considerando la razón de momios:

		Método "in vivo" (Lr/100)	
		(+)	(-)
Método "in vitro" (VERO)	(+)	a (positivo - positivo)	b (positivo - negativo)
	(-)	c (negativo - positivo)	d (negativo - negativo)

Donde:

a = Muestras positivas por el método "in vitro" y positivas por el método "in vivo"

b = Muestras positivas por el método "in vitro" y negativas por el método "in vivo"

c = Muestras negativas por el método "in vitro" y positivas por el método "in vivo"

d = Muestras negativas por el método "in vitro" y negativas por el método "in vivo"

### 7.3.1. Vacuna DPT (4 Semanas después de la inmunización)


Folio	Lr/100 (UI/ml)		Células VERO (UI/ml)		a	b	c	d
1	2.25	+	0.062	-			☼	
2	1.75	-	0.183	+		☼		
6	5	+	0.25	+	☼			
7	2	+	0.25	+	☼			
14	3.5	+	0.125	+	☼			
19	5	+	1	+	☼			
20	3.5	+	0.25	+	☼			
21	2	+	0.06	-			☼	
22	3.5	+	0.25	+	☼			
23	7.5	+	1	+	☼			
24	7.5	+	0.25	+	☼			
27	7.5	+	0.15	+	☼			
38	3	+	0.2	+	☼			
39	3	+	0.4	+	☼			
40	2	+	0.1	+	☼			
43	2	+	0.1	+	☼			
44	2	+	0.4	+	☼			
45	2	+	0.4	+	☼			
46	2	+	0.2	+	☼			
47	3.5	+	0.2	+	☼			
48	2	+	0.1	+	☼			
51	7.5	+	0.1	+	☼			
52	3.5	+	0.8	+	☼			
53	3.5	+	0.4	+	☼			
55	-		0.1	+				
56	2	+	0.4	+	☼			
57	2	+	-					
58	2	+	0.1	+	☼			
59	2.5	+	0.1	+	☼			
60	5	+	0.2	+	☼			
61	2.5	+	0.2	+	☼			
62	2.5	+	0.4	+	☼			
63	2	+	0.4	+	☼			

64	7.5	+	0.25	+	⊗			
66	3.5	+	0.4	+	⊗			
67	3.5	+	0.1	+	⊗			
68	2	+	0.4	+	⊗			
69	3.5	+	0.2	+	⊗			
70	3.5	+	0.8	+	⊗			
73	3.5	+	0.1	+	⊗			
83	7.5	+	-					
89	7.5	+	0.1	+	⊗			
96	10.5	+	-					
111	7.5	+	0.2	+	⊗			
112	>10	+	0.2	+	⊗			
116	2.5	+	0.04	-			⊗	
129	10	+	0.2	+	⊗			
			TOTAL		39	1	3	0

(+) Muestra positiva

(-) Muestra negativa

(⊗) Muestras pertenecientes al grupo indicado en la columna

 Muestra invalida por falta de muestra

Pruebas Invalidas	4
a (+) (+)	39
b (-) (+)	1
c (+) (-)	3
d (-) (-)	0
Total de Pruebas	47



7.3.2. Vacuna DPT (6 Semanas después de la Inmunización)


Folio	Lr/100 (UI/ml)		Células VERO (UI/ml)		a	b	c	d
1	1.5	-	0.046	-				☼
2	1.75	-	0.417	+		☼		
6	5	+	0.62	+	☼			
7	1.75	-	0.156	+		☼		
14	2	+	0.25	+	☼			
19	3.5	+	1	+	☼			
20	3.5	+	0.5	+	☼			
21	1.25	-	0.5	+		☼		
22	1.5	-	1	+		☼		
23	4.5	+	0.1	+	☼			
24	1.5	-	0.4	+		☼		
27	2.25	+	0.3	+	☼			
38	3	+	0.2	+	☼			
39	5	+						
40	5	+	0.4	+	☼			
43	1.5	-	0.8	+		☼		
44	3.5	+	0.8	+	☼			
45	2	+	0.8	+	☼			
46	-		0.4	+				
47	2	+	0.4	+	☼			
48	5	+	0.2	+	☼			
51	7.5	+	0.2	+	☼			
52	7.5	+	0.4	+	☼			
53	5	+	0.2	+	☼			
55	-		-					
56	3.5	+	0.4	+	☼			
57	3.5	+	1	+	☼			
58	3.5	+	0.1	+	☼			
59	2	+	0.4	+	☼			
60	-		-					
61	3.5	+	0.1	+	☼			
62	-		-					
63	1.5	-	0.1	+		☼		

64	5	+	2	+	☼				
66	2	+	0.25	+	☼				
67	3.5	+	0.25	+	☼				
68	1.5	-	0.5	+		☼			
69	2	+	0.12	+	☼				
70	3.5	+	0.5	+	☼				
73	3.5	+	0.2	+	☼				
83	3.5	+	1.6	+	☼				
89	7.5	+	-						
96	1.5	-	-						
111	1.5	-	0.4	+		☼			
112	2	+	0.4	+	☼				
113	-		0.1	+					
129	-		0.8	+					
				TOTAL		28	9	0	1

(+) Muestra positiva

(-) Muestra negativa

(☼) Muestras pertenecientes al grupo indicado en la columna

 Muestra invalida por falta de muestra

Pruebas Invalidas	9
A (+)(+)	28
B (-)(+)	9
C (+)(-)	0
D (-)(-)	1
Pruebas Validas	38
Total de Pruebas	47

### 7.3.3. Vacuna Td (4 Semanas después de la Inmunización)

Folio	Lr/100 (UI/ml)		Células VERO (UI/ml)		a	b	c	d
3	1.5	-	0.093	-				☼
4	2	+	0.12	+	☼			
5	1.5	-	0.067	-				☼
9	2	+	0.062	-			☼	
10	1.5	-	0.5	+		☼		
11	2	+	0.06	-			☼	
12	1.5	-	0.01	-				☼
13	3.5	+	0.125	+	☼			
15	0.75	-	0.062	-				☼
16	0.75	-	0.15	+		☼		
17	5	+	0.062	-			☼	
18	1	-	0.015	-				☼
25	3.5	+	0.078	-			☼	
26	3.5	+	0.156	+	☼			
28	5	+	0.2	+	☼			
29	2	+	0.039	-			☼	
30	0.75	-	0.078	-				☼
35	2	+	0.016	-			☼	
41	5	+	-					
42	1.5	-	0.05	-				☼
49	3.5	+	0.2	+	☼			
50	2	+	0.2	+	☼			
54	7.5	+	0.8	+	☼			
65	1.5	-	0.02	-				☼
71	3.5	+	0.2	+	☼			
72	1.5	-	0.1	+		☼		
76	1.5	-	0.08	-				☼
97	3.5	+	0.1	+	☼			
98	7.5	+	-					
100	5	+	0.1	+	☼			
101	7.5	+	0.25	+	☼			
105	>10	+	0.2	+	☼			
113	5	+	-					

117	2	+	0.05	-			☼	
120	3.5	+	0.2	+	☼			
121	3.5	+	0.1	+	☼			
118	3.5	+	0.025	-			☼	
119	3.5	+	0.1	+	☼			
127	3.5	+	0.1	+	☼			
126	5	+	0.1	+	☼			
128	5	+	-					
130	10	+	-					
131	3.5	+	0.4	+	☼			
133	1.5	-	-					
134	3.5	+	-					
135	3.5	+	-					
			TOTAL		18	3	8	9

(+) Muestra positiva

(-) Muestra negativa

(☼) Muestras pertenecientes al grupo indicado en la columna

 Muestra invalida por falta de muestra

Pruebas Invalidas	8
A (+)(+)	18
B (-)(+)	3
C (+)(-)	8
D (-)(-)	9
Pruebas Validas	38
Total de Pruebas	46

### 7.3.4. Vacuna Td ( 6 Semanas después de la Inmunización)


Folio	Lr/100 (UI/ml)		Celulas VERO (UI/ml)		a	b	c	d
3	1.5	-	0.25	+		☼		
4	1.33	-	0.075	-				☼
5	1.16	-	0.125	+		☼		
9	1.25	-	0.5	+		☼		
10	0.87	-	0.006	-				☼
11	1.5	-	0.25	+		☼		
12	-		-					
13	1.5	-	-					
15	0.5	-	0.031	-				☼
16	0.87	-	0.031	-				☼
17	2.25	+	0.5	+	☼			
18	2.25	+	0.25	+	☼			
25	2.25	+	-					
26	2.25	+	0.312	+	☼			
28	2.25	+	-					
29	0.75	-	0.156	+		☼		
30	0.75	-	0.156	+		☼		
35	2.25	+	0.066	-			☼	
41	5	+	0.4	+	☼			
42	-		0.1	+				
49	2	+	0.087	-			☼	
50	5	+	0.4	+	☼			
54	7.5	+	-					
65	3.5	+	0.4	+	☼			
71	3.5	+	1	+	☼			
72	3.5	+	0.2	+	☼			
76	0.75	-	0.0025	-				☼
97	1.5	-	-					
98	-		-					
100	-		0.8	+				
101	1.5	-	0.12	+		☼		
105	3.5	+	-					
113	1.5	-	0.1	+		☼		

117	-		0.1	+				
120	-		-					
121	-		0.1	+				
118	-		-					
119	-		-					
127	2.5	+	0.4	+	⊗			
126	5	+	0.2	+	⊗			
128	3.5	+	0.8	+	⊗			
130			0.4	+				
131	-		0.2	+				
133	-		0.2	+				
134	-		0.4	+				
135	-		-					
			TOTAL		11	8	2	5

(+) Muestra positiva

(-) Muestra negativa

(⊗) Muestras pertenecientes al grupo indicado en la columna

 Muestra invalida por falta de muestra

Pruebas Invalidas	20
A (+) (+)	11
B (-) (+)	8
C (+) (-)	2
D (-) (-)	5
Pruebas Validas	26
Total de Pruebas	46

### 7.3.5. Vacuna combinada (4 Semanas después de la Inmunización)

Folio	Lr/100 (UI/ml)		Celulas VERO (UI/ml)		a	b	c	d
8	5	+	0.21	+	☼			
31	7.5	+	0.156	+	☼			
32	4.5	+	0.27	+	☼			
33	3	+	0.066	-			☼	
34	4.5	+	0.2	+	☼			
36	3	+	0.27	+	☼			
37	3	+	0.133	+	☼			
74	3.5	+	0.1	+	☼			
75	2	+	-					
77	7.5	+	0.8	+	☼			
78	2	+	0.005	-			☼	
79	3.5	+	-					
80	3.5	+	1.6	+	☼			
81	3.5	+	0.4	+	☼			
82	5	+	0.4	+	☼			
84	10	+	0.4	+	☼			
85	10	+	0.4	+	☼			
86	10	+	-					
87	7	+	0.4	+	☼			
88	7	+	0.0025	-			☼	
90	2	+	0.1	+	☼			
91	3.5	+	0.05	-			☼	
92	3.5	+	0.05	-			☼	
93	7.5	+	0.2	+	☼			
94	10.5	+	-					
95	10.5	+	0.1	+	☼			
99	3.5	+	-					
102	7.5	+	0.1	+	☼			
103	7.5	+	0.2	+	☼			
104	7.5	+	-					
107	7.5	+	-					

108	> 10	+	-					
106	> 10	+	0.1	+	☼			
109	3.5	+	0.1	+	☼			
110	7.5	+	-					
114	2	+	0.2	+	☼			
115	2	+	0.8	+	☼			
122	2.5	+	-					
123	5	+	-					
124	3.5	+	-					
125	3.5	+	0.1	+	☼			
132	> 10	+	-					
TOTAL					24	0	5	0

(+) Muestra positiva

(-) Muestra negativa

(☼) Muestras pertenecientes al grupo indicado en la columna



Muestra invalida por falta de muestra

<b>Pruebas Invalidas</b>	13
A (+) (+)	24
B (-) (+)	0
C (+) (-)	5
D (-) (-)	0
Pruebas Validas	29
Total de Pruebas	42



### 7.3.6. Vacuna Combinada (6 Semanas después de la Inmunización)


Folio	Lr/100 (UI/ml)		Celulas VERO (UI/ml)		a	b	c	d
8	-		-					
31	3.5	+	0.06	-			☼	
32	-		0.041	-				
33	3	+	0.033	-			☼	
34	4.5	+	-					
36	1.5	-	0.28	+		☼		
37	-		0.9	+				
74	3.5	+	0.4	+	☼			
75	2	+	0.8	+	☼			
77	-		-					
78	-		0.4	+				
79	7.5	+	-					
80	-		-					
81	-		-					
82	-		-					
84	-		0.8	+				
85	7.5	+	3.2	+	☼			
86	1.5	-	0.8	+		☼		
87	7.5	+	0.2	+	☼			
88	7.5	+	-					
90	2	+	0.2	+	☼			
91	2	+	0.12	+	☼			
92	2	+	-					
93	3.5	+	-					
94	10	+	-					
95	10	+	-					
99	-		-					
102	3.5	+	2	+	☼			
103	1.5	-	0.4	+		☼		
104	3.5	+	0.2	+	☼			
107	1.5	-	-					

108	2	+	0.4	+	☼			
106	1.5	-	0.1	+		☼		
109	1.5	-	0.2	+		☼		
110	7.5	+	0.8	+	☼			
114	3.5	+	0.4	+	☼			
115	1.5	-	0.1	+		☼		
122	1.5	-	-					
123	1.5	-	0.2	+		☼		
124	1.2	-	0.4	+		☼		
125	3.5	+	-					
132	-		-					
TOTAL					11	8	2	0

(+) Muestra positiva

(-) Muestra negativa

(☼) Muestras pertenecientes al grupo indicado en la columna

 Muestra invalida por falta de muestra

Pruebas Invalidas	21
A (+) (+)	11
B (-) (+)	8
C (+) (-)	2
D (-) (-)	0
Pruebas Validas	21
Total de Pruebas	42

#### 7.4. Resultados generales (4 semanas)

(t)	a	b	c	d	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo + (%)	Valor Predictivo - (%)	Valor Global	Malas Clasificaciones
4 Sem.	81	4	16	9	83.5	69.2	95.3	36.0	0.8	0.2

#### 7.5. Resultados generales (6 semanas)

(t)	a	b	c	d	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo + (%)	Valor Predictivo - (%)	Valor Global	Malas Clasificaciones
6 Sem.	50	25	4	6	92.6	19.4	66.7	60.0	0.7	0.3

Sensibilidad (%) =  $100 * a / (a + c)$

Especificidad (%) =  $100 * d / (b + d)$

Valor predictivo + (%) =  $100 * a / (a + b)$

Valor predictivo - (%) =  $100 * d / (c + d)$

Valor global =  $a + d / a + b + c + d$

Malas clasificaciones =  $b + c / a + b + c + d$

Donde:

a = Número de muestras positivas por el método “in vitro” y positivas por el método “in vivo”

b = Número de muestras positivas por el método “in vitro” y negativas por el método “in vivo”

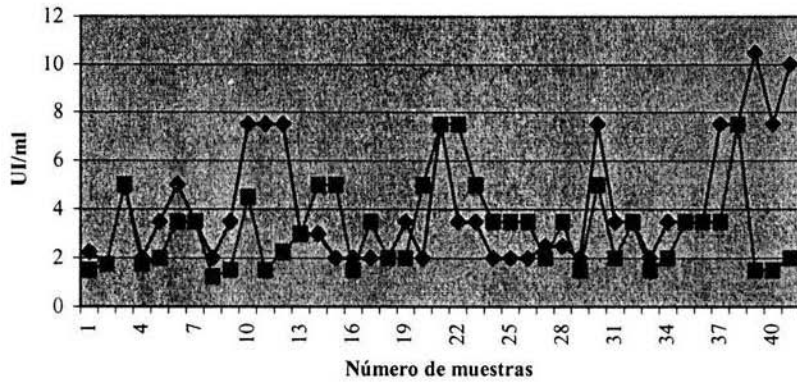
c = Número de muestras negativas por el método “in vitro” y positivas por el método “in vivo”

d = Número de muestras negativas por el método “in vitro” y negativas por el método “in vivo”

## 7.6. Graficas comparativas de resultados de 4 y 6 semanas

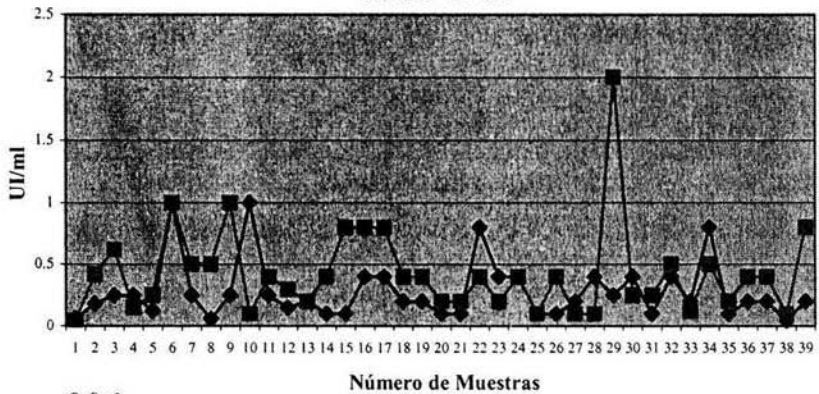
### 7.6.1 Vacuna DPT

Método "in vivo"



Grafica 1.

Método "in vitro"

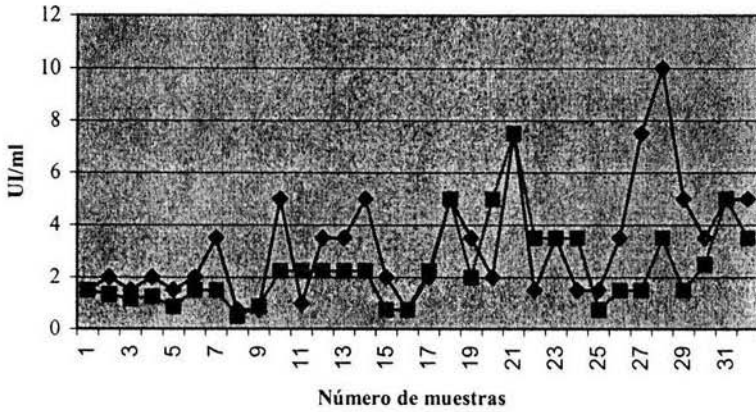


Grafica 2.

■ 6 semanas  
◆ 4 semanas

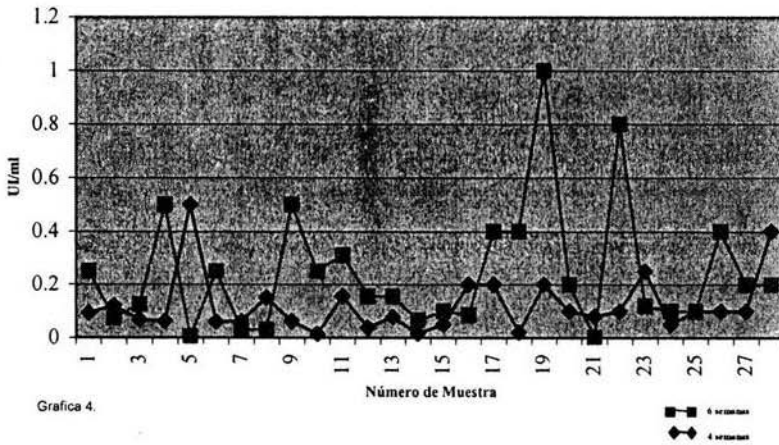
7.6.2 Vacuna Td

Método "in vivo"



Grafica 3.

Método "in vitro"

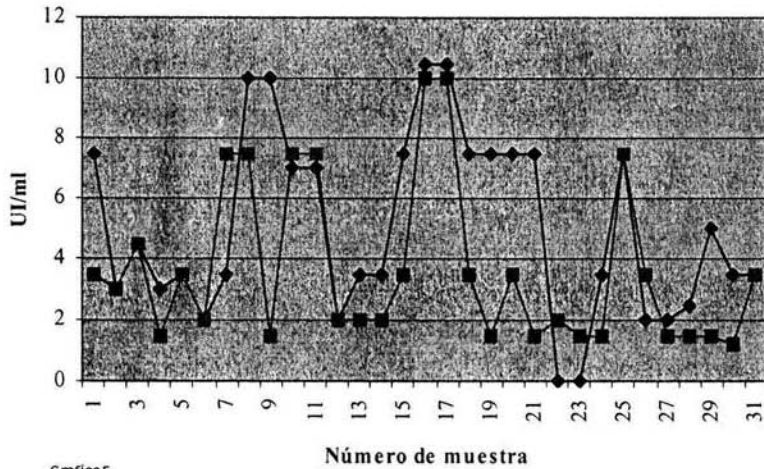


Grafica 4.

■ 6 semanas  
◆ 4 semanas

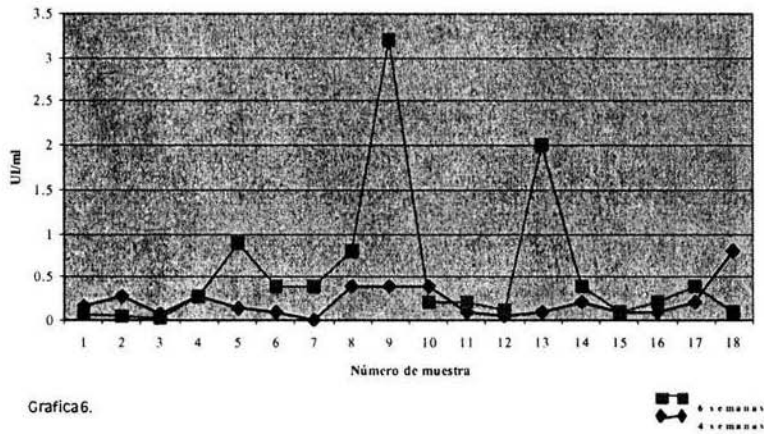
### 7.6.3 Vacuna Combinada

Método "in vivo"



Gráfica 5.

Método "in vitro"



Gráfica 6.

■ 4 semanas  
◆ 6 semanas

## CAPÍTULO 8

## 8 DISCUSIÓN

1. Iniciaremos con el análisis comparativo de nuestras muestras por los dos métodos utilizados:

En primera instancia analizaremos la muestra tomada a las 4 semanas después de ser inmunizados los cobayos. Aplicando las formulas para obtener los parámetros de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo (+), Valor Predictivo (-), Valor Global y Malas clasificación, tenemos lo siguiente:

La sensibilidad obtenida para el método probado "*in vitro*" (Células VERO) teniendo como estándar de referencia o estándar de oro la prueba "*in vivo*" (reacción intradérmica) es de **83.5%**; la sensibilidad es la probabilidad de detectar pequeñas concentraciones de antitoxina diftérica, es decir, la probabilidad de que se obtenga un resultado positivo en el análisis de potencia del toxoide. Cuando los datos obtenidos en las pruebas realizadas se manejan en una tabla de razón de momios, es fácil estimar a partir de ella la proporción de muestras que obtuvieron un resultado positivo en la prueba. El porcentaje de 83.5% es significativamente aceptable, sin embargo, no podemos considerar que esta prueba es muy sensible principalmente en vacunas combinadas, ya que en estos casos, los porcentajes de pruebas positivas se redujeron.

Considerando la especificidad como segundo parámetro de estudio, tenemos que los resultados obtenidos son de **69.2%**, sabemos que la especificidad es el parámetro que nos ayuda a demostrar que nuestra prueba en cuestión tiene la capacidad de detectar correctamente la antitoxina diftérica, es decir, nos da la seguridad de que la vacuna cuenta con la adecuada fracción diftéricas capas de producir la seroconversión. El valor obtenido de 69.2% para este parámetro, nos indica que la prueba que estamos estudiando comparándola con la ya establecida, no satisface las especificaciones, ya que es probable que no se esté detectando correctamente la reacción por lo tanto esté dando una inadecuada interpretación.

El tercer parámetro estudiado es el Valor predictivo positivo el cual nos da un resultado de **95.3%**, este parámetro nos representa la probabilidad de que una vacuna cuenta con un valor aceptable de potencia y que la prueba detecte efectivamente estos resultados, es decir, que la prueba da resultados apegados a la realidad. El valor obtenido nos da la seguridad de que la prueba estudiada tiene la capacidad de detectar y dar un valor más apegado al real.

El Valor predictivo negativo es nuestro cuarto parámetro calculado, dando como resultado un **36.0%**, este valor nos indica que del total de nuestras muestras una parte fue rechazada por no cumplir con el valor esperado según el método probado, sin embargo en realidad la vacuna cuenta con la especificación adecuada, esto es la probabilidad de que una vacuna en su fracción diftérica se encuentre dentro de lo esperado, sin embargo la prueba nos indique un valor fuera de rango. Para este



parámetro tenemos un valor muy bajo, lo cual podemos traducir como que en algunos de nuestros análisis podrían ser rechazados utilizando el método estudiado.

Valor global es la proporción de pruebas bien clasificadas por el método estudiado y el valor obtenido es aceptable siendo de **0.8** y por lo tanto las Malas Clasificaciones son de **0.2**, valores que nos dan la seguridad de tener un adecuado porcentaje de buenas clasificaciones.

- Como segundo punto observamos el comportamiento de la muestra tomada a partir de las 6 semanas después de ser inmunizados los cobayos. Considerando nuevamente los parámetros de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo (+), Valor Predictivo (-), Valor Global y Malas clasificaciones, tenemos lo siguiente:

La sensibilidad es de **92.5%**; la probabilidad de detectar concentraciones pequeñas de la fracción diftérica es muy elevado lo cual podemos traducir que en comparación con el resultado del análisis a las 4 semanas se obtuvo un incremento en el valor, esto nos ayuda de considerar que la prueba tiene la capacidad de ser sensible, sin embargo, probablemente a las 4 semanas aún no presente una adecuada seroconversión para ser detectada aún en su mínima concentración.

En cuanto a la especificidad, tenemos que el resultado obtenido es de **19.4%**, en comparación con el análisis realizado a las 4 semanas, tuvo un decremento muy significativo siendo originalmente de 69.2 por lo tanto no satisface la especificaciones.

El Valor predictivo positivo el cual nos dio un resultado de **66.7%**, es muy bajo considerando que la prueba da resultados apegado a la realidad.

El Valor predictivo negativo da como resultado un **60.0%**, para este parámetro tenemos un incremento en comparación con el de 4 semanas, lo cual nos indica que un porcentaje mayor de nuestros valores fue rechazado.

Valor global es la proporción de individuos bien clasificados por la prueba siendo ahora de **0.7** y por lo tanto las Malas Clasificaciones de **0.3**, valor aceptable dentro de una prueba de comparación de métodos.

2. Como último punto analizaremos las graficas comparativas para un mismo producto y con la misma técnica sin embargo a tiempos distintos 4 y 6 semanas después de la inmunización:

- Grafica 1: Vacunas DPT, Método "*in vivo*"; del total de las muestras comparadas, un **26%** no tuvieron relación en su resultado.

- Grafica 2: Vacunas DPT, Método "*in vitro*"; del total de las muestras comparadas, un **12.8%** no tuvieron relación en su resultado.

- Grafica 3: Vacunas Td, Método "*in vivo*"; del total de las muestras comparadas, un **18.7%** no tuvieron relación en su resultado.

- Grafica 4: Vacunas Td, Método "*in vitro*"; del total de las muestras comparadas, un **35.7%** no tuvieron relación en su resultado.

- Grafica 5: Vacunas combinadas, Método "*in vivo*"; del total de las muestras comparadas, un **29.3%** no tuvieron relación en su resultado.

- Grafica 6: Vacunas combinadas, Método "*in vitro*"; del total de las muestras comparadas, un **22.2%** no tuvieron relación en su resultado.

## CAPÍTULO 9

## 9. CONCLUSIÓN

Tomando en cuenta los dos puntos estudiados en esta tesis, podemos concluir que las pruebas "*in vitro*" nos han demostrado poca especificidad y una sensibilidad no muy aceptable, por lo cual, aún no podemos confiar en ellas como un método para sustituir o cambiar la prueba *in vivo*, a pesar de encontrar valores muy similares es necesario también obtener un parámetro de comparación más real, por ejemplo, el tener algún factor de conversión para poder tener tanto los valores de la prueba "*in vivo*" como los de la prueba "*in vitro*", sin embargo, aun es necesario hacer una gran cantidad de pruebas, el tema de esta tesis ha sido un paso inicial, en el cual nos podemos dar cuenta de los siguientes puntos:

1. La respuesta que puede dar un ser vivo nunca podrá ser igual a la que nos da una sola célula, en el caso de células VERO, que a pesar de ser un linaje puro y darnos una reproducibilidad en los resultados, es fácil que puedan existir intervenciones de contaminantes, punto que en los seres vivo ya ha sido considerado ya que a pesar de contar con mayor grado de factores de contaminación interviene el propio sistema inmune para defender y poder tener una mayor especificidad de la prueba.

2. Los productos que se utilizan los cuales pueden ser combinados, interviene nuevamente en la especificidad, ya que al saber que en una primer prueba tenemos un valor de especificidad de 69.2 % y en la segunda un porcentaje de 19.4%, esto indica que existe algún tipo de intervención. Esto también nos ha demostrado que el método para la prueba "*in vitro*" solo dará resultados confiables para pruebas en productos de preferencia monovalente, sin embargo, podremos decir que haciendo algunas variaciones de condiciones específicas para estos productos combinados podremos tener resultados más confiables.

3. Otro parámetro más a considerar es el parámetro de tiempo, en el que se está realizando las prueba, siendo de 4 y 6 semanas, lo cual nos indica una variación, es importante mencionar que en la mayoría de los casos, en la prueba realizada a las 4 semanas tuvimos un pool de sueros de 5 cobayos, sin embargo no siempre sobrevivieron todos, lo cual provocó que en la segunda toma de muestra; el pool de suero fuera de 4, 3 ó hasta 2 cobayos distintos, esto puede dar repuesta a las variaciones presentadas entre los resultados obtenidos de 4 semanas y en comparación con los de 6 semanas.

La comparación entre estos dos métodos, nos da un panorama mas claro de la relación que puede existir entre estos dos métodos, lo que se puede concluir es que aún no podremos tener un estado de prueba similar del ser vivo a una célula, lo que nos hace dar mayor variación. Es necesario realizar un mayor numero de variaciones en las condiciones de prueba con el fin de inhibir esas características que nos hacen dar dichas variaciones.

Se propone que el método de células VERO puede ser utilizado controlando los factores antes mencionados, sin embargo sin sustituir el método *in vivo* en cobayo dentro del conjunto de pruebas de control para productos biológicos hasta que se tenga la seguridad del control de estos factores. Las unidades en las que cada método se reportan tienen una variación en Unidades Internacionales (UI) y no es posible tener un factor de conversión entre los dos métodos; sería conveniente tener una evaluación adicional como alternativa a este método estudiado ya que de contar con el grado de control aceptable dará un ahorro substancial en animales, costos y trabajo.

## CAPÍTULO 10

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Salleras L, Vidal J. Los métodos de la medicina clínica preventiva I. Inmunizaciones preventivas y quimioprofilaxis. Med Clin Año 1993
2. Salleras L, S. Vacunaciones Preventivas; Edición Masson, Año 1998.
3. Alejandro Escobar Gutiérrez; Vacunas, Ciencia y Salud; Secretaria de Salud Subsecretaria de Coordinación y Desarrollo; México D.F. Pag. 9 –121, 529 – 538 Año 1990.
4. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM México; Monografía Prohibit Editorial Thomson; Año 1995; Pag. 1442
5. <http://www.lasvacunas.org/enfermedades/difteria.asp>
6. Norma Oficial Mexicana NOM-023-SSA2-1994, para el Control, Eliminación y Erradicación de las Enfermedades Evitables por Vacunación
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª. Edición Año 2000 Potencia de Toxoide Diftérico Método 1(A) Tomo II Pag. 1757
8. PROY-NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
9. [http://www.tuotromedico.com/temas/inmunizacion\\_general.htm#6](http://www.tuotromedico.com/temas/inmunizacion_general.htm#6)
10. <http://www.medicinayfamilia.com/enfermedades>
11. Gallart T Pacheco Medicina Interna 13a. Edición Moléculas que reconocen el antígeno: Anticuerpos y Receptores Antigénicos de las Células Año 1995

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- 12 Janeway CA, Inmunology. The immune system in health and disease 3a. edición, Año 1997
- 13 Prandi Farras. Establecimiento del calendario de vacunaciones Año 1974
- 14 Lluís Salleras Sanmartí Vacunaciones Preventivas Principios y aplicaciones Edit. Masson 1998
- 15 Harrison Isselbacher Principios de Medicina Interna 13ª. Edición Interamericana McGraw Hill 1995 pag. 580-593
- 16 Tay Zavala, Microbiología Médica; 6a Edición Editorial Médez 1996
- 17 [http://www.lasvacunas.org/prosalud/normas\\_8\\_2.asp](http://www.lasvacunas.org/prosalud/normas_8_2.asp)
- 18 Suitability of the VERO cell Method for Titration of Diphtheria Antitoxin in the United States Potency Test for Diphtheria Toxoid ,Massachusetts Public Health Biologic Laboratorie, State Laboratory Institute, 305 South St. Boston , MA 02130, USA
- 19 Jaime L. Palacios Treviño, Juan Ganes Introducción a la Pediatría, 6ª. Edición Ed. Méndez Editores 1998 pag. 481-520
- 20 Regueiro JR, López Larrea C. Inmunología, biología y patología del sistema inmunitario. Editorial Panamericana Año 1996
- 21 Abbas K. Inmunología Celular y Molecular Ed. Interamericana Mc Graw Hill Tercera Edición 1999
- 22 <http://www.salud.gob.mx/>



- 23 Espinosa Nahum Moreno Medicina Universitaria 2003; 5 (20) 204-6 Pruebas diagnosticas Valores Predictivos
- 24 Mosby, Diccionario de términos médico
- 25 Roitt, Ivan Essential Immunology 9a. Ed. Edit L Science Oxford 1997
- 26 Comparasion of four serological methods for the detection of diphtheria anti-toxin antibody
- 27 Ley General de Salud

### MPB 030 de la FEUM Titulación de la toxina diftérica en Lr/100

Procedimiento: Preparar una serie de diluciones de la toxina a probar en regulador de Glenny, con un factor de dilución que permita observar una respuesta graduada; de cada dilución depositar 0.1 ml en un recipiente adecuado; agregar 0.1 ml de antitoxina patrón diluida con solución 0.15M de NaCl a 0.4 UI/ml y ajustar el volumen a 0.4 ml con regulador de Glenny. Incubar las mezclas a 37°C y protegidas de la luz durante 3 h. Transcurrida la incubación, inocular 0.1 ml de cada mezcla por vía intradérmica en sitios espaciados e identificados, seleccionar al azar de la piel depilada del lomo del cobayo . observar las reacciones cutáneas, al final del periodo previamente establecido.

Interpretación: Aquella dilución de la toxina que mezclada con 0.04 UI cause una reacción eritematosa característica de 10 mm de diámetro o mayor al final del período previamente establecido, contendrá 4Lr/100/0.1 ml.

Explicación al ejemplo: En la dilución 1:125 se presenta la reacción característica, lo que quiere decir que se han mezclado 4Lr/100 contenidos en 0.1ml de dicha dilución, con 0.04UI contenidas en 0.1ml . Por lo tanto, en el volumen total de mezcla (0.4ml) tenemos 4Lr/100 mezclados con 0.04 UI, y 1Lr/100 mezclado con 0.01UI contenidos en la dosis inoculada (0.1ml). Así, 1 ml de la dilución 1:125 de la toxina contiene 40Lr/100, por lo que la toxina sin diluir contiene:  $125 \times 40 = 5000$  Lr/100/ml.

Títulos arbitrarios de la toxina*	Dilución para 4Lr/100/0.1ml	Dilución de toxina (ml)	Diluyente regulador de Glenny (ml)	Antitoxina de referencia con 0.04 UI/0.1 (ml)
2000	1:50	0.1	0.2	0.1
3000	1:75	0.1	0.2	0.1
5000	1:125	0.1	0.2	0.1
7000	1:175	0.1	0.2	0.1
10000	1:250	0.1	0.2	0.1

\* Títulos arbitrarios considerando la concentración media de la toxina en la muestra No. 3.

Tabla 1. Ejemplo de tabla para registro de titulación de toxina diftérica en Lr/100

Dilución	Lectura de 48 h a 72 h
1:50	23 mm
1:75	18 mm
1:125	10 mm
1:175	5 mm
1:250	----

Tabla 2 Ejemplo del registro de resultados esperados.

## **Anexo 2**

**(MPB) 055. Potencia de Toxide Difterico descrito en la FEUM (Método 1)**

1. Diluir el patrón de antitoxina con solución 0.15M de NaCl para obtener 0.04UI/0.1ml.
2. Diluir la toxina de prueba para obtener 4Lr/100/0.1 ml, empleando regulador de Glenny como diluyente.
3. Preparar una solución 0.15M de NaCl, las diluciones del problema indicadas en la tabla 5.
4. Preparar las series de tubos del patrón y del problema, como se indica en las tablas 4 y 5, respectivamente
5. Incubar todas las mezclas a 37°C y protegerlas de la luz durante 3h.
6. De cada mezcla inyectar 0.1 ml por vía intradérmica en sitios espaciados e identificadas, seleccionando al azar, de la piel depilada o rasurada del lomo del cobayo o conejo.
7. Observar las reacciones cutáneas entre las 48h y 72 h posteriores a la inyección. Registrar los diámetros en cada caso
8. Se dá el contenido de UI/ml de una antitoxina, en función de las unidades esperadas correspondientes a la mezcla que dió lugar a una reacción eritematosa de aproximadamente 10 mm de diámetro. Debe procurarse que una reacción equivalente aparezca con la mezcla correspondiente al tubo 3 de la serie patrón.
9. Multiplicar el contenido en UI/ml de la antitoxina por el volumen promedio por frasco para obtener el contenido de UI por frasco.

**SERIE PATRÓN**

No. de tubo	Dilución de la toxina 4Lr/100/0.1ml (ml)	Antitoxina patrón diluida a 0.04 UI/0.1 ml (ml)	Solución reguladora de Glenny (ml)	Lectura (mm) <sup>a</sup>
1	0.30	1.2	0.00	
2	0.30	0.6	0.30	
3	0.30	0.3	0.60	
4	0.30	0.15	0.75	
5	0.30	0.075	0.825	

<sup>a</sup> Columna para registro de medidas de la intradermorreacción en cobayo

Tabla 4. Esquema para la preparación del estandar en la determinación de la potencia de antitoxina difterica (10,000 UI/ml)

**SERIE PROBLEMA**

No. De tubo	Toxina diluida 4Lr/100/0.1ml	Problema		Solución reguladora de Glenny	Lectura (mm) <sup>a</sup>	UI/ml esperadas
		Dilución	Volumen			
1	0.30	1:2250	0.3	0.6		900
2	0.30	1:2375	0.3	0.6		950
3	0.30	1:2500	0.3	0.6		1000
4	0.30	1:2625	0.3	0.6		1050
5	0.30	1:2750	0.3	0.6		1100

<sup>a</sup> Columna para registro de medidas de la intradermorreacción en cobayo.

Tabla 5. Esquema para la preparación de muestras en la determinación de la potencia de antitoxina difterica

**Anexo 3**

## **El procedimiento propuesto para la determinación de la potencia de la antitoxina diftérica por el método in vitro**

Titulación del suero: Realizar diluciones de toxina y antitoxina a las siguientes concentraciones.

Estándar Nacional de Antitoxina diftérica lote AD01, con potencia de (10 UI/ml) a una concentración de 0.25 UI/ml. Realizar una dilución 1:40 en medio 199 completo.

Estándar Nacional de Antitoxina diftérica lote AD01, con potencia de (10 UI/ml) a una concentración de 0.004 UI/ml. Realizar una dilución 1:250 en medio 199 completo

(A) 1:100 = 2µl de antitoxina diftérica + 198 µl de medio 199 completo

(B) 1:250 = 4µl de dilución A + 96 µl de medio 199 completo

Estándar Nacional de Toxina diftérica lote TD01 a una concentración de 100,000 Lm/ml

(A) 1:100 = 2µl + 198 µl de SSI

(B) 1:1000 = 25µl de dilución A + 225µl de SSI

(C) 1:100,000 = 100µl de dilución B + 9.9ml de SSI

Depositar 50 µl de medio de cultivo 199 completo a todos los pozos con excepción de los pozos A11 y 12. A los pozos G-H 11 y 12 agregar 50 µl más (Tabla 6). Agregar 50µl de suero de referencia (pozo A) o muestra (pozos B a H) en los pozos de la columna 1. Mezclar cuidadosamente, realizar diluciones con factor de dilución de 2, pasando 50 µl de la columna 1 a la columna 2 hasta la columna 10, descartar 50 µl para igualar volúmenes.

Depositar 50 µl de antitoxina de referencia diluida a 0.004 UI/ml en los pozos A y B 11 y 12, mezclar cuidadosamente, realizar diluciones con factor de dilución de 2, pasando 50 µl de los pozos B 11 y 12 a los pozos C11 y 12, hasta los pozos D 11 y 12, descartar 50 µl para igualar volúmenes.

Agregar 50 µl de la toxina diluida a uno Lm/100,000, a cada uno de los pozos a excepción de los pozos G y H 11 y 12. Sellar con film y mezclar suavemente. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas. Agregar a cada uno de los pozos 50 µl de una suspensión de células Vero, conteniendo 250,000 células/ml. Sellar con film y mezclar suavemente. Incubar durante 6 días a 37 + 1°C con presión al 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido el tiempo de incubación, registrar para cada serie de diluciones el último pozo amarillo, (indicativo de células vivas); se puede observar las microplacas con un microscopio invertido para diferenciar los pozos que contengan células vivas y los que tengan células muertas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	REF	REF	REF	REF	REF	REF	REF	REF	REF	REF	CON	CON
B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	CON	CON
C	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	CON	CON
D	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	CON	CON
E	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	TOX	TOX
F	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	TOX	TOX
G	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	CEL	CEL
H	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	CEL	CEL

**Pb= Problema    Con= Control    Cel= Celulas Vero    Ref= Referencia    Tox = Toxina**

Tabla 6 Esquema del orden de colocación en microplacas.